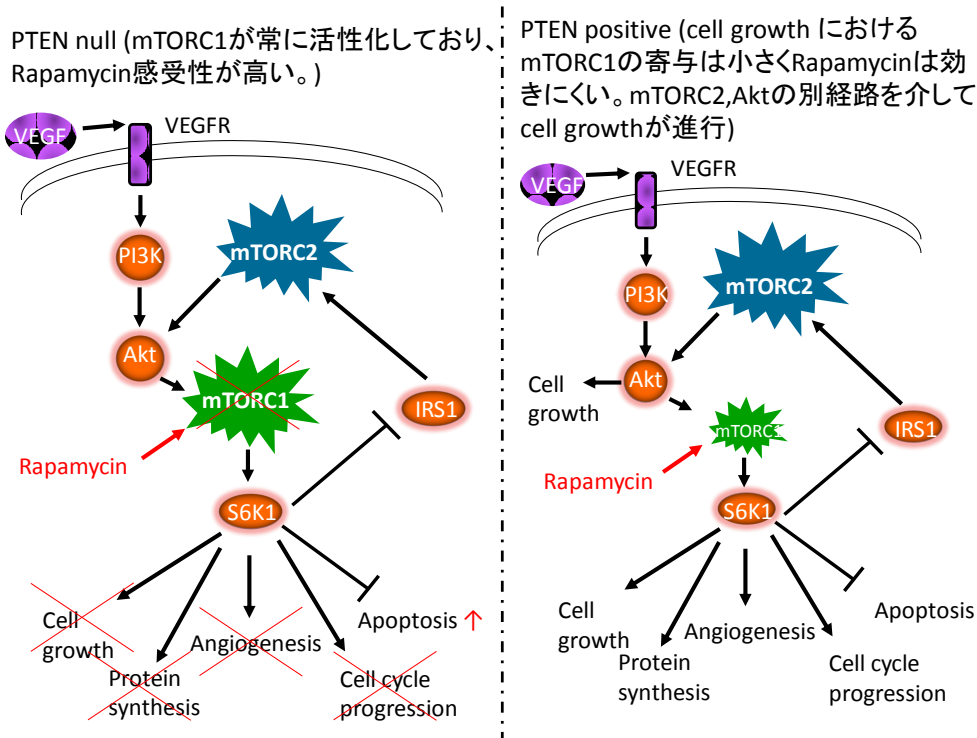


mTOR を標的とした腫瘍 RNA 干渉療法の開発

静岡県立大学 薬学部 6年 加藤寛己

Mammalian target of rapamycin (mTOR)はセリン・スレオニンキナーゼの一種であり、細胞外から vascular endothelial growth factor (VEGF) などの成長因子によって刺激されると、PIP₃や Akt を介して活性化される。活性化した mTOR は、細胞周期の進行、タンパク質合成、血管新生を促進し、一方でアポトーシスを抑制する。mTOR は二つの異なる複合体、mTOR complex 1 (mTORC1) あるいは mTOR complex 2 (mTORC2) を形成するが、マクロライド系抗生物質であるラパマイシンやその誘導体は、mTORC1 を特異的に阻害し、細胞周期を G1 期で停止させる。ところで、がん抑制遺伝子である PTEN は、PI3K/Akt/mTOR シグナリング経路を負に調節していることが知られている。PTEN の欠損は、多くのがんに見られ、PTEN 欠損細胞では PTEN 陽性細胞に比べラパマイシン感受性が高い。これは PTEN 欠損細胞では、mTORC1 が恒常的に活性化しているためであるが、対照的に PTEN 陽性細胞では mTORC1 がほとんど活性化されていないので、ラパマイシンは期待されるような効果を示さない（下図参照）。そのような背景の下、本研究では mTOR に対する small interfering RNA (siRNA) に着目した。RNA 干渉法による mTORC1、mTORC2 ノックダウンは、PTEN 欠損細胞のみならず、PTEN 陽性細胞に対しても増殖抑制を示すことが考えられ、有用ながん治療に繋がることを期待できる。



siRNA デリバリーのベクターとしては、本研究室にて開発された dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine (DCP-TEPA) を基盤としたポリカチオンリポソーム (TEPA-PCL) を用いた。生体内における安定性保持のために、ポリエチレングリコール

(PEG) をリポソーム表面に修飾し、さらに PEG の先端にがん細胞、および腫瘍新生血管へ集積性を示すペプチド Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) を結合した APRPG-PEG で、TEPA-PCL を修飾した (APRPG-TEPA-PCL)。APRPG は、VEGF receptor-1 (VEGFR-1) に対して高い結合能を示すことが明らかとなっている。

本研究では、PTEN 陽性、PTEN 欠損細胞を用い、mTOR ノックダウンが細胞増殖に及ぼす影響を検討した。ヒト前立腺がん細胞 (DU145、LNCaP)、ヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231、MDA-MB-468) 細胞における PTEN 発現をウエスタンブロットにより検出した結果、PTEN 陽性細胞として DU145 と MDA-MB-231 細胞を、PTEN 欠損細胞として LNCaP、MDA-MB-468 細胞を同定した。次に、これらの細胞を用いて mTOR ノックダウンによる細胞増殖試験を行った。ラパマイシン添加では、PTEN 欠損細胞においてのみ顕著な細胞増殖抑制効果を示したのに対し、mTOR に対する siRNA (simTOR) を添加した場合には PTEN の有無に関わらず、有意に細胞増殖を抑制した。この結果から、siRNA による mTOR ノックダウンは PTEN 陽性細胞のようにラパマイシンに対して感受性の低い細胞に対しても活性を示すことが示唆された。

次に、腫瘍新生血管ならびにがん細胞を標的とした RNA 干渉療法の有効性について評価するために、マウス内皮細胞様細胞である 2H-11 細胞、およびマウスメラノーマ細胞である B16F10 細胞を用いた検討を行った。両細胞において VEGFR-1 および PTEN の発現が認められ APRPG による標的が可能、かつラパマイシン抵抗性の細胞であることが示唆された。実際、両細胞において、ラパマイシンは細胞増殖抑制を示さなかったが、simTOR の処理においては、有意に細胞増殖を抑制した。また、simTOR 処理によって 2H-11 細胞の管腔形成能を顕著に阻害することが明らかになり、ラパマイシン処理では 2H-11 細胞の管腔形成能は阻害されなかった。以上の結果より、mTOR を標的とした APRPG-TEPA-PCL に基づく RNA 干渉の有用性が *in vitro* において示唆された。最後に、B16F10 細胞肺転移モデルマウスを用いたがん治療実験を行った。肺を摘出し、重量により治療効果を評価したところ、APRPG-TEPA-PCL/simTOR 投与群において、コントロール群に対して有意な腫瘍増殖抑制効果が観察され、その有用性が *in vivo* においても示唆された。

本研究では、mTOR に対する RNA 干渉療法の応用により、ラパマイシンに対して抵抗性を示す PTEN 陽性細胞の増殖を有意に抑制できることを明らかとした。さらに、B16F10 細胞の肺転移モデルマウスにおいて、simTOR をがん・新生血管標的化ベクターにより選択的に送達することで、高い治療効果が得られることを示した。本研究結果が、ラパマイシン抵抗性のがんにおける治療法、および siRNA 治療研究に有益な情報をもたらすことを期待する。

Inhibition of Akt (ser473) Phosphorylation and Rapamycin-Resistant Cell Growth by Knockdown of Mammalian Target of Rapamycin with Small Interfering RNA in Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1-Targeting Vector

Koide H, Asai T, Furuya K, Tsuzuku T, Kato H, Dewa T, Nango M, Maeda N, Oku N.
Biol Pharm Bull. 2011;34(5):602-8.