

〔学位論文〕

口腔扁平上皮癌細胞に対するmTOR阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究

植村 太輔

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

A study on the anti-tumor effects of mTOR inhibitor
in oral squamous cell carcinoma cells

Taisuke UEMURA

Division of Clinical Oral Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Oral cancer accounts for approximately 2–3% of all cancers, and 31.8% of head and neck cancers. More than 90% of malignant neoplasms of the oral cavity are squamous cell carcinomas of the lining mucosae. Despite extensive researches, the five-year survival rate of oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients has not been improved. Rapamycin, which targets mTOR (mammalian target of rapamycin), has currently drawn attention as an anti-cancer therapeutic strategy for various malignant tumors. Therefore, we investigated the anti-cancer effects of rapamycin in human OSCC cell lines. Anti-cancer effects of mTOR inhibitor, rapamycin, were evaluated in a panel of four OSCC cell lines (SAS, SAS-H1, SAS-L1, HSC4). Cells were exposed to rapamycin for 48 hours. Anti-proliferative effects were studied using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit. After treatment of rapamycin, the expressions of p21, p27, Bax and Bcl-2 were examined on quantitative RT-PCR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression was analysed using ELISA. We found that rapamycin exerts growth suppression and downregulates the expression of VEGF in OSCC cells *in vitro*. We also showed that rapamycin promoted apoptosis by up-regulating the proapoptotic molecules Bax and down-regulating Bcl-2. In addition, the expression of p21 and p27, which are associated with cell cycle arrest, is up-regulated by rapamycin treatment. Our findings demonstrate that rapamycin exerts anti-cancer effects on OSCC cells *in vitro* through multiple actions, including inhibition of proliferation, induction of apoptosis, cell cycle arrest and suppression of VEGF, suggesting that rapamycin might be worthy of clinical evaluation as an anti-cancer agent on OSCC.

Key words : Oral squamous cell carcinoma, mTOR, Rapamycin, VEGF, Apoptosis

抄 録

口腔癌は全癌の約2–3%, 頭頸部癌の31.8%を占める。口腔に発生する悪性腫瘍の90%以上は口腔粘膜に由来する扁平上皮癌である。広範な研究がなされているが、口腔癌患者の5年生存率は改善されていない。mTORを標的とするラパマイシンは現在、種々の悪性腫

瘍に対する抗癌治療戦略として関心を集めており、そのため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるラパマイシンの抗癌作用を検討した。mTOR阻害剤であるラパマイシンの抗癌作用は口腔扁平上皮癌細胞株であるSAS, SAS-H1, SAS-L1, HSC-4の4種を使用し、細胞に対するラパマイシン処理を48時間行った。ラパマイシン処理後の細胞増殖抑制作用の評価は、CyQUANT Cell Prolifera-

受付：平成23年3月30日

tion Assay Kitを使用し、癌細胞におけるp21, p27, Bax, Bcl-2の発現は定量的RT-PCRにて、VEGF発現はELISAを使用した。癌細胞に対するラパマイシンの使用は、細胞増殖抑制とVEGF発現の低下を引き起こすことが示され、また、Baxの発現上昇とBcl-2の発現低下を来すことから、癌細胞のアポトーシス促進を誘導する可能性が示唆された。さらに、CDKインヒビターであるp21, p27の発現上昇も観察され、これにより細胞周期の停止が引き起こされていると推察された。これらの結果から、口腔扁平上皮癌細胞に対するラパマイシン処理は、増殖抑制やアポトーシスの促進、細胞周期停止、VEGF発現低下などの抗癌作用を引き起こすと考えられ、口腔癌に対する抗癌剤としての可能性を有していると考えた。

緒 言

口腔癌は全癌の2-3%で、頭頸部癌の中では発生頻度が高く31.8%を占め、その組織型の約90%以上は扁平上皮癌である。近年、種々の悪性腫瘍において、分子標的治療薬の基礎研究、臨床導入により、治療効果の増強と予後の改善が認められている。mTOR (mammalian target of rapamycin) は分子標的治療薬のターゲットとして注目されている分子の一つで、細胞増殖や抗アポトーシス、血管新生などに関連している。PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) は癌抑制遺伝子であり、PI3K活性に抑制的に働き、PI3K-Akt-mTOR経路における活性調節の役割を担っている。そのため、PTEN遺伝子の変異や欠失による不活化は、PI3K-Akt-mTOR経路の活性化を引き起こすとされている。口腔扁平上皮癌におけるmTOR阻害による抗腫瘍効果や、PTEN発現状態との関連性を示す報告は少ないため、本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株と、mTOR阻害剤としてラパマイシンを使用して、1. 癌細胞におけるPTEN発現とmTOR活性、2. ラパマイシン添加によるmTORの活性変化、3. mTOR活性とPTEN発現の関連性、4. ラパマイシン添加による増殖抑制効果とmTOR活性程度の関連性、5. ラパマイシン添加による細胞周期、アポトーシス、腫瘍血管新生の関連因子への影響を検討することを目的として実験を行った。

材料および方法

用いた細胞は、口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, SAS-H1, SAS-L1, HSC-4) と正常ヒトケラチノサイト (NHK)、およびヒトケラチノサイト (HaCaT) であり、37℃、5%CO₂の環境下で培養した。試薬はmTOR

阻害剤としてラパマイシンを用い、細胞に0, 10, 100, 1000nMの濃度で添加し48時間培養した。細胞増殖アッセイは、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kitを用い、Microplate-readerにて測定した。各細胞株におけるvascular endothelial growth factor (VEGF), cyclin D1, cyclin D3, cyclin E, CDK2, CDK4の発現はRT-PCRで、PTEN, p21, p27, Bax, Bcl-2, HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) の発現は定量的RT-PCRで評価した。mTORおよびリン酸化mTOR蛋白の発現はウェスタンブロット法にて評価した。各細胞株にラパマイシンを添加した時の培養上清におけるVEGF蛋白の変化はELISAにて測定した。統計分析は、Tukey's testを伴うANOVA検定を用いた。検定において、p値が0.05以下のとき、統計学的有意差ありと定義した。

結果および考察

1. 口腔扁平上皮癌細胞におけるPTEN発現とmTOR活性

いずれの口腔扁平上皮癌細胞においてもNHKに比べてPTEN mRNAの発現低下と、リン酸化mTOR蛋白の発現亢進がみられた。口腔扁平上皮癌細胞においてもPTENの不活化に伴いmTOR上流のAktや、その下流分子S6Kなどのリン酸化を含めたAkt-mTOR経路が活性化している可能性が示唆された。

2. 口腔扁平上皮癌細胞に対するラパマイシンによるmTORの活性変化

いずれの細胞株においても、ラパマイシン10nMの濃度より、濃度依存的にリン酸化mTOR蛋白の発現低下が認められた。

3. 口腔扁平上皮癌細胞におけるmTOR活性とPTEN mRNA発現の関連性

リン酸化mTOR蛋白の発現が高い細胞では、PTEN mRNAの発現がより低下しているかを検討したところ、リン酸化mTOR蛋白はSASとSAS-H1に比較して、SAS-L1とHSC-4では発現が高かったが、リン酸化mTOR高発現細胞 (SAS-L1, HSC-4) と低発現細胞 (SAS, SAS-L1) とでPTEN mRNAの発現量を比較すると、リン酸化mTOR高発現細胞は低発現細胞に比べて、PTEN mRNAの発現量は高かった。

4. 口腔扁平上皮癌細胞に対するラパマイシンによる増殖抑制効果とmTOR活性程度の関連性

SAS-L1とHSC-4はラパマイシン10nMより、SASとSAS-H1は1000nMで増殖抑制効果が認められ、リン酸化mTOR低発現細胞 (SAS, SAS-H1) に対して、高発現細胞 (SAS-L1, HSC-4) は、10nMと100nMに

においても増殖抑制を示した。そのため、Akt-mTOR経路の活性程度が高い細胞ほど、低濃度での増殖抑制効果が期待でき、ラパマイシンにより高感受性であることが推察される。

5. 口腔扁平上皮癌細胞に対するラパマイシンによる細胞周期、アポトーシス、血管新生の関連因子の発現変化
1) 細胞周期関連因子

cyclin D 1, cyclin D 3, CDK 4, cyclin Eは、いずれの細胞株においても明らかな発現の変化はみられなかったが、CDK 2は発現の低下が、p21とp27は発現の上昇が観察された。ラパマイシンの添加は、CDKインヒビターであるp21とp27によるCDK 2の発現減少を介して、細胞周期のS期移行停止に関与する可能性が考えられた。

2) アポトーシス関連因子

ミトコンドリアの膜透過性亢進に直接関わりアポトーシス促進にはたらくBaxの発現上昇と、アポトーシス抑制にはたらくBcl-2の発現低下が観察された。

そのため、ラパマイシンは癌細胞のアポトーシス誘導を促進する可能性が示唆された。

3) 血管新生関連因子

ラパマイシン添加により、腫瘍細胞が産生し血管新生の中心的役割を担うVEGFおよび、その発現調節に関連するHIF-1 α の発現低下が認められた。したがって、ラパマイシンはVEGF発現低下を介して血管新生抑制に関与する可能性が示唆された。

結 論

以上の結果から、口腔扁平上皮癌細胞でもPTEN遺伝子の発現抑制と、それに伴うAkt-mTOR経路の活性化の惹起が考えられる。ラパマイシンによるmTOR活性の阻害は、p21およびp27の発現上昇とCDK 2の発現低下による細胞周期S期移行の抑制と、Baxの発現上昇とBcl-2の発現低下によるアポトーシス誘導の促進を介して、

癌細胞の増殖抑制を引き起こすことが示唆された。しかし、SAS-H 1とSAS-L 1では、アポトーシス関連因子の発現変化が認められなかったことから、それらの増殖抑制には、アポトーシス誘導作用よりもG 1-S期移行停止作用の方がより強く関連していると考えられる。今回、mTOR活性の程度とPTEN発現量の間に関連性はみられなかったが、mTORの活性程度の高い癌細胞ほど、薬剤に関して高感受性であった。また、mTOR活性の阻害により、HIF-1 α の発現低下を介したVEGFの産生低下が認められ、腫瘍内血管密度の減少や転移の抑制を引き起こす可能性が示唆された。



植村 太輔

平成17年 北海道医療大学歯学部卒業

札幌医科大学口腔外科研修医

平成18年 北海道医療大学臨床口腔病理学分野研究生

平成19年 北海道医療大学大学院入学