Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-07-15

Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicityinduced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU) in human…

田中, 一寛

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2007-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲4047

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004047

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 153 】

氏　　名・（本　籍）	田中　一寛	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第1851号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成19年3月25日	

【 学位論文題目 】

Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicity induced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU) in human U251 malignant glioma cells
（特異的mTOR阻害剤ラパマイシンはU251悪性グリオーマ細胞に対するアルキル化剤ACNUの細胞毒性効果を増強する）

審　査　委　員

主 査　教　授　丹生　健一
教　授　清野　　進
教　授　黒田　嘉和

はじめに

悪性グリオーマでは PTEN の変異や EGFR の増幅により、PI3K-Akt-mTOR(the mammalian target of Rapamycin)シグナル経路がしばしば活性化されている。近年、これらの経路は悪性グリオーマの細胞増殖やアポトーシスに重要な役割を示していると考えられている。我々は悪性グリオーマ細胞の治療において幅広く臨床応用されているアルキル化剤 ACNU と選択的 mTOR 阻害剤ラパマイシンとの併用効果について、悪性グリオーマ培養細胞およびヒト悪性グリオーマ細胞ラット脳内移植モデルを用いて検討した。

方法・結果

ヒト悪性グリオーマ細胞株（U251MG, U87MG）を使用し、WST-8 assay にてラパマイシンは細胞増殖抑制効果を示した(Figure 1A)。次に、FACScan による細胞周期測定ではラパマイシン 100nM 単独投与によって U251MG および U87MG 細胞ともに経時的に著明な G1 arrest を示し、subG1 population の増加はほとんどなかった(Figure 1B)。これらの結果から U251MG および U87MG 細胞に対するラパマイシン単独投与は細胞増殖抑制効果を示すが、細胞毒性効果をあまり示さなかった。さらに両培養腫瘍細胞株で、Western blot 法を用いての検討によりラパマイシンが mTOR 経路下流にある p70S6K および 4E-BP1 のリン酸化を阻害し、選択的に mTOR を阻害していることを確認した(Figure 1C)。次に U251MG 細胞を用いて、WST-8 assay で検討したところ、ACNU 単独投与(0.01-10 μ g/ml)に比べ、ラパマイシン 100nM との併用が有意に細胞増殖抑制効果の増強することが示された(Figure 2A)。また、Annexin V-FITC assay により ACNU 単独投与(10-40 μ g/ml)に比べ、ラパマイシン 100nM との併用が有意にアポトーシス誘導の増強することが示された(Figure 2B)。これらの実験結果から以後の実験においては ACNU 20 μ g/ml およびラパマイシン 100nM を使用し検討した。

U251MG 細胞に対する ACNU とラパマイシンとの併用による細胞毒性効果を検討するため、FACScan による細胞周期測定と TUNEL 染色法を行った。細胞周期測定では ACNU あるいはラパマイシン単独投与に比べ、その併用によって subG1 population が著明に増加した(ACNU and rapamycin: 26.32%, ACNU: 10.35%, rapamycin: 0.32%) (Figure 3A)。TUNEL 染色法でも ACNU あるいはラパマイシン単独投与に比べ、その併用によって TUNEL 染色陽性細胞が有意に増加した(ACNU and rapamycin: 18.5%, ACNU: 9.85%, rapamycin: 0.66%, no treat: 0.21%, *p=0.012) (Figure 3B)。以上の実験から U251MG 細胞においてラパマイシンが ACNU の細胞毒性効果を増強することが示唆された。

さらに、そのメカニズムについて過去の文献(Ref. 30)から PARP、p53、p21 蛋白に注目して Western blot 法を用いて解析した。ACNU とラパマイシンの併用により cleaved-PARP の発現増加が示された(Figure 3C)。またラパマイシン投与により p21 蛋白の著明な発現低下を認めたため、p21 蛋白の低下が U251MG 細胞の ACNU 感受性増強に関与する可能性が推測された(Figure 3C)。そこで、siRNA による p21 knock down と adenovirus vector による p21 over expression を U251MG 細胞で行い検討した。ACNU を投与した U251MG 細胞に対して p21 siRNA oligonucleotide を導入することで、subG1 population が著明に増加し(p21 siRNA: 27.04%, non-transfection: 12.98%, LacZ siRNA: 16.22%) (Figure 4A)、cleaved-PARP の発現が増加した(Figure 4B)。さらに ACNU およびラパマイシンを投与した U251MG 細胞へのアデノウィルスを用いた p21 cDNA 導入により、subG1 population が著明に減少し(Ad5CMV-p21: 23.44%, non-transfection: 32.43%, Ad5CMV-Luc: 36.89%) (Figure 5B)、cleaved-PARP の発現が減少した(Figure 5C) 。これらの結果から、U251MG 細胞において p21 蛋白がラパマイシンによる ACNU 細胞毒性効果の増強に関与することが強く示唆された。

最後にヌードラットの脳内にU251MG細胞を移植し脳腫瘍モデルを作成し検討した。腫瘍組織の免疫化学的染色により、ラパマイシン投与動物で抗リン酸化 p70S6K 抗体陽性細胞の減少を認め、ラパマイシンがラット脳内でもmTOR阻害作用を示すことが確認された(Figure 6A)。さらにMIB-1(Ki-67)陽性細胞の統計学的有意な減少を認め、細胞増殖能抑制効果を確認した(Figure 6B)。またU251MG細胞ラット脳内移植モデルをコントロール群(n=5)、ACNU単独治療群(n=5)、ACNU+ラパマイシン併用群(n=4)の3群に分け、移植4日後より薬剤を腹腔内投与して生存期間を観察した。コントロール群およびACNU単独、ラパマイシン+ACNU併用群の平均生存期間はそれぞれ19.4、23.4、30.5日であり、統計学的に有意な生存期間の延長を認めた(*p=0.029, **p=0.031)(Figure 6D)。

考察

ラパマイシンと他の抗癌剤との併用効果については様々な報告がある。白血病細胞や子宮癌細胞において、ラパマイシンとエトポシドあるいはシスプラチンなどとの相乗効果が報告されており、今後も既存の薬剤との併用効果が期待されている。最近では再発悪性グリオーマに対して、EGFR 阻害薬とラパマイシン併用の効果を検討した臨床試験が実施され、ラパマイシン単独療法に比べて良好な結果が得られたことが報告された。今回の研究においてU251 悪性グリオーマ細胞に対してラパマイシンが ACNU の殺細胞効果を増強した結果から、ラパマイシンと ACNU との併用療法が悪性グリオーマ治療に有用となる可能性があると考えられた。

今回、我々の実験ではラパマイシン投与による p21 蛋白発現の低下がU251MG細胞の ACNU 感受性増強に関与する可能性が示唆された。これはヒト癌細胞がp21蛋白の欠損あるいは発現低下によってDNA傷害薬剤に対する感受性が増加し、p21蛋白の発現増加によって抵抗性を示す報告に一致する。ラパマイシンがp21蛋白発現を制御する機能やp21蛋白がDNA傷害薬剤に及ぼす影響については、今後検討する必要がある。

結論

選択的 mTOR 阻害剤ラパマイシン投与により U251 悪性グリオーマ細胞に対する ACNU の細胞毒性効果の増強を認めた。悪性グリオーマに対する従来の化学療法に加えて、ラパマイシンは新しい分子標的治療補助薬となりうる可能性があると思われた。

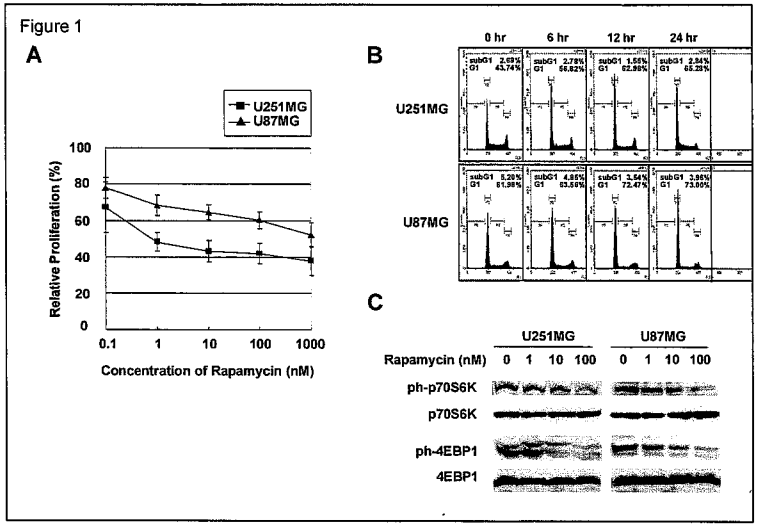

Figure 1

A) ラパマイシンの細胞増殖抑制効果 (WST-8 assay)

B) ラパマイシンによる細胞周期の停止 G1 arrest (FACScan)

C) ラパマイシンの選択的mTOR阻害 (p70S6Kおよび4EBP1のリン酸化阻害) (Western blot)

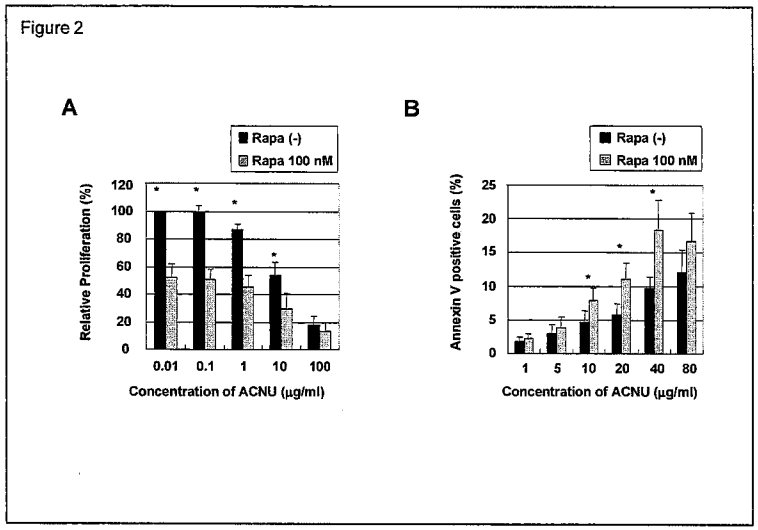

Figure 2

A) ACNUおよびラパマイシンの併用による細胞増殖抑制効果の増強 (WST-8 assay)

B) ACNUおよびラパマイシンの併用によるアポトーシス誘導効果の増強 (Annexin V-FITC assay)

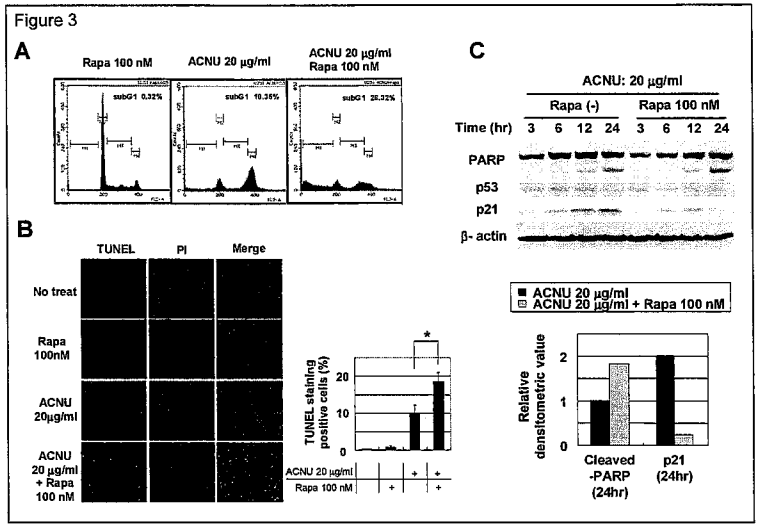

Figure 3

A) ACNUおよびラパマイシンの併用によるsub-G1 populationの増加 (FACScan)

B) ACNUおよびラパマイシンの併用によるTUNEL陽性細胞の増加 (TUNEL)

C) ACNUおよびラパマイシンの併用によるcleaved-PARPの発現増加、p21の発現低下 (Western blot)

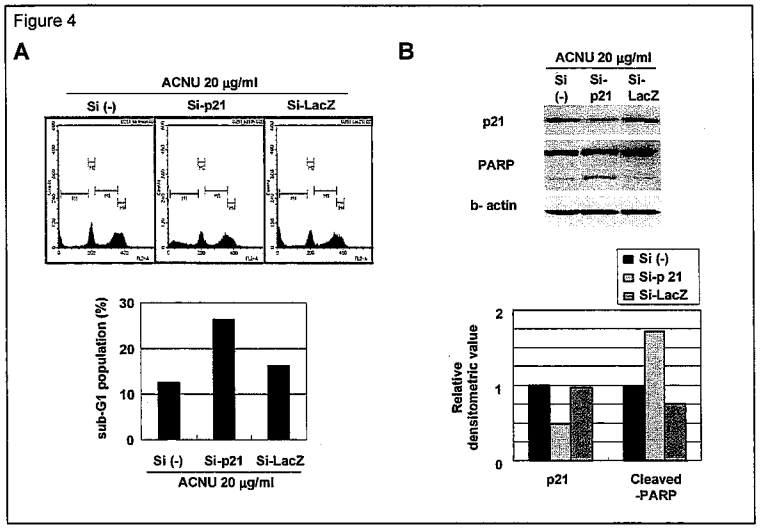

Figure 4

p21 siRNA oligonucleotideによるp21 knock down

A) p21 knock downによるsub-G1 populationの増加 (FACScan)

B) p21 knock downによるcleaved-PARPの発現増加 (Western blot)

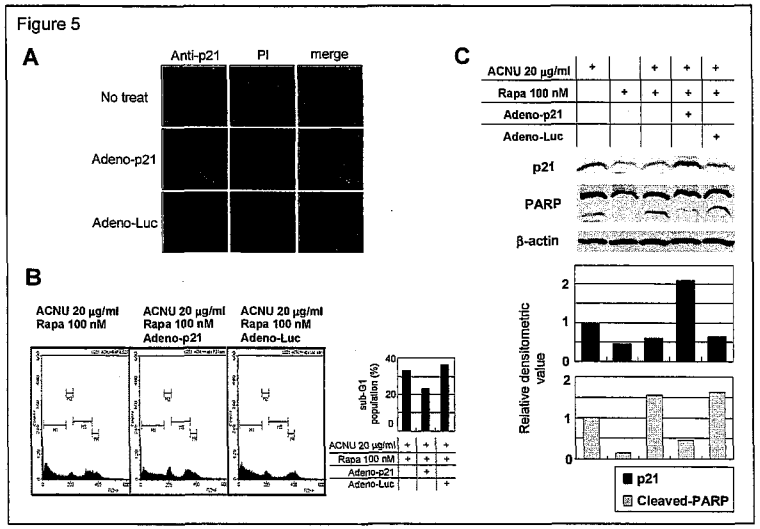

Figure 5

Adenovirusを用いたp21 cDNA 導入によるp21 over expression

A) p21蛋白発現の評価 (蛍光免疫化学的染色)

B) p21 over expressionによるsub-G1 populationの減少 (FACScan)

C) p21 over expressionによるcleaved-PARPの発現低下 (Western blot)

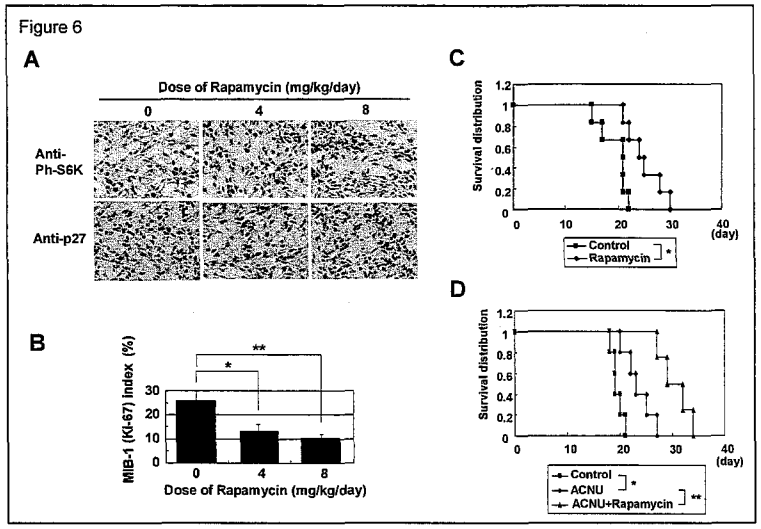

Figure 6

ヌードラットの脳内にU251MG細胞を移植した脳腫瘍モデル

A) ラット脳内でのラパマイシンの選択的mTOR阻害 (p70S6Kのリン酸化阻害)、細胞周期関連蛋白p27の発現増加 (免疫化学的染色)

B) ラット脳内でのラパマイシンの細胞増殖抑制効果 (MIB-1 (Ki-67) index)

C) ラパマイシン単独投与における生存期間の延長 (Kaplan-Meier曲線)

D) ACNUおよびラパマイシン併用による生存期間の延長 (Kaplan-Meier曲線)

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1853号	氏　名	田中　一寛
論文題目	Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicity induced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea(ACNU) in human U251 malignant glioma cells 特異的 mTOR 阻害剤ラパマイシンは U251 悪性グリオーマ細胞に対するアルキル化剤 ACNU の細胞毒性効果を増強する		
審査委員	主　査 丹生健一 副　査 溝口進 副　査 黒田嘉和		
審査終了日	平成　19年　4　月　18日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

はじめに

悪性グリオーマではEGFRの増幅やPTENの変異により、PI3K-Akt-mTOR (the mammalian target of rapamycin)シグナル経路がしばしば活性化されている。近年、これらの経路は悪性グリオーマの細胞増殖やアポトーシスに重要な役割を示していると考えられている。我々は悪性グリオーマ細胞の治療において幅広く臨床応用されているアルキル化剤ACNUと選択的mTOR阻害剤ラパマイシンとの併用効果について、悪性グリオーマ培養細胞およびヒト悪性グリオーマ細胞ラット脳内移植モデルを用いて検討した。

方　法

ヒト悪性グリオーマ細胞株（U251MG, U87MG）を使用した。細胞増殖能の評価には WST-8 assay を使用した。アポトーシスの評価には Annexin V-FITC assay、TUNEL 染色法、Western blot 法による Cleaved-PARP の発現量を使用した。細胞周期測定には FACScan を使用し、sub-G1 population を死細胞の評価に用いた。また、最後にヌードラットの脳内に U251MG 細胞を移植し脳腫瘍モデルを作成し検討した。

結　果

ヒト悪性グリオーマ細胞株（U251MG, U87MG）に対してラパマイシン単独投与は細胞増殖抑制効果を示すが、細胞毒性効果を示さなかった。また、ラパマイシンがmTOR経路下流にあるp70S6Kおよび4E-BP1のリン酸化を阻害し、選択的にmTORを阻害していることを確認した。

次に、U251MG細胞に対するACNUとラパマイシンとの併用による細胞毒性効果を検討し、ラパマイシンがACNUの細胞毒性効果を増強することが示唆された。そのメカニズムについて過去の文献から p21 蛋白に注目して解析を進めた。ACNUとラパマイシンの併用により cleaved-PARP の発現増加と共に p21 蛋白の著明な発現低下を認めた。この p21 蛋白の低下が U251MG 細胞の ACNU 感受性増強に関与する可能性が推測されたため、siRNA による p21

発現抑制と adenovirus vector による p21 過剰発現をそれぞれ U251MG 細胞に導入した。その結果、p21 発現抑制による ACNU の細胞毒性効果の増強を認めた。また、p21 過剰発現による ACNU およびラパマイシン併用の細胞毒性効果の抑制を認めた。これらの結果から、U251MG 細胞において p21 蛋白がラパマイシンによる ACNU 細胞毒性効果の増強に関与することが強く示唆された。

最後に、U251MG 細胞ヌードラット脳内移植モデルをコントロール群(n=5)、ACNU 単独治療群(n=5)、ACNU+ラパマイシン併用群(n=4)の 3 群に分け、移植 5 日後より薬剤を腹腔内投与して生存期間を観察した。コントロール群、ACNU 単独群、ラパマイシンおよび ACNU 併用群の平均生存期間はそれぞれ 19.4、23.4、30.5 日であり、統計学的に有意な生存期間の延長を認めた。

結　論

選択的 mTOR 阻害剤ラパマイシン投与により U251 悪性グリオーマ細胞に対する ACNU の細胞毒性効果の増強を認めた。悪性グリオーマに対する従来の化学療法に加えて、ラパマイシンは新しい分子標的治療補助薬となりうる可能性があると思われた。

本研究は悪性グリオーマ細胞に対する化学療法について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアルキル化剤 ACNU と選択的 mTOR 阻害剤ラパマイシンとの併用による細胞毒性効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。