

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791316

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫に対する mTOR を標的とした分子標的治療の基礎的検討

研究課題名（英文） Temozolomide, mTOR Inhibitor, Inhibits Progression of Malignant Pleural Mesothelioma *in Vitro*.

研究代表者

田村 昌也 (TAMURA MASAYA)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：10397185

研究成果の概要（和文）：mTOR 阻害剤である Temozolomide は悪性胸膜中皮腫細胞株の増殖抑制効果を濃度依存性に示すことを *In Vitro* で示した。特に p70s6k のリン酸化を阻害すること、またアポトーシスのマーカーとして知られる cleaved-caspase3 の発現レベルを亢進させることを確認した。FACS 法により、MSTO211H 以外の細胞株、H226, H290, and Y-MES014 ではアポトーシスの誘導が確認された。さらに Temozolomide と Cisplatin は相乗効果を示すこと、Temozolomide は抗血管新生効果、特に VEGF 発現抑制効果を示すことを明らかにした。Temozolomide は抗腫瘍効果と、血管新生抑制効果の両面の作用を持つことが示された。

研究成果の概要（英文）：The results suggest the therapeutic efficacy of temozolomide against MPM *in vitro*. And it is expected that temozolomide inhibits MPM growth not only by anticancer effect but by antangiogenic effect *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫, 分子標的治療, PI3K- AKT- mTOR 経路

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト関連腫瘍であり、悪性度が高く各種治療法に対して抵抗

性である。本疾患に罹患した患者の予後はその平均生存期間が症状を呈してから 10-17 ヶ

月、また診断から 9-13 ヶ月と悪性腫瘍の中でも特に悪い。また近年先進国での患者数が増加の傾向を見せている。また米国では 2000 年の 1 年間に 2200 例の新規悪性胸膜中皮種症例が診断されている。また本邦においても 2010 年から 2040 年にかけて患者の急激な増加が見込まれている。外科的治療が治療の根幹をなすが、実際のところ標準治療といえる治療法は確立しておらず、新たな治療法の開発が望まれる。

Mammalian target of rapamycin (m-TOR)はマクロライド系抗生物質ラパマイシン標的分子として同定された 290kDa のセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の分裂や成長における調節因子としての役割を果たしている。現在その阻害薬がシクロスポリン、タクロリムスに続く第三の免疫抑制剤として米国で用いられており、最近では腫瘍薬としての臨床試験が海外で実施されている。

また、既にラパマイシン放出性ステントは冠動脈疾患に実用化され臨床の場で用いられている。このようにラパマイシン（シロリムス）は臓器移植や虚血性心疾患治療、癌治療など臨床医学的な重要性が高まっている。テムシロリムス(Temsirolimus, CCI-779)はラパマイシン誘導体でジヒドロエステル化合物であり、静脈投与可能な抗癌剤として治療研究が進んでいる。これまでに各種癌腫において phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/mTOR pathway が治療標的として挙げられている（乳癌、前立腺癌、視神経腫瘍）、などでその治療効果が報告されている。In Vitro での報告だけでなく、経口 mTOR 阻害剤である RAD001 (everolimus)の転移性乳癌に対する臨床試験も終了している。ラパマイシンのアナログである CCI-779(Temsirolimus)を用いた転移性腎細胞癌患者 111 例に対する第二相試

験の結果では、7%の PR, 26%の minor response rate が報告されている。

悪性胸膜中皮腫細胞に対する PI3-K/mTOR pathway を標的とした治療効果については In Vitro の、In Vivo での報告が僅かに散見されるが、現在臨床にて使用されている Cisplatin と Alimta の併用治療に対する効果の比較検討、ならびに外科的治療を含めた集学的治療の効果についての検討は未だなされていない。

2. 研究の目的

新たに悪性胸膜中皮腫細胞株を入手（購入）、あるいは臨床検体から細胞株を樹立する。ラパマイシンの悪性胸膜中皮腫細胞株に対する治療効果をまず In Vitro にて確認する。次いで、現在臨床にて同腫瘍に対して使用されている Cisplatin, Pemetrexede との治療効果の比較、さらには各種薬剤の組み合わせによる治療効果について検討する。更には、マウス、ラットを用いた In Vivo 系にても治療効果を確認する。

3. 研究の方法

(1) mTOR阻害剤の悪性胸膜中皮腫細胞株への治療効果

①細胞株: H2452(sarcomatoid), H28(sarcomatoid), H2052(epithelial), MSTO-211H(biphasic)の各種悪性胸膜中皮腫細胞株はAmerican Type Culture Collection (ATCC)より購入する。さらにACC-MESO-1(fibroblast-like), ACC-MESO-4(epithelial-like), Y-MESO-8Aおよび8D (bipasic-like)の4種細胞株をRiken Biological Resource (日本)より購入する。計8種類の悪性胸膜中皮腫細胞株を使用する。共同研究施設であるウィーン大学胸部外科学教室(Walter Klepetko教授主宰)では年間20例ほどの悪性胸膜中皮腫症例

に対する外科的治療を試行しており、臨床検体からの腫瘍細胞株の樹立を試みている。新たに樹立された細胞株を使用することが許諾されており、上記の8種の細胞株に加え、これら新たな細胞株も随時使用していく予定である。

②薬剤

Temsirolimus (CCI-779)はWyeth Lederle Pharma GmbH (Austria)から、またCisplatinはBristol-Meyers Squibb Laboratories (Austria)からそれぞれ供与を受ける。CCI-779は -20°C で粉末状で保存し、使用時にエタノールで溶解して使用する。Cisplatinは5mMに調整し -20°C に保存する。

(2)評価

①Vitality Assay (=EZ4U/MTT) assay

96well plate を使用する。各Wellには $2 \times 10^4/\text{ml}$ 濃度の溶液 $100 \mu\text{l}$ を散布する。24時間の培養後、CCI-779(Temsirolimus), Pemetrexed, Cisplatinの3剤のコンビネーションアッセイを施行する。更に24時間の培養後、溶液を完全に吸引した後RPMIにて10倍希釈したEZ4Uを $100 \mu\text{l}$ 各wellに注入し1時間の培養の後、595nmにて吸光度を測定する(Model3550, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

薬剤使用濃度はPreliminary dataより得られた結果を基に、下記濃度にて施行する。

CCI-779 (ng/ml): 0, 0.1, 1, 10, 100, 250

Pemetrexed(μM):1, 5, 10, 50, 100

Cisplatin(μM): 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5

②Colony Formation Assay

6well plate を使用する。各Wellには $1 \times 10^3/\text{ml}$ の細胞数を散布する。

下記の2剤コンビネーションアッセイを施行する。

a. CCI-779(Temsirolimus) + Pemetrexed

b. CCI-779(Temsirolimus) + Cisplatin

薬剤使用濃度はPreliminary dataより得られた結果を基に、下記濃度にて施行する。

CCI-779 (ng/ml):1, 10, 100

Pemetrexed(μM):50, 100

Cisplatin(μM):0.25, 0.5

③Western Blotting

m-TOR, S6, ERK, PIK3, Akt等、mTOR pathway周辺の蛋白発現をWestern Blotにより検討する。

4. 研究成果

mTOR 阻害剤である Temsirolimus は悪性胸膜中皮腫細胞株の増殖抑制効果を濃度依存性に示すことを In Vitro で示した。特に p70s6k のリン酸化を阻害すること、またアポトーシスのマーカーとして知られる cleaved-caspase3 の発現レベルを亢進させることを確認した。FACS 法により、MST0211H 以外の細胞株、H226, H290, and Y-MES014 ではアポトーシスの誘導が確認された。さらに Temsirolimus と Cisplatin は相乗効果を示すこと、Temsirolimus は抗血管新生効果、特に VEGF 発現抑制効果を示すことを明らかにした。Temsirolimus は抗腫瘍効果と、血管新生抑制効果の両面の作用を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

① 守屋真紀雄、田村昌也

悪性胸膜中皮腫に対する mTOR を標的とした分子標的治療の基礎的検討

第51回日本肺癌学会総会

平成 22 年 11 月 22 日 広島国際会議場 (広島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 田村 昌也 (TAMURA MASAYA)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：10397185