慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	PI3K/Akt/mTOR経路を標的とする放射線増感剤の開発：胃癌細胞での検討
Sub Title	Radiosensitization in gastric cancer cell lines using different PI3K/AKT/mTOR inhibitors
Author	茂松, 直之(Shigematsu, Naoyuki) 深田, 淳一(Fukada, Junichi) 西村, 修一(Nishimura, Shuichi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	進行胃癌の治療成績は未だ十分といえず, 集学的治療の充実が望まれる。PI3K/AKT/mTOR シグナル経路は様々な成長因子の受容体により活性化され細胞増殖に関与する。胃癌培養細胞に対しPI3K/AKT/mTOR経路の阻害剤投与, 放射線照射, 照射と薬剤投与併用を行い, 細胞生存率, アポトーシスの比率, 細胞周期の変化について測定し, 有効な放射線増感剤を探索した。薬剤と照射同時投与を行うことで最も高い殺細胞効果が得られ, アポトーシスも多く観察された。細胞周期の検討では, NVP-BEZ235と照射の同時併用においてのみG2/M期とG1期の比が上昇しており, 有効な放射線増感剤と考えられた。 Treatment of gastric cancer in advanced stages is still challenging. More effective anti-tumor radiosensitizing drug is desired to manage systemic disease. PI3K/AKT/ mTOR pathway is one of the important signal cascades which are activated by various growth factor receptors. We selected three PI3K/AKT/ mTOR pathway inhibitors. Treatment effectiveness is assessed by irradiation, drug exposure alone and combination of irradiation and drug in human gastric cell lines. Cell survival was evaluated with colony formation. Apoptosis was evaluated with flow cytometric analyses using AnnexinV-FITC/PI stain. Cell cycle distribution was evaluated using flow cytometric analyses. Concurrent exposure showed larger cytotoxic effect and higher apoptotic rate than the other exposure. The G2/G1 ratio was exclusively increased by concurrent exposure with irradiation and NVP-BEZ235 after 48-hours. NVP-BEZ235 seems to be a promising radiosensitizing drug in terms of arresting cell cycle in G2/M phase.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24591850 研究分野：医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24591850seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５９１８５０

研究課題名（和文）ＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ／ｍＴＯＲ経路を標的とする放射線増感剤の開発－胃癌細胞での検討－

研究課題名（英文）Radiosensitization in gastric cancer cell lines using different PI3K/AKT/mTOR inhibitors

研究代表者

茂松　直之（Shigematsu, Naoyuki）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：３０１７８８６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：進行胃癌の治療成績は未だ十分といえず、集学的治療の充実が望まれる。PI3K/AKT/ mTOR シグナル経路は様々な成長因子の受容体により活性化され細胞増殖に関与する。胃癌培養細胞に対しPI3K/AKT/ mTOR経路の阻害剤投与、放射線照射、照射と薬剤投与併用を行い、細胞生存率、アポトーシスの比率、細胞周期の変化について測定し、有効な放射線増感剤を探索した。
薬剤と照射同時投与を行うことで最も高い殺細胞効果が得られ、アポトーシスも多く観察された。細胞周期の検討では、NVP-BEZ235と照射の同時併用においてのみG2/M期とG1期の比が上昇しており、有効な放射線増感剤と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Treatment of gastric cancer in advanced stages is still challenging. More effective anti-tumor radiosensitizing drug is desired to manage systemic disease. PI3K/AKT/ mTOR pathway is one of the important signal cascades which are activated by various growth factor receptors. We selected three PI3K/AKT/ mTOR pathway inhibitors. Treatment effectiveness is assessed by irradiation, drug exposure alone and combination of irradiation and drug in human gastric cell lines. Cell survival was evaluated with colony formation. Apoptosis was evaluated with flow cytometric analyses using AnnexinV-FITC/PI stain. Cell cycle distribution was evaluated using flow cytometric analyses. Concurrent exposure showed larger cytotoxic effect and higher apoptotic rate than the other exposure. The G2/G1 ratio was exclusively increased by concurrent exposure with irradiation and NVP-BEZ235 after 48-hours. NVP-BEZ235 seems to be a promising radiosensitizing drug in terms of arresting cell cycle in G2/M phase.

研究分野：　医学

キーワード：　放射線治療　放射線生物学　放射線増感剤　胃癌

１．研究開始当初の背景

（１）進行胃癌に対する補助療法として本邦では一般的に化学療法が行われ、欧米では化学療法に加え放射線治療が施行されている。われわれは積極的に化学放射線治療を試みており、欧米と同等の奏効率が得られているが、まだ治療成績が良好とはいえない。従来の抗癌剤とは異なる機序による、放射線増感効果（局所病巣の制御）、転移抑制効果（遠隔転移病巣の制御）を持った薬剤の探索が望まれる。

（２）PI3K/Akt/mTOR 経路は、主に細胞の増殖生存シグナルを伝える重要な役割を持っており、低酸素の誘導、アポトーシスの抑制、オートファジーの抑制など様々な応答を引き起こし、癌細胞の生存に貢献する。放射線照射による同経路の活性化が知られており、同経路の阻害剤による放射線増感効果を探索することを着想した。

２．研究の目的

胃癌細胞に放射線照射と阻害剤投与、照射と阻害剤投与を行い、細胞の生存率、PI3K/Akt/mTOR 経路の活性度を評価し、放射線照射と併用効果が高い阻害剤を特定することが本研究の目的である。

３．研究の方法

（１）代表的なヒト胃癌由来細胞のなかから使用する培養細胞株を複数選択する。
作用機序の異なる PI3K/Akt/mTOR 経路阻害剤を複数準備する。

（２）胃癌細胞系に対して、放射線照射、阻害剤の投与、照射と阻害剤投与を行い、それぞれの細胞生存率をコロニー形成法、MTT assay 法にて測定する。照射と阻害剤投与は同時投与と逐次投与の両方を検討する。

（３）細胞生存率の測定により、照射と阻害剤の併用効果が観察されたら、細胞の応答を確認するため、アポトーシスと細胞周期を観察する。上記と同様の 4 通りについて細胞周期を測定する。

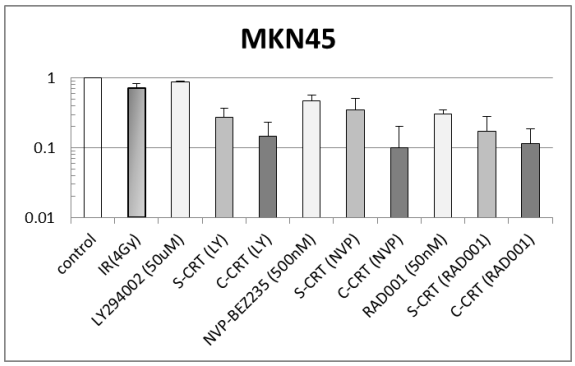
（４）コントロール、放射線照射、阻害剤投与、両者併用時それぞれにおける PI3K/Akt/mTOR の活性度評価として PI3K/Akt/mTOR 経路に関連する分子の発現を Western blot 法により測定し、機序を解明する。

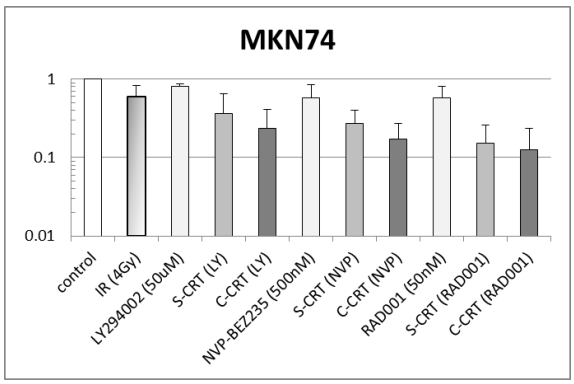
（５）これまでの結果より、放射線照射の増感効果が高い PI3K/Akt/mTOR 経路阻害剤を選択する。

４．研究成果

（１）照射によるコロニー形成法の結果から、胃癌細胞セルラインとして MKN45，MKN74 を選択した。PI3K/Akt/mTOR 経路阻害剤として PI3/Akt の機能阻害剤である低分子化合物 LY294002、mTOR 阻害剤である RAD001（エベロリムス）、PIK/mTOR 複合阻害剤である NVP-BEZ235 を選択した。

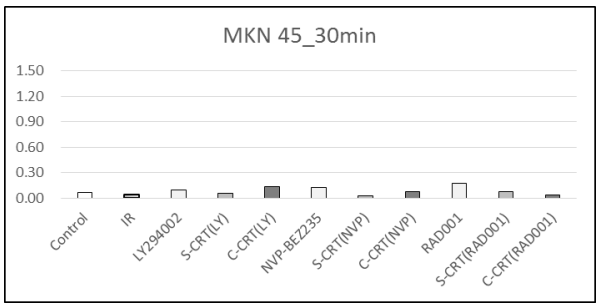
（２）胃癌細胞に放射線照射と阻害剤投与を行い、細胞の生存率を測定した。この結果より、照射と阻害剤を併用するにあたって適当と思われる用量を決定した。
コロニー形成法による生存率をコントロールを基準として算出した。

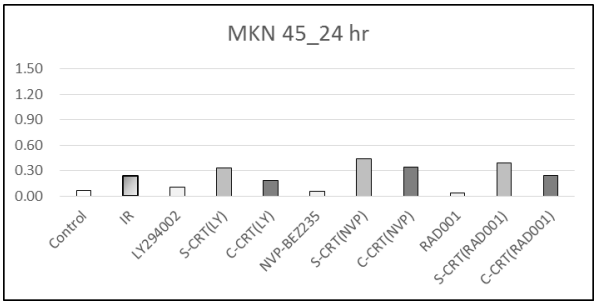


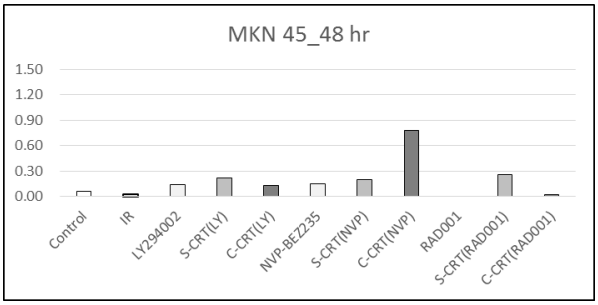


MKN45、MKN74 とも薬剤と照射を併用したグループでコロニー形成率の低下が観察された。いずれの薬剤においても同様の傾向で、特に同時併用で低下が認められた。

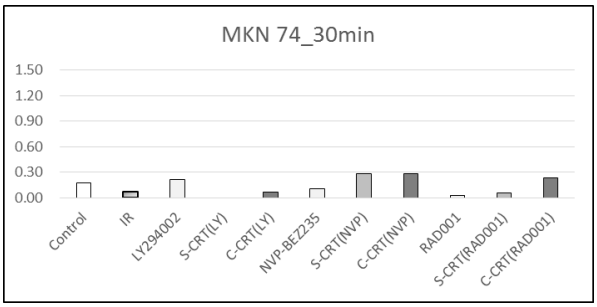
（３）細胞周期の解析は細胞の回収 30 分後、24 時間後、48 時間後に細胞周期を測定し、G2/G1 比の変化をフローサイトメトリー（FACS）にて比較検討した。

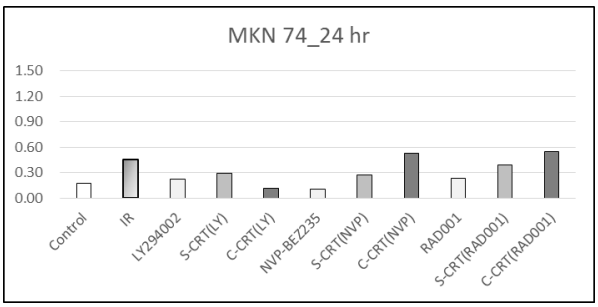


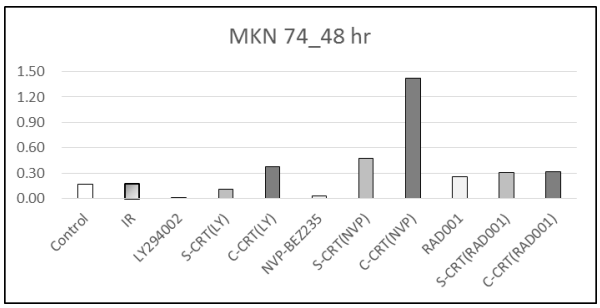




MKN45 において、照射と薬剤（NVP-BEZ235）の同時投与を行い 48 時間後に細胞周期を測定すると、G2/G1 比の著明な上昇（コントロール 0.06→同時投与 0．78）が観察された。

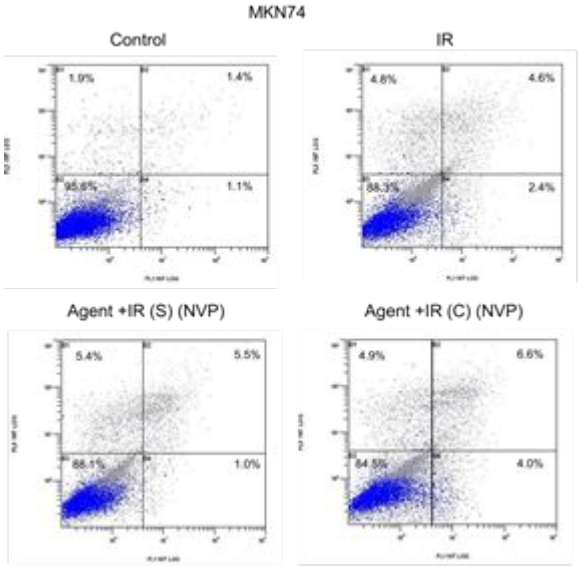






MKN74 においても、照射と薬剤（NVP-BEZ235）の同時投与 48 時間後の細胞周期において、G2/G1 比の顕著な上昇（コントロール 0.17→同時投与 1.42）が観察された。このような変化は他の薬剤との併用や照射単独、薬剤単独、異時投与では認められなかった。

（４）アポトーシスの発現を AnnexinV-FITC と PI 染色によるフローサイトメトリー（FACS）法にて測定した。解析は細胞の回収 48 時間後に行った。いずれの薬剤においても照射と薬剤同時投与群において、最も高率にアポトーシスが観察された。



（５）まとめとして、コロニー形成法における生存率及びアポトーシス誘導率の検討から、3 種類の PI3K/Akt/mTOR 経路阻害剤すべてにおいて放射線照射との併用効果が認められた。

とりわけ PIK/mTOR 複合阻害剤である NVP-BEZ235 は細胞周期の測定において、G2/G1 比の著明な上昇が観察され、G2/M アレストが示唆された。このことから、放射線増感効果が期待される薬剤と考えられた。

今回、ウェスタンブロット法含め、PI3K/Akt/mTOR 経路の活性度との関連は明らかにできなかった。また、オートファジーなど他の様式の細胞死についても今後さらなる研究が必要である。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　８　件）

（１）Matsuda S, Takahashi T, Fukada J, Fukuda K, Kawakubo H, Saikawa Y, Kawaguchi O, Takeuchi H, Shigematsu N, Kitagawa Y.、Phase I study of neoadjuvant chemoradiotherapy with S-1 plus biweekly cisplatin for advanced gastric cancer

patients with lymph node metastasis: -KOGC04-.、Radiation Oncology、査読有、8;9:9.、2014、doi: 10.1186/1748-717X-9-9.

（2）Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T、Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. Cancer Biology and Therapy、査読有、15(1):81-8、2014、doi: 10.4161/cbt.26610

（3）Fukada J, Shigematsu N, Takeuchi H, Ohashi T, Saikawa Y, Takaishi H, Hanada T, Shiraishi Y, Kitagawa Y, Fukuda K、Symptomatic pericardial effusion after chemoradiation therapy in esophageal cancer patients. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics、査読有、87(3):487-93、 2013、 doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.07.008.

（4）Liu C, Kawata T, Furusawa Y, Zhou G, Inoue K, Fukada J, Kota R, George K, Cucinotta F, Okayasu R、Chromosome aberrations in normal human fibroblasts analyzed in G0/G1 and G2/M phases after exposure in G0 to radiation with different linear energy transfer (LET). Mutation Research、査読有、756(1-2):101-7、2013、doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.005.

（5）Liu C, Kawata T, Zhou G, Furusawa Y, Kota R, Kumabe A, Sutani S, Fukada J, Mishima M, Shigematsu N, George K, Cucinotta F、Comparison of the repair of potentially lethal damage after low- and high-LET radiation exposure, assessed from the kinetics and fidelity of chromosome rejoining in normal human fibroblasts. Journal of Radiation Research、査読有、54(6):989-97、2013、doi: 10.1093/jrr/rrt031

（6）Fukada J, Hanada T, Kawaguchi O, Ohashi T, Takeuchi H, Kitagawa Y, Seki S, Shiraishi Y, Ogata H, Shigematsu N、Detection of esophageal fiducial marker displacement during radiation therapy with a 2-dimensional on-board imager: analysis of internal margin for esophageal cancer、International Journal of Radiation Oncology Biology Physics、査読有、85(4):991-8、2013、doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.07.2358.

（7）高橋常浩、才川義朗、福田 和正, 和田 則仁, 川久保 博文, 竹内 裕也, 深田 淳一, 川口 修, 高石 官均, 茂松 直之, 北川 雄光、進行胃癌に対する化学放射線療法、癌と化学療法、査読無、39 巻 13 号、Page2464-2468、2012、http://mol.medicalonline.jp.kras1.lib.keio.ac.jp/library/journal/download?GoodsID=ab8gtkrc/2012/003913/005&name=2464-2468j&UserID=131.113.213.130&base=jamas_pdf

（8）Fukada J, Shigematsu N, Ohashi T, Shiraishi Y, Takeuchi H, Kawaguchi O, Kitagawa Y、Pericardial and pleural effusions after definitive radiotherapy for esophageal cancer、Journal of Radiation Research、査読有、53(3):447-53、2012、doi:10.1269/jrr.11194

〔学会発表〕（計 １１ 件）

（1）Junichi Fukada, Ryuichi Kota, Masayo Mishima, Tetsuya Kawata, Naoyuki Shigematsu、Radiosensitization in gastric cancer cell lines using different PI3K/AKT/mTOR inhibitors、International congress of Radiation Research、25-29/May/2015, Kyoto, Japan

（2）Junichi Fukada, Hiromasa Takaishi, Yuko Kitagawa, Naoyuki Shigematsu、Pleural effusion after chemoradiotherapy for esophageal cancer - a dosimetric analysis-、International congress of Radiation Research、25-29/May/2015, Kyoto, Japan

（3）Naoyuki Shigematsu, Junichi Fukada, Ryuichi Kota, Yutaka Shiraishi, Tetsuya Kawata、Cytogenetic Effects of Radiation and Caffeine on Normal Human Fibroblast and Ataxia Telangiectasia Heterozygous Fibroblast Cells、International congress of Radiation Research、25-29/May/2015, Kyoto, Japan

（4）Tetsuya Kawata, Cuihua Liu, Junich Fukada, Ryuich Kota, Naoyuki Shigematsu、Chromosomal Aberrations in Normal and AT Cells Exposed to High Dose of Low-dose-rate Irradiation、International congress of Radiation Research、25-29/May/2015, Kyoto, Japan

（5）祝田勇輝, 深田淳一,酢谷真也,花田剛士,高橋常浩,北川雄光,茂松直之、上腹部リンパ節の呼吸性移動-4DCT を用いた検討-、日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会、2014 年 12 月 11 日-13 日、パシフィコ横浜、横浜市西区

（6）高橋 常浩, 才川 義朗, 高石 官均,

深田 淳一，川久保 博文，和田 則仁，川口 修，竹内 裕也，茂松 直之，北川 雄光、進行胃癌における術前治療の組織学的効果判定と予後について、癌治療学会、2013 年 10 月 24 日-26 日、京都国際会館、京都市左京区

（７）深田淳一，茂松直之，竹内裕也，大橋俊夫，才川義朗，高石官均，花田剛士，白石悠，北川雄光，福田恵一 食道癌化学放射線治療後の有症状の心嚢水貯留は 3 次元放射線治療で減少したか？ 第 25 回日本放射線腫瘍学会学術大会 2013 年 10 月 18-20 日、ホテル青森・リンクステーション青森、青森市

（８）Fukada J, Shigematsu N, Takeuchi H, Shiraishi Y, Hanada T, Ohashi T, Kota R, Kumabe A, Sutani S, Kitagawa Y. Symptomatic pericardial effusion after chemoradiation therapy for esophageal cancer: A historical comparison. 55th Annual Meeting of American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 22-25/September/2013, Atlanta, USA

（９）Fukada J, Shigematsu N, Hanada T, Ohashi T, Tanaka T, Shiraishi Y, Takeuchi Y, Kitagawa Y. Inter- and intrafraction gastric motion study –Impact of breathing and stomach filling. 54th Annual Meeting of American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 28-31/October/2012, Boston, USA

（１０）藤田 進也，深田 淳一，茂松 直之，白石 悠，大橋 俊夫，花田 剛士，竹内 裕也，北川 雄光、食道がん放射線治療後の胸水・心嚢液貯留 DVH による検討、第 71 回日本医学放射線学会総会・学術集会 2012 年 4 月 12 日-15 日、パシフィコ横浜、横浜市西区

（１１）西村 修一，深田 淳一，高橋 常浩，川口 修，高石 官均，才川 義朗，竹内 裕也，北川 雄光，茂松 直之、手術不能進行胃癌に対する化学放射線治療、第 71 回日本医学放射線学会総会・学術集会 2012 年 4 月 12 日-15 日、パシフィコ横浜、横浜市西区

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織

(1) 研究代表者
茂松 直之 （SHIGEMATSU, Naoyuki）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30178868

(2) 研究分担者
深田 淳一 （FUKADA, Junichi）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号： 50338159

西村 修一 （NISHIMURA, Shuichi）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号： 40571138