

新規 mTORC2 阻害剤の抗腫瘍作用の解明

愛知県がんセンター研究所

腫瘍制御学分野 研究員 上原了

愛知県がんセンター研究所

腫瘍制御学分野 分野長 小根山千歳

研究の背景・目的

mTOR は PI3K 経路下流に存在するセリン・スレオニンキナーゼで、二種類の複合体 (mTORC1、mTORC2) を形成する。mTORC1 は細胞の栄養状態や外部刺激に応答してタンパク質合成や細胞増殖に関与するシグナルを伝達し、mTORC2 は栄養状態非依存的に AKT シグナルを活性化させることでアポトーシスの抑制、代謝シフト、細胞骨格の制御に関与する。これらの mTOR シグナルは多くのがんにおいて亢進しており、mTORC1 と mTORC2 を標的とした分子標的薬の探索が進められている。mTORC1 選択的阻害剤はラパマイシンとその誘導体 (ラパログ) が知られているが、その奏効率は低く、免疫抑制による重篤な副作用が懸念される。また両複合体を非選択的に阻害するキナーゼ阻害剤も存在するが、mTORC2 を選択的に阻害する抗がん剤は未だ見つかっていない。mTORC2 活性はがん増殖を促進する一方で正常細胞における重要度は低く、mTORC2 の分子標的薬は既存の mTOR 阻害剤に対して薬効と副作用の両面で有望である。mTORC2 において mTOR は RICTOR、mLST8、mSIN1 などのアクセサリータンパク質と複合体を形成する。中でも RICTOR の発現は複数の癌腫で高く、RICTOR 発現量と mTORC2 活性は相関することが知られている^[1]。正常細胞では複数の miRNA が RICTOR の長い 3' UTR 配列に結合して発現を抑制するが、がんではこれらの miRNA の発現が低下しており、結果として RICTOR の発現が増加する^[2]。共同研究者の小根山らは RICTOR の 3' UTR 配列と融合したレポーターを発現する細胞株を用いて約 30,000 種類の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、RICTOR を顕著に減少させる化合物を発見した (化合物 N)。本化合物は RICTOR の mRNA 量を変化させずにタンパク質量のみを減少させるため、RICTOR の転写後調節機構に作用する新規の mTORC2 阻害剤であると考えられる。

研究の対象ならびに方法

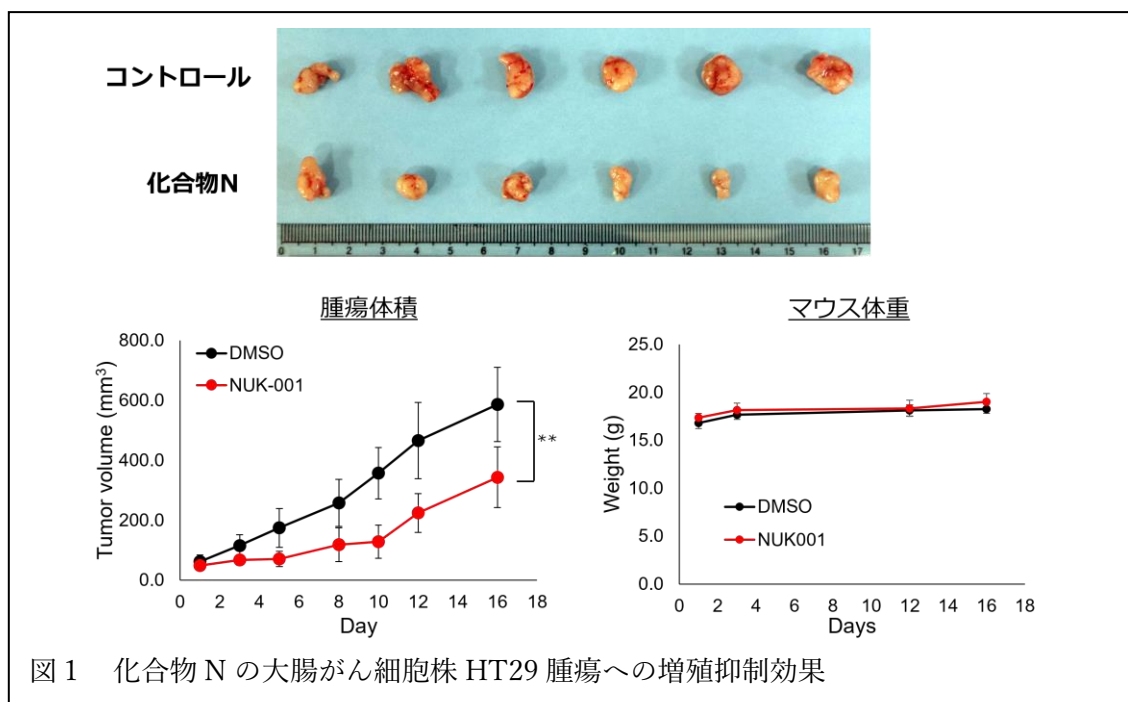
本研究では、RICTOR の発現を抑制する化合物 N の mTORC2 選択的抗がん剤としての有用性を検証する。最初に、化合物 N の抗腫瘍効果と毒性を検証するため RICTOR の発現量が高い大腸がん細胞株 HT29 を皮下移植したヌードマウスに化合物 N の腹腔内投与を行い、腫瘍体積と体重の経時変化を測定した。投与期間終了後にマウスを解剖し、腫瘍・心臓・肝臓・肺の組織標本を作製し化合物投与の影響を調べた。

化合物 N の結合分子として RNA ヘリカーゼ (RNH) が同定されている。研究代表者は RNH が 3' UTR に結合して RICTOR の発現を調節しており、この機能は化合物 N によって阻害されると考えた。この仮説を検証するために、RNH をノックダウンや過剰発現した際に RICTOR の発現が変化するかを調べた。また RNH 抗体を用いて mRNA の免疫沈降を行い、沈降した mRNA に RICTOR が含まれるかを RT-qPCR によって調査した。

研究結果

(1) 化合物 N の抗腫瘍効果

6 匹のヌードマウスに対して 3×10^6 個の大腸がん細胞 HT29 を皮下移植し、腫瘍体積が 100 mm^3 に達する直前に 50 mg/kg の化合物 N の腹腔内投与を開始した。投与は 2 日に 1 度の間隔で約 2 週間実施し、期間中の腫瘍体積とマウスの体重変化を測定した (図 1)。その結果、化合物 N の投与によって腫瘍体積は顕著に減少し、一方でマ



ウスの体重は投与期間中ほとんど変化しなかった。腫瘍摘出後にマウスの主要臓器の組織切片を作製して確認したところ、目立った異常は観察されなかった。

(2) RNH による RICTOR 発現制御の解析

大腸がん細胞 HT29 および HCT116 において RNH を siRNA を用いてノックダウンすると RICTOR のタンパク質量が減少した。一方、プラスミドベクターを用いた RNH の過剰発現で RICTOR のタンパク質量は増加した。さらに RNH をノックダウンした細胞で siRNA 耐性の RNH を一過性発現させると、RNH と RICTOR の発現がレスキューされた。以上から、RNH と RICTOR の発現量の間には正の相関があることが明らかとなった。RNH 抗体を用いた免疫沈降では、沈降させた mRNA の RICTOR の割合は沈降前と比べて増加しており、RNH が RICTOR の mRNA に結合することが示唆された。

考察

本課題の研究成果により、化合物 N は RICTOR の発現が高いがんの腫瘍増殖を顕著に抑制する効果があることがマウスモデルで実証された。さらに投与による有害事象が観察されなかったことから本化合物は低毒性の mTORC2 選択的阻害剤であると期待される。RNH と RICTOR の発現量の間には正の相関が見られ、RNH が RICTOR の mRNA と相互作用していることから、RNH は mRNA に結合して RICTOR の発現を促進する新たな制御因子であることが示唆される。今後 RNH が RICTOR の発現を制御する詳細な分子機構を明らかにすることで、化合物 N の作用機序を解明し、mTORC2 阻害剤として実用化が進むことが期待される。

文献

1. Zhao D, Jiang M, Zhang X, Hou H. The role of RICTOR amplification in targeted therapy and drug resistance. *Mol. Med.* 26(1):20. 2020.
2. Gkoutakos A, Pilotto S, Mafficini A, Vicentini C, Simbolo M, Milella M, Tortora G, Scarpa A, Bria E, Corbo V. Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex. *Carcinogenesis* 39(8):971-980. 2018.