

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19790966
 研究課題名 (和文) 肺癌における分子標的治療の研究 (siRNAを用いたmTORの抑制)
 研究課題名 (英文) Molecular targeting therapy as novel non-small cell lung carcinoma treatment (siRNA (mTOR))
 研究代表者 松原 寛知 (HIROCHIKA MATSUBARA)
 山梨大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00374166

研究成果の概要：

In vivo においては、当初の予定通りに、肺癌細胞を用いて、siRNA (mTOR) を用いて、癌細胞の増殖能、移動能を抑制し、アポトーシスを引き起こすことを証明できた。しかし、ラットを使用した in vitro の実験においては、コントロール群と siRNA (mTOR) の治療群において、両差に腫瘍径、アポトーシス等に差を認めなかった。このことは、生体内における RNAi の transfection において何らかの問題があったのではないかと推測される。引き続き、生体での transfection の条件についていろいろと検討し、さらなる実験を行っていく予定である。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-------------|-----------|-------------|
| 2007 年度 | 2,200,000 円 | 0 円 | 2,200,000 円 |
| 2008 年度 | 1,100,000 円 | 330,000 円 | 1,430,000 円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 円 | 330,000 円 | 3,630,000 円 |

研究分野：外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：原発性肺癌・mTOR・siRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌治療においてゲフィチニブなどの分子標的治療薬が臨床において用いられているが、効果に比べ副作用がまだ強く、臨床応用に一般的問題点が残されている。そこで、我々は副

作用が少なく、新しい分子標的治療になりえるものを考えた。まず第一に、ラパマイシン (シロリムス) の抗癌作用に着目した。もともとラパマイシンは、マクロライド系抗生物質の一つであったが、1990 年になり、免疫抑制剤

として再認識されるようになった。最近になり、抗癌剤として癌細胞の apoptosis を引き起こすことがわかり、脚光を浴びるようになってきた。その作用機序としては、ラパマイシンが **mammalian Target of Rapamycin** (以下 **mTOR**) と呼ばれる細胞室内に存在する蛋白質に結合し、**mTOR** の機能を抑制することにより、癌細胞の増殖を抑制し、**apoptosis** を引き起こすことが知られている。我々のこれまでの実験でも、ヒト肺癌細胞株 (RERF-LC-AI) を用いて、in vitro でラパマイシンが、細胞増殖を抑制することを確認した。ラパマイシンはこのように癌細胞において細胞内の **mTOR** を介するシグナル伝達系を抑制することにより、分子標的治療への新しい治療として有用と考えられている。

しかし、その一方でラパマイシンを全身投与する副作用の心配がある。アメリカでは、すでに免疫抑制剤としてラパマイシンの内服が FDA より許可されており、長期内服で重篤な腎、肝障害が報告されている。われわれは、その副作用を予防する手段として、ラパマイシンの作用蛋白である、**mTOR** を **RNA interference**(以下 **RNAi**) 法によって抑制する方法を計画した。

RNAi 法は簡便で、短期間で機能解析ができる利点がある。さらに **short interference** (以下 **siRNA**) は分子量が非常に小さく (21bp~23bp)、特異的にある蛋白を抑制する。非常に低濃度で効果を得ることができ、副作用もほとんどない。さらに mRNA を破壊することによって遺伝子を抑制するのでゲノム遺伝子に影響をあたえず、遺伝的性質が保持するためヒトでの臨床応用を考えた場合有用であると考えられる。

ラパマイシンの標的蛋白である **mTOR** に対して **siRNA** を用いて、**mTOR** を特異的に抑制すれば、ラパマイシンと同様に癌細胞に **apoptosis** を引き起こし、癌細胞における新しい分子標的治療の一つになるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

この研究の目的は、肺癌治療において副作用の少ないラパマイシンの標的蛋白である **mTOR** に対して **siRNA** を用いて、細胞内の **mTOR** を抑制することで、細胞膜からの **PI3K** の末梢をブロックすることで、癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞に **apoptosis** を起こし、さらには移動能を抑制することにより、細胞の成長を止めるという仮説を証明することである。そこで、われわれは、その副作用を予防して尚且つ、ラパマイシンの作用蛋白である、**mTOR** を分子的な手法 (**siRNA**) をもちいることによって抑制する方法を計画した。

3. 研究の方法

材料および方法：細胞株はヒト肺扁平上皮癌細胞株；RERF-LC-AI を用いた。Si RNA (**mTOR**) は、Cell signaling 社製と transfection reagent として Lipofectamine TM2000 を用いた。

まずは、肺癌細胞に Si RNA (**mTOR**) が transfection されるかどうかを調べる事にする。その結果、transfection されることが確認できた場合、まず in vivo での実験を施行する。抗腫瘍効果の判定としては、増殖能と Apoptosis と遊走能について調べることにした。コントロール群 (C 群) と、RNAi 群 (I 群) とにわけてそれぞれ評価した。

(1) 増殖能の評価；6 well の culture plates に 5×10^4 cells/well で細胞を蒔き、インキュベートした後に C 群と I 群の細胞数をヘモサイトメーターを用いてカウントする。

(2) Apoptosis の評価；CELL DEATH DETECTION ELISA キット (Rosche 社) を用いて C 群、I 群について測定した。細胞が apoptosis に陥った後に、細胞質に出現するヒストン/DNA 断片複合体の吸光度を測定することで評価する。

(3) 遊走能の評価；Boyden 24-well microchemotaxis chamber を用いて、膜の表面に C 群、I 群の細胞を蒔き、これがどのぐらい膜を通過するかを 8 時間後にカウントする。

これらの In vivo の実験によって、癌細胞の成長の抑制が証明された後に、ヌードラットによる肺癌リンパ節転移モデルを用いて、in vitro で証明することにした。

腫瘍に siRNA(mTOR)を局注した群としないコントロール群を 2~3 週間後に比較する。比較項目としては、

①腫瘍の大きさ：原発巣および、転移リンパ節に対して腫瘍の最大径で肉眼的に評価する。

②組織学的評価：腫瘍の最大断面で標本を作り、組織学的に腫瘍が壊死しているかどうかを両群で検討する。

③Apoptosis の評価：摘出した組織標本に、免疫染色 TUNEL 法を施行し、実際に apoptosis が起きているかを評価する。

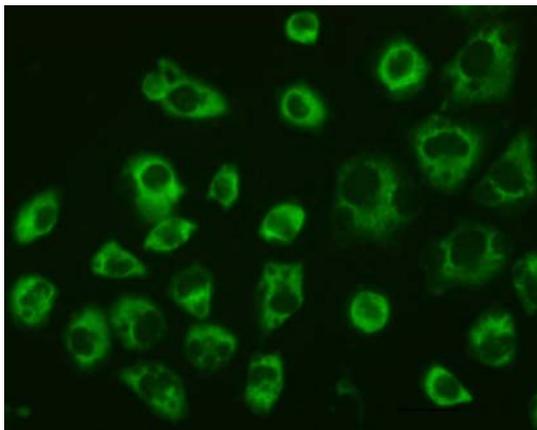
以上により、in vitro においても、siRNA を用いて、mTOR を特異的に抑制することで、癌細胞に apoptosis を引き起こし、癌細胞における新しい分子標的治療の一つになることを証明する。

4. 研究成果

まず、肺癌細胞において、免疫学的に細胞内の mTOR 蛋白が減少していることが証明できた。

つまり、Figure2 の C 群の細胞内は濃く染まっているが、Figure3 の I 群ではこれらがあまり染まっていないことからわかる。さらに、PCR を施行したところ、C 群に比べて、I 群で mTOR 蛋白が減少していた。よって、in vivo においては、siRNA (mTOR) が transfection されたことが証明された。

Figure2 Control 群

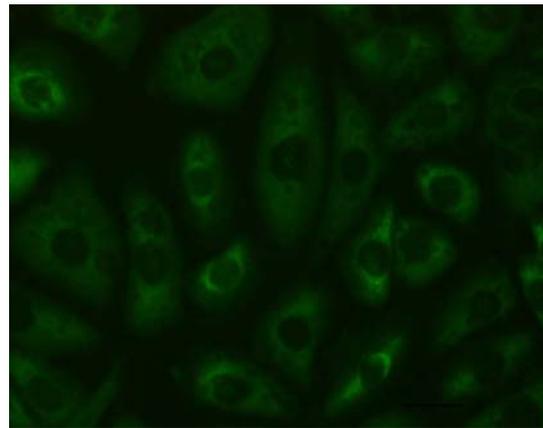


増殖能については、48 時間後の細胞数は、C 群 ($151.1 \pm 8.6 \times 1$ 万)、I 群 ($94.7 \pm 3 \times 1$

万) であった。コントロール群と比較して、RNAi 群において有意に細胞数が減少していることが確認した。(p < 0.01)

Apoptosis についても、吸光度は C 群 (1.0 ± 0.168) に対して、I 群 (1.186 ± 0.169) で、吸光度が高いほど、ヒストン/DNA 断片複合体が多く、Apoptosis が起こっていると考えられる。つまり、C 群と I 群を比較して、RNAi 群が有意に Apoptosis を引き起こしていることが確認できた。

Figure3 RNAi 群



遊走能については、膜を通過した細胞が C 群が 100 に対して I 群が 75 と (p < 0.05) と有意に遊走能を抑制していた。

以上より in vivo では、mTOR を siRNA (mTOR) を用いて、抑制することが証明できた。

しかし、in vitro においては、コントロール群と治療群において、腫瘍の大きさ、組織学的な壊死組織の割合、アポトーシスが引き起こされているかどうかについて、コントロール群と siRNA 治療群とに有意な差を認めなかった。

これは、生体内では、siRNA (mTOR) がうまく transfection されないことによるのではないかと考えられる。

今後は、transfection の条件をいろいろと変えていくことで、生体内における siRNA (mTOR) が成着した癌細胞の細胞質内にとりこまれる条件を見つけることが課題と考える。

今後、これらを中心に、さらなる実験を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

松原 寛知

RNA 干渉を用いた mTOR の抑制による非小細胞肺癌細胞の細胞成長阻害の検討

日本外科学会

2008 年 5 月 15 日

長崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 寛知 (HIROCHIKA MATSUBARA)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00374166

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし