

課題番号 34

# Rapamycin 耐性腫瘍細胞株における合成致死遺伝子の探索

## [1] 組織

代表者：小林 敏之  
 (順天堂大学医学研究科)

対応者：塩野 雅俊  
 (東北大学加齢医学研究所)

分担者：石岡 千加史  
 (東北大学加齢医学研究所)

加藤 俊介  
 (順天堂大学医学研究科)

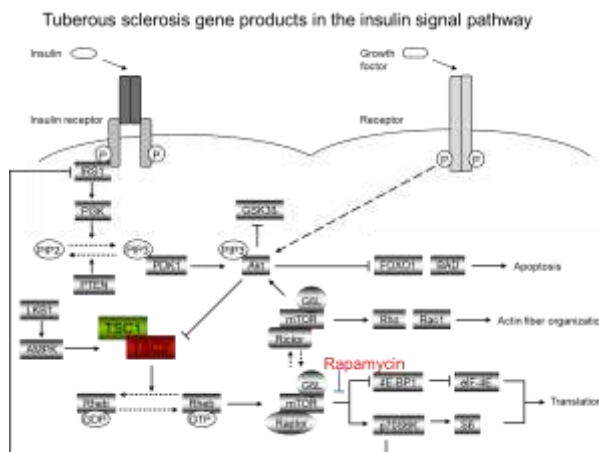
研究費：物件費 199,816 円

## [2] 研究経過

PI3K-AKT-mTOR 経路は細胞の生存・増殖に重要なシグナル伝達経路であり(図 1)、mTOR 阻害剤 Rapamycin は抗腫瘍効果を持つ為、その類縁物質が臨床で様々な癌種に用いられ始めている。しかしその効果は限定的であり、必ず耐性を示す。例えば遺伝的な *Tsc2* 機能欠損に起因する (mTOR 経路への依存度が極めて高い) 結節性硬化症(Tuberous Sclerosis: TS)患者が発症する脳室上衣下巨大細胞性星状細胞腫において、近年の臨床試験では 35%の患者で 50%以上の縮小率を示す事が報告された (Krueger DA *et al*, N Engl J Med. 4:363:1801-11. 2010)。これは抗腫瘍薬としては高い奏効率を示すと言えるが、逆に言うと、そのように極めて選別化された対象においても 65%の患者では Rapamycin 単剤のみでは効果は限定的であった、という事実を示しているとも言える。従って *Tsc2* 機能欠損に立脚するヒト腫瘍においても、mTOR 以外の重要な経路が存在する可能性が想定され、その経路同定による新規併用薬の開発、理想的には「mTOR 阻害剤耐性腫瘍細胞特異的な合成致死」を誘導する薬剤の開発が望まれる。本研究では *Tsc2* ノックアウトマウス由来腫瘍細胞 (MKOC1-277) の Rapamycin 処理により耐性腫瘍細胞株を作出し、その細胞で機能亢進/減弱している経路を同定し、合成致死に関連する遺伝子群を探索し、新規治療薬開発へ繋げる事を目的とする。以下に研究活動状況概要を記す。

1. 至適 Rapamycin 濃度の決定
2. Rapamycin 処理による耐性細胞株の樹立
3. 同細胞を素材とした種々の網羅的分子生物学的解析 (Reverse Phase Protein Array 解析、In Cell Western Assay 等) による耐性機序の解明

4. 候補経路の阻害剤を用いた *in vitro* での合成致死効果の探索
  5. ノードマウス移植系における、Rapamycin 及び候補阻害剤投与による腫瘍縮小効果の確認
  6. mTOR 阻害剤治療後に耐性を示したヒト臨床検体での候補経路の機能亢進/減弱等の確認・検証
- 【研究打ち合わせの開催状況】 2013/6/17 (東京)、10/3 (横浜)、2014/1/9 (福島)、2/3 (東京)
- 【図 1】



## [3] 成果

### (3-1) 研究成果

近年、大腸癌等で用いられる分子標的治療薬である抗 EGFR 抗体薬 Cetuximab の耐性機序に関し、同薬を感受性腫瘍細胞株に投与し続けることで耐性細胞株を作出し、その細胞を利用した解析によって耐性獲得機構の一端を解明するという報告がなされた (Montagut C *et al*, Nat Med. 22:18(2):221-3. 2012)。研究者らのグループは上述の MKOC1-277 細胞株を有し、この細胞は実際にノードマウスで Xenograft 腫瘍を形成し、そして Rapamycin 投与にて退縮する事、を確認している (Kobayashi T *et al*, Proc. Japan Acad, 79B, 22, 2003)。そこで研究者らは MKOC1-277 細胞に Rapamycin を継続投与する事で耐性株を作出し、Rapamycin 耐性獲得機構を明らかにする事を目指している。本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) 至適 Rapamycin 濃度の決定 : Rapamycin は細胞周期における「G1 期停止/S 期移行阻止」を誘導する事で細胞増殖抑制効果を示す事が知られている (Brown E.J. *et al*. Nature 369, 756, 1994)。その

機序の一つとしての PI3K-AKT-mTOR 経路(図1)における mTOR-p70S6K の不活性化には 20nM で充分であり(Jeffries H.B.J. *et al.* EMBO Journal, 16, 3693,1997)、現在、同経路の阻害剤としては、それがルーチンの使用濃度となっている。そこで MKOC1-277 細胞及び HEK293T 細胞、各々に 20nM を開始濃度として、200nM, 2 $\mu$ M, 20 $\mu$ M と 1000 倍まで濃度を振って投与し、陰性コントロールと growth arrest や細胞死の程度を比較した。結果、20 $\mu$ M では MKOC1-277 細胞、HEK293T 細胞共にかなりの細胞死がみられた。しかしこれは通常ルーチンで使用される濃度よりも 1000 倍濃い濃度であり、細胞死の形態学的特徴やその早さ等からは、非特異的な細胞死であると考えられた。そこで次に 20 $\mu$ M 以下で更に細かく濃度を振り、5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M で検討した。結果、5 $\mu$ M では cytostatic な作用(増殖抑制)がみられ、10 $\mu$ M では cytostatic(増殖抑制)+cytotoxic(細胞死)、15 $\mu$ M 以上では cytotoxic(20 $\mu$ M 同様な非特異的細胞死)な作用がみられた。Rapamycin の作用機序を考えると cytotoxic ではなく cytostatic なものが主である為、cytostatic な濃度である 5 $\mu$ M、及び cytotoxic な作用もみられる 10 $\mu$ M の、双方の濃度でのセレクションを実施した。

(2)継続的 Rapamycin 処理による耐性細胞株の樹立: 上記条件決定に基づき、そのような条件下でも growth を示すようになってきたコロニーを Rapamycin 耐性獲得コロニーと判断し、分離培養し、解析に供する予定とした。10cm シャーレに MKOC1-277 細胞、HEK293T 細胞(TSC2 機能欠損が無く、腫瘍形成能の無いコントロール細胞株)を低密度に培養し、至適濃度にて 3 ヶ月間細胞を Rapamycin 処理し続けた。途中、培養のトラブルを原因として、本年度では時間的制約によりこの段階で留まっているが、今後、上述の 3.~(6)の解析へと発展させていく予定である。

### (3-2)波及効果と発展性など

本共同研究における共同研究者らは 2008 年から共同で論文を継続的に執筆してきており、本年度も 2014 年 3 月に下記[4]-(2)にあるように関連英文論文を投稿したところであり、着実に成果を上げる発展性が見込まれる。本共同研究分野は、例えば BRCA 変異原性乳がん細胞における PARP 阻害剤の合成致死作用(FL Rehman *et al.*, Nat Rev Clin Oncol. 7(12):718-24, 2010)に代表されるように、「正常細胞への副作用を最小限に留めながらの腫瘍細胞特異的細胞死の誘導」を可能にする点で多大なインパクトを与える領域である。本共同研究の関連文献として

は近年、PI3K/mTOR dual inhibitor と Bcl-2 inhibitor の併用が synergism を示すことが報告されたが(Cancer Cell 21,227-239, Feb14, 2012)、この論文では合成致死という観点での言及はない為、本共同研究がもたらす結果は独創的なものになるといえる。その知見は、(1)TS 患者においては、根治に近づくことのできる新療法、(2)種々の固形癌患者においては、mTOR 阻害剤に耐性を示した場合の救済治療、またはその前の段階であっても奏効率の高い併用療法、として、広く大きな恩恵をもたらす可能性が期待される。

### [4] 成果資料

#### 【論文発表】

(1) Okura H, Kobayashi T, Koike M, Ohsawa M, Zhang D, Arai H, Uchiyama Y, Hino O. Tuberin activates and controls the distribution of Rac1 via association with p62 and ubiquitin through mTORC1 signaling pathway. Int J Oncol 43:447-56 (2013)

(2) Shiono M, Kobayashi T, Takahashi R, Abe M, Tada N, Ueda M, Ishioka C, Hino O. Transgenic expression of N525S-type tuberin variant in Tsc2 mutant (Eker) rats brings dominant embryonic lethality [submitted]

#### 【学会発表】

(1) 小橋(張)丹青、小林敏之、樋野興夫: Tsc2KO マウス腎腫瘍における Erc/mesothelin とインテグリン $\beta$ 1 シグナル伝達関連の解明、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月、横浜

(2) 河野春奈、伊藤敬孝、高井節夫、新井 一、堀江重郎、小林敏之、樋野興夫: Eker ラット ES 細胞、iPS 細胞による腎癌発生メカニズムの解明 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月、横浜

(3) 塩野雅俊、小林敏之、樋野興夫、石岡千加史: トランスジェニック Tsc2 変異(Eker)ラットにおける N535S 置換型変異 Tsc2 発現及びその優性抑制的胎生致死作用、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月、横浜

(4) 伊藤敬孝、河野春奈、金井富三夫、中村衣里、多田昇弘、新井 一、小林敏之、樋野興夫: Tsc2 欠損型ラット ES 細胞を用いた病態発生の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸

(5) 相沢有美 小林謙一 鈴木司 松井芳光 小林敏之 樋野興夫 白井智美 山本祐司: 結節性硬化症モデル Eker ラットを用いた Tsc2 片アレル変異が代謝に及ぼす影響の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸