

## Chronopharmacological study of mTOR signaling

岡崎, 裕之

<https://hdl.handle.net/2324/1441168>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（薬学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（4）

氏名	岡崎 裕之
論文名	Chronopharmacological study of mTOR signaling (mTOR シグナルの時間薬理学的研究)

## 論文審査の結果の要旨

多くの植物、動物には体内時計が存在することが知られている。哺乳動物では、体内時計は、時計遺伝子と呼ばれるある種の転写因子群が転写促進・翻訳・自己転写の抑制、のサイクルを繰り返すフィードバック機構を示すことで制御されており、これら遺伝子群の時刻依存的な転写活性化あるいは転写抑制を受けることが、体内の様々な生理機能に約 24 時間周期の変動を生じさせる主な原因と考えられている。

がんは現代日本人の死因第一位であり、末期には患者の QOL 低下も著しい難治性の疾患である。外科的切除・放射線療法に加えて薬物による化学療法が行われているが、しばしば治療抵抗性や副作用が問題となることから、効率的な治療法の確立や新薬の開発が望まれている。こうした中で、mTOR と呼ばれるキナーゼの一種が、近年がんの新たな治療標的として注目されてきている。mTOR は正常組織・腫瘍組織において様々な生体機能を制御することが知られており、この活性を阻害する everolimus などの薬剤が抗がん剤として利用されている。その一方で、mTOR の活性のリズムや薬効の時刻依存性、及び mTOR 阻害剤に対する治療抵抗性の原因など未知の領域が多いのが現状である。

本研究では、まず腎細胞がん移植マウスを用いて mTOR 阻害剤である everolimus の時間薬理学的検討を行った。また移植腫瘍中の mTOR 日周リズムの制御メカニズムを解明した。一方で、mTOR シグナルは正常組織においても様々な生体機能を制御していることから、次に正常肝臓における mTOR 日周リズム制御機構について腫瘍との比較を行いながら検討した。

近年の体内時計の研究によって、薬物の輸送や代謝に関わる因子、さらには薬物の標的となる因子の発現・活性に日周リズムが存在しており、薬物に対する感受性が投与時刻により変化し得ることが明らかとなってきている。Everolimus は、mTOR と呼ばれる因子のリン酸化活性を抑制し、その下流に位置する細胞周期制御因子などの様々なタンパク質の発現・活性を変容させることで増殖抑制効果を示す。Everolimus は新たな作用機序の抗がん剤であることと、その高い忍容性から他剤との併用療法を含め研究が行われているが、奏効率が低い場合やそれに伴う高用量の投与による副作用の発現が治療上の問題となる。従って体内時計を利用して治療効果を高めることができれば、癌の薬物療法をより効果的なものにできると考えられる。そこで、腎細胞がんモデルマウスを用いて everolimus の有効性の高い治療法を構築することを目的として時間薬理学的検討を行った。まず、マウス足底部にマウス腎細胞がん細胞株である RenCa を皮下移植し、腫瘍モデルとした。6 時点で腫瘍を回収し、mTOR 関連因子のタンパク発現量を測定したところ、夜間に mTOR の活性が高まる日周リズムが存在していた。Everolimus の治療効果について、7 時と 19 時の 2 時点で腫瘍モデルマウスに everolimus を尾静脈投与後、経日的に生存数を評価した。その結果、everolimus の投与によって生存率は顕著に改善し、またその改善率は 7 時よりも 19 時に投与した群において高かった。Everolimus の血中濃度推移には時刻依存的な差異は認められなかったが、mTOR が制御している細胞周期関連因子 Cyclin D1 の発現は 19 時の投与によって顕著な低下が見られた。これらのことから、everolimus の抗腫瘍効果の投与時刻依存的な変化は mTOR シグナル活性の日周リズムによって制御されている可能性が示唆された。

時計遺伝子は様々な生体機能に日周リズムを生み出している。かねてより時計遺伝子は転写によっ

て遺伝子の発現を調整していると考えられてきたが、近年の研究の中で、転写段階のみならず、その産物の修飾や分解の時刻依存性が日リズム形成の一因となる場合があることが知られている。第 1 章において、腫瘍中の mTOR シグナルには日リズムが存在していたが、未だその分子制御機構は明らかとなっていない。そこで、腫瘍モデルマウスにおける mTOR の日リズム制御を明らかにするための検討を行った。その中で mTOR の転写レベルには日リズムは存在しておらず、転写以外の段階で mTOR タンパク発現量に日リズムが生じていることが示唆された。一方で、Fbxw7 と呼ばれるユビキチンリガーゼの一種は、細胞周期制御因子の一つであること、また mTOR をユビキチン化して分解に導くことが過去の報告で明らかとなっている。そこで、腫瘍中の Fbxw7 の発現を測定したところ、mRNA、タンパクレベルいずれも mTOR の日リズムと逆位相の日リズムが存在していた。このことから、Fbxw7 による mTOR のタンパク分解活性の時刻依存性が、mTOR タンパクの日リズムを生じる要因であると考えられた。さらに、Fbxw7 の転写制御について検討を行ったところ、時計遺伝子の一種である DBP によって促進的な制御を受けていることが明らかとなった。実際に、時計遺伝子の発現を同調させた培養系において DBP の発現を抑制したところ、Fbxw7 の発現量が低下してリズムが消失し、これに伴って mTOR タンパクの発現量が増加していた。以上の検討から、マウス腎細胞がんモデルにおける mTOR タンパクの日リズムは、時計遺伝子 DBP によって、Fbxw7 によるユビキチン化の日リズムを介して制御されていることが示唆された。

mTOR は癌細胞の増殖のみならず、正常組織においても糖・脂質代謝の制御や免疫系の制御など様々な役割を果たしている。体内時計も同様にこれらの生体機能の恒常性の維持に寄与していることが知られているが、mTOR シグナルとの正常組織での相関については未解明の部分が多い。そこで、マウス正常肝組織における mTOR の日リズム制御を明らかにするための検討を行った。6 時点で採取した BALB/c マウス、及び時計遺伝子 Clock 変異マウス(Clk/Clk マウス)の肝臓から総 RNA、タンパクを抽出し、mTOR の発現量を測定した。その結果、正常肝においては mRNA、タンパク共に日リズムを示したが、Clk/Clk 肝ではいずれもリズムが消失していた。このことから、肝臓での mTOR の日リズムは時計遺伝子によって転写レベルで制御を受けることが示唆された。また、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いた検討によって、時計遺伝子結合配列 D-site あるいは RORE を介した転写制御が示唆された。実際、腫瘍中においてこれらの配列に作用する時計遺伝子の日リズムは消失しており、これが腫瘍中で転写の日リズムが存在していない一因であると考えられる。一方で、mTOR 阻害剤であるエベロリムスの曝露は、時計遺伝子 Per2 の転写活性のリズムを減弱させることが明らかとなった。これらの結果から、mTOR シグナルと体内時計機構が相互に影響し合っている可能性が示唆された。

本研究では、これまで明らかとされなかった mTOR と体内時計との関連性について新たな知見を得ることができた。本研究で得られた成果は、everolimus の至適投与法の構築のみならず、代謝異常症や神経変性疾患など種々の mTOR シグナルが影響する疾患の日リズムのメカニズム解明、並びに新規治療標的の探索に応用できると考えられる。これらのことから、申請者は博士(薬学)の学位に値すると認める。