

Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura

MUDr. Hana Študentová¹, prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.^{1,2}

¹Onkologická klinika, FN a LF UP Olomouc

²Klinika onkologie a radioterapie, FN Hradec Králové

Signální kaskáda PI3K/Akt/mTOR je jednou z hlavních drah podílejících se na procesu kancerogeneze a tedy i důležitým cílem onkologické léčby. Inhibice této dráhy se stala slibným cílem výzkumu, jelikož aberace v jednotlivých složkách této signální dráhy se vyskytují u širokého spektra nádorových onemocnění. Pro světlobuněčný karcinom ledviny je typická nadměrná exprese HIF-alfa, vedoucí především k akumulaci proangiogenních faktorů a následně k indukci angiogeneze. Této skutečnosti využívají v současné době 2 dostupné skupiny léků s odlišným mechanismem účinku. Jedná se o terapii proti VEGF (R), která především negativně ovlivňuje nádorovou angiogenezi a inhibitory dráhy mTOR, které mají přímý antitumorózní efekt včetně schopnosti navození zástavy buněčného cyklu v G1 fázi a indukci apoptózy.

Klíčová slova: mTOR, inhibice mTOR, HIF-alfa, anti-VEGF (R) terapie.

New mechanism of action in the treatment of renal cell carcinoma: m-TOR – a novel target

PI3K/Akt/mTOR is a crucial signal transduction pathway taking part in the process of cancerogenesis as well as a target for anticancer therapy. Inhibition of this pathway has become a promising target for cancer research, since alterations at distinct points of this signal transduction pathway have been observed in multiple cancer types. HIF-alpha over-expression, typical for renal cell carcinoma, leads to accumulation of proangiogenic factors and angiogenesis induction. Currently, there are 2 approaches of anticancer management using different mechanisms of action: anti-VEGF (R) therapy, targeting mostly tumour angiogenesis, and mTOR inhibitors that exhibit a direct anti-tumour effect leading to cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis induction.

Key words: mTOR, mTOR inhibition, HIF-alpha, VEGF (R) targeted therapy.

Onkológia (Bratisl.), 2010; roč. 5 (5): 270–274

Úvod

Proteinová kináza mTOR (mammalian target of rapamycin) hraje významnou roli v buněčných procesech, jakými jsou buněčný růst, proliferace, přežívání buňky a angiogeneze. Jedná se o serin/threoninovou kinázu o velikosti 289 kDa, která je součástí rodiny fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K). Reaguje na aktuální environmentální podmínky prostřednictvím integrace signálů z růstových faktorů, nutrientů a regulace buněčného cyklu a buněčné proliferace.

Důležitost mTOR signalizování také vyplývá ze skutečnosti, že hyperstimulace mTOR kaskády podněcuje nádorovou přeměnu prostřednictvím zvýšené translace mRNA kódující růstové faktory, regulátory buněčného cyklu, proteiny důležité pro přežití buňky a angiogenní faktory (1). Díky svému klíčovému postavení je dráha PI3K/Akt/mTOR jednou z hlavních drah podílejících se na procesu kancerogeneze a její inhibice se stala centrem zájmu výzkumu a tedy i důležitým cílem onkologické léčby, obzvláště u nádorů, u nichž se vyskytují aberace v dráze mTOR, způsobující její nadměrnou aktivaci. Existuje spousta mechanismů, které mohou vést ke zvýšené aktivaci mTOR, následně pak podpoře transformace a onkogeneze. Může se jednat o amplifikace, mutace nebo ztráty

klíčových regulátorů dráhy PI3K/Akt/mTOR vedoucí ke zvýšení buněčného růstu a proliferace, čímž se může podmínit vznik celé řady lidských nádorů či hereditárních hamartóz.

Sirolimus, jakožto prototyp mTOR inhibitorů, je ester rapamycinu. Původně byl izolován z půdní bakterie *Streptomyces hygroscopicus* na Rapa Nui (dříve nazývaný Velikonoční ostrov) a identifikován jako účinné antitumorigenické činidlo před více než 30 lety. V rámci jeho výzkumu byl postupně zjištěn jeho významný imunopresivní efekt, který se uplatňuje v transplantační medicíně, a silné antiproliferační účinky na široké spektrum eukaryotických buněk a v neposlední řadě jeho protinádorová účinnost u lidských nádorových buněk. Léčba mTOR inhibitory brání přechodu buněk z fáze G1 buněčného cyklu do fáze S, tedy navozuje zástavu buněčného cyklu. Negativní vliv mTOR inhibitorů na buněčný růst je způsoben především poklesem syntézy regulátorů buněčného cyklu, např. cyklinu D, které jsou nezbytné pro dokončení buněčného cyklu buňky (2). Léčba mTOR inhibitory může rovněž za určitých podmínek indukovat apoptózu. S postupem doby byly objeveny další rapamycinové deriváty s vylepšenými farmakologickými vlastnostmi. V indikaci metastatického karcinomu ledviny se v současné

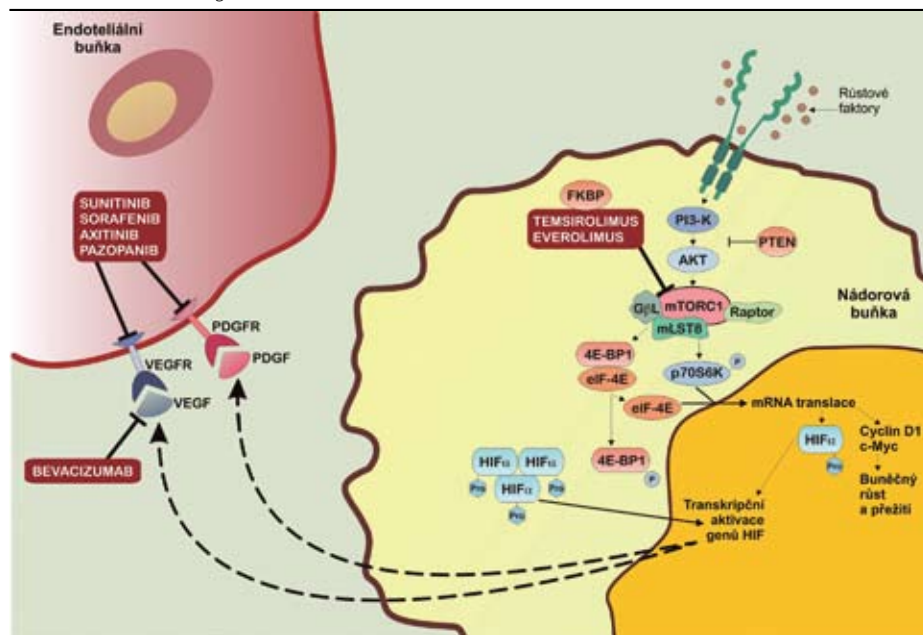
době používají everolimus v perorální aplikaci pro pacienty po selhání tyrozin-kinázových inhibitorů (TKI) a temsirolimus v intravenózní aplikaci v 1. linii léčby pro pacienty se špatnou prognózou dle MSKCC.

V následujícím textu se zaměříme na mTOR signální kaskádu, mechanismy jejího ovlivnění a aplikaci v klinické praxi.

Dráha mTOR a její regulace

Dráha mTOR může být aktivována různými zevními stimuly, jako jsou růstové faktory, např. PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor) či hormony. Dráha mTOR rovněž reaguje na aktuální stav zevního prostředí, a to především na přítomnost kyslíku, nutrientů a stres, jelikož její hlavní funkcí je regulace proteosyntézy a tím pro buňku důležitých pochodů jako proces transkripce, translace, degradace proteinů a organizace buněčného cytoskeletu.

Dráha mTOR je spuštěna navázáním ligandu na membránový receptor. Signál z cytoplazmatické membrány je následně přenášen pomocí malých molekul s funkcí druhých signálních posílů, jejichž signální aktivita je závislá na stupni fosforylace. Jako katalyzátor této reakce slouží protein PI3K. Klíčovým momentem v kaskádě

Obrázek 1. PI3K/Akt signální dráha

mTOR je aktivace Akt (proteinkináza B) prostřednictvím fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), která aktivuje Akt fosforylací serin/treoninové proteinkinázy PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1). Akt může následně fosforylovat řadu dalších kináz, např. mTOR kinázu. Signální cesta PI3K/Akt je negativně regulována proteinem PTEN (phosphatase and tensin homolog) s enzymatickou aktivitou, který defosforyluje PIP 3 na PIP 2 (obrázek 1). Protein PTEN je produktem tumor supresorového genu PTEN, přičemž ztráta funkce tohoto genu způsobená mutací nebo epigenetickou modifikací patří k asi nejčastějším příčinám hyperaktivace dráhy PI3K, vyskytující se u mnoha nádorových onemocnění. Dalším negativním regulátorem dráhy mTOR jsou tumor supresorové geny tuberózní sklerózy 1 a 2 (TSC 1 a TSC 2). Aktivovaná Akt způsobuje fosforylací a následně destabilizaci komplexu TSC, která vyvolá aktivaci dráhy mTOR prostřednictvím malého proteinu Rheb.

Dráha mTOR následně řídí proces buněčné replikace prostřednictvím 2 klíčových proteinů: 4E-BP1 (translation initiation factor 4E binding protein 1) a S6K 1 (ribosomální p70S6 kináza). Kináza 4E-BP1 se fosforylací uvolní z eIF-4E (eukaryotický translační faktor) a spouští translaci proteinů jako c-Myc, cyklin D1 a HIF (hypoxia-inducible factor). Výsledkem je zvýšená produkce růstových faktorů, např. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF a TGF (transforming growth factor). Aktivací dráhy cestou p70S6K1 dochází naopak k translaci ribosomálních proteinů, elongačních faktorů a dalších proteinů nezbytných pro přechod buňky z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu.

V populacích savčích buněk rozlišujeme 2 typy mTOR komplexů – mTORC1 a mTORC 2, přičemž mTOR inhibitory interagují výlučně s komplexem mTORC1. Tento komplex se skládá z mTOR, raptoru, který funguje jako regulační protein nezbytný pro fosforylací S6K a 4E-BP1, a GβL (G protein β-subunit-like protein). Specifická regulační podjednotka komplexu mTORC2 se nazývá Rictor. Tento komplex je zapojen do regulace cytoskeletu a zodpovídá především za fosforylací Akt.

Mechanismus účinku mTOR inhibitorů

Rapamycinové deriváty se váží na intracelulární receptor FKBP12 a vytvářejí komplex, jež se váže na mTOR prostřednictvím FRB domény, která je specifická pro subpopulaci mTOR proteinů formujících multiproteinový komplex nazývaný mTORC1. Komplex FKBP12-rapamycin nerozpozná a není tedy schopen inhibovat komplex mTORC2, z čehož vyplývá, že mTORC2 není na mTOR inhibitory citlivý. Vazbou komplexu FKBP12-rapamycin k FRB doméně dojde k destabilizaci komplexu mTORC1 a tím k zablokování interakce s jeho substráty 4E-BP1 a S6K (3).

Role mTOR inhibice v léčbě karcinomu ledviny

Nejčastější molekulární abnormalitou u světlobuněčného renálního karcinomu je ztráta tumor supresorového genu VHL (von Hippel-Lindau), která se nachází u všech hereditárních případů a u asi 50–70% sporadických (4). Z jiných literárních zdrojů jsou tyto údaje i mnohem vyšší. Inaktivace genu v obou alelách totiž

podporuje vznik nádorového fenotypu. Jedna alela bývá nejčastěji inaktivována delecí, která je pozorována u více než 90% sporadických světlobuněčných karcinomů (5). Zbývající alela může být mutována buď genovou mutací (až u 80% světlobuněčných renálních karcinomů), nebo genovou deaktivací díky metylaci (5–10% světlobuněčných RCC) (6). Tato dysregulace vede k nadměrné expresi HIF-alfa, způsobující akumulaci jeho efektorů a tím ke zvýšené angiogenezi, buněčnému růstu, přežívání za hypoxie, lepší adaptaci na prostředí s nízkým pH a nedostatkem nutrientů a nakonec k metastazování.

Za podmínek normálního přísunu kyslíku je HIF-alfa hydroxylovaný enzymy, což umožňuje navázání na wild-type VHL protein (pVHL) a následně jeho degradaci v buněčných proteozomech. Při hypoxii nebo v situaci, kdy je pVHL nefunkční (mutovaný), nedochází k degradaci HIF-alfa, ale jeho akumulaci a translokaci do buněčného jádra, kde tvoří heterodimer s HIF-beta/ARNT (obrázek 2). Tento heterodimer následně aktivuje transkripci v místech DNA zvaných HRE (hypoxia-responsive elements). Výsledkem této kaskády je exprese tzv. hypoxií indukovaných genů (hypoxia inducible genes) a tedy produkce širokého spektra potenciálně proonkogenních proteinů včetně glykolytických enzymů a proangiogenních cytokinů, např. VEGF, PDGF, TGF-alfa (transforming growth factor alfa), glukózové transportéry (např. Glut1), erythropoetin a EGFR (epidermal growth factor receptor). Tyto růstové faktory jsou vylučovány do extracelulárního prostoru a mohou působit jak parakrinní stimulací, kdy se naváží na receptory lokalizované na endotelilálních či stromálních buňkách, kde indukují jak stromální proliferaci a angiogenezi, tak autokrinní stimulací, kdy interagují s receptory na nádorových buňkách s vlivem na jejich proliferaci a přežívání. V endotelilálních buňkách, hladkých svalových buňkách cévních stěn a pericytech je mTOR kináza aktivována cestou VEGFR. Kináza mTOR je rovněž aktivována mutacemi, které postihují geny komplexu tuberózní sklerózy (TSC1 a TSC2), čímž je zvýšena aktivita HIF-alfa a s tím související predispozice ke vzniku karcinomu ledviny (7). V experimentech se prokázalo, že inhibice mTOR přímo snižuje aktivitu HIF-alfa v případě abnormální aktivace dráhy mTOR (7). Syntéza HIF-alfa je tedy částečně regulovaná dráhou mTOR a za normálních okolností je degradovaná produkty VHL genu. U asi 50% renálních nádorů se navíc vyskytuje ještě zvýšená aktivace dráhy Raf/MEK/ERK.

Vezmeme-li v úvahu kruciální postavení HIF-alfa v onkogenezi světlobuněčného karcinomu ledviny, dráha mTOR se pak stává významným cílem v jeho terapii. Thomas, et al. prokázali, že ztrátou funkce genu PTEN se buňky renálního karcinomu stávají citlivější na mTOR inhibitory (8). Existují však i světlobuněčné karcinomy ledviny s wild-type VHL, které reagují na léčbu mTOR inhibitory. Je tedy zřejmé, že více faktorů zde hraje roli a celá problematika je podstatně složitější.

VEGF (R) cílená léčba versus cílená léčba pomocí m-TOR inhibice u nemocných s metastatickým renálním karcinomem

Bevacizumab, sunitinib a sorafenib negativně ovlivňují především angiogenezi na úrovni vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF – vascular endothelial growth factor) a jeho receptoru (VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor). Zcela odlišným mechanismem působí mTOR inhibitory přímo na buněčné úrovni zástavou buněčného cyklu, indukci apoptózy a rovněž inhibicí angiogeneze.

Bevacizumab je monoklonální protilátka, která potlačuje nádorovou angiogenezi navázáním se na VEGF, čímž znemožňuje jeho interakci s VEGFR na povrchu endoteliálních buněk. VEGF je účinný proangiogenní faktor, který má vliv na zvýšení vaskulární permeability, proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Sunitinib a sorafenib jsou na rozdíl od bevacizumabu malé molekuly s funkcí tyrozin-kinázových inhibitorů (TKI), které inhibují tyrozin-kinázovou aktivitu intracelulární domény VEGFR. Sorafenib navíc inhibuje Raf kinázu, která je součástí další důležité signální transdukční kaskády savčích buněk. Do skupiny anti-VEGFR preparátů spadá ještě pazopanib, axitinib a mnohé další, které jsou předmětem klinického zkoušení.

Klinická odpověď na anti-VEGFR preparáty není bohužel trvalá, její trvání může být i velmi krátké, řádově týdny až měsíce, nakonec se u většiny pacientů vyvíjí rezistence na anti-VEGFR léčbu, doba do progresu se v průměru pohybuje mezi 6–12 měsíci. Mechanismus této rezistence není zcela objasněn, uvažuje se o adaptivní rezistenci vyvolané aktivací alternativních proangiogenních signálních drah, dalším možným mechanismem může být recruitment vaskulárních progenitorových buněk z kostní dřeně, ochrana nádorových cév těsnou pokrývkou z pericytů nebo zvýšení schopnosti invaze nádorových buněk a v neposlední řadě se může rovněž jednat o intrinsickou rezistenci

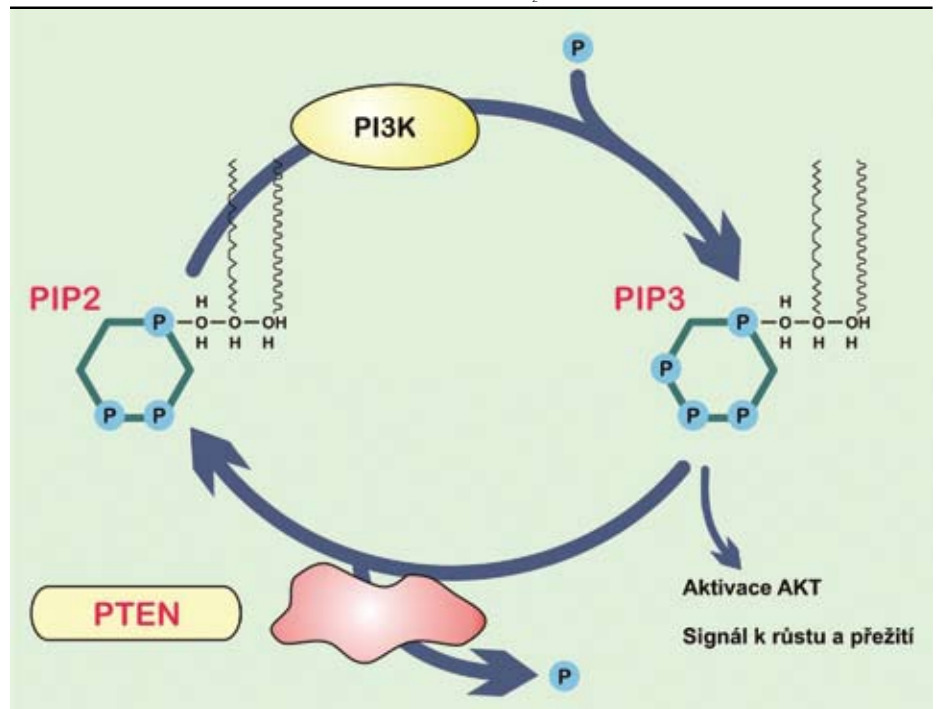
vyplývající z již preexistující necitlivosti nádoru na anti-VEGFR terapii (9).

Po selhání anti-VEGFR strategie se tedy nabízí otázka, jak pokračovat v léčbě pacientů s metastatickým renálním karcinomem. Inhibice dráhy mTOR se v současné době jeví jako velmi rozumné řešení, což se i potvrdilo v klinické studii III. fáze REKORD-1 (REnal Cell Cancer Treatment with Oral RAD001 Given Daily), kde se prokázal význam a účinnost léčby everolimem po selhání předchozí anti-VEGFR terapie. Inhibitory mTOR mají totiž odlišný mechanismus účinku, a to přímý antitumorózní efekt, neboť jsou schopny navodit zástavu

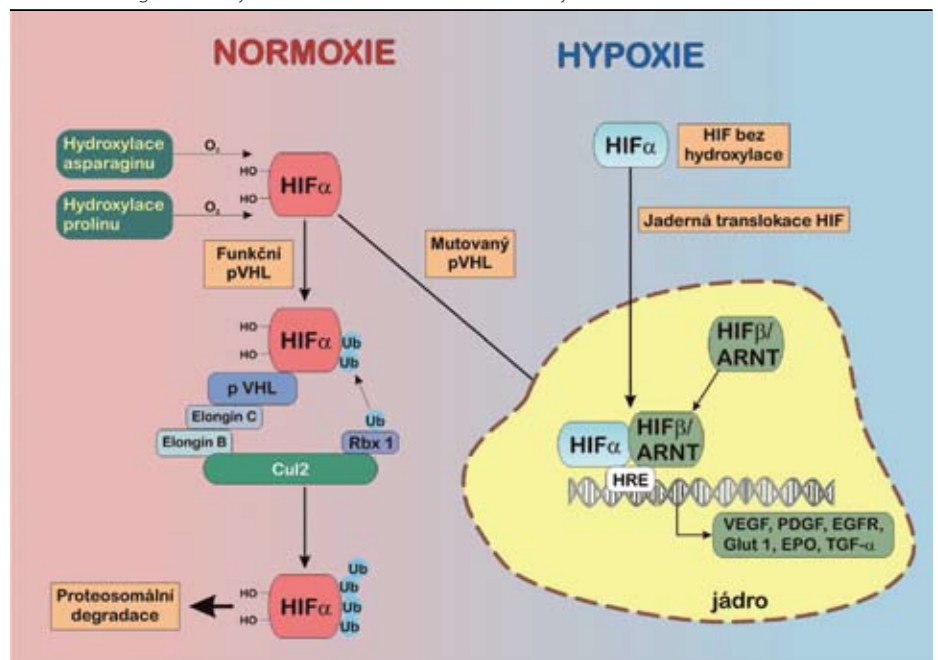
buněk v G1 fázi buněčného cyklu a mohou indukovat apoptózu stejně jako stupňovat transkripční aktivitu HIF (10). Inhibitory mTOR navíc potlačují transkripční aktivitu HIF v nádorových buňkách, čímž redukuje expresi VEGF a nádorovou angiogenezi prostřednictvím VHL-independentních mechanismů (11). Léčba mTOR inhibitory rovněž redukuje VEGF zprostředkovanou proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Tato terapie vykazuje také zvýšenou aktivitu proti více vyzrálé vaskulatuře nádoru na rozdíl od anti-VEGFR terapie (11).

mTOR-inhibitory prokázaly v preklinických i klinických studiích velmi slibnou protinádoro-

Obrázek 2. Interakce pVHL a HIF za normálního přísunu O₂ a při hypoxii



Obrázek 3. Signální dráhy a mechanismus účinku cílené léčby



vou aktivitu. Některé aspekty ovlivnění dráhy mTOR však zůstávají stále nejasné a budou jistě předmětem dalšího výzkumu. Preklinické důkazy svědčí například spíše o selektivním než globálním působení rapamycinu na signalizování asociované s mTORC1, což významně komplikuje identifikaci pacientů, kteří by nejvíce profitovali z léčby mTOR inhibitory v monoterapii či kombinaci (12). Komplex mTORC2, který není na mTOR inhibitory citlivý, zodpovídá především za fosforylaci Akt, což může být jednou z příčin snížené odpovědi na léčbu mTOR inhibitory. Nicméně existují již doklady o tom, že mTORC2 je inhibován při dlouhodobé léčbě mTOR inhibitory (13). Mechanismus, kterým je této odpovědi dosaženo, není jasný, ale předpokládá se, že buňka kompenzuje nedostatek mTORC1 jeho nadprodukcí a tím limituje dostupnost mTOR k vytváření mTORC2 komplexů. Uvažuje se také, že léčba mTOR inhibitory by byla rovněž více efektivní v kombinaci s jinými preparáty cílené léčby či léčebnými modalitami, např. s radioterapií, látkami štěpícími molekulu DNA, inhibitory dráhy RAS/RAF, inhibitory PI3K, antagonisty IGF-IR (insulin-like growth factor I receptor) či inhibitory EGFR (epidermal growth factor receptor). V současné době je otázka kombinační léčby a její možné aplikace v klinické praxi předmětem výzkumu.

Závěr

Proteinová kináza mTOR je díky svému klíčovému postavení součástí jedné z hlavních drah

podílejících se na procesu kancerogeneze a tedy i důležitým cílem onkologické terapie.

Významným aspektem použití inhibitorů mTOR v klinické praxi je především stanovení si strategie jejich optimálního použití, což platí pro všechny preparáty cílené léčby obecně. Vzhledem k přítomnosti množství redundantních drah, které ovlivňují nádorový růst a existenci vzájemných interakcí mezi jednotlivými složkami těchto signálních kaskád, se léčba zaměřená na jediný cíl jeví stále jako nedostatečná k navození trvalého protinádorového účinku u většiny pacientů. V budoucnu bychom se měli především zaměřit na identifikaci charakteristik subpopulací pacientů, kteří budou nejvíce z dané léčby profitovat a v neposlední řadě zvážit možnosti léčby ovlivněním více jak jednoho léčebného cíle.

Literatura

- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18(16): 1926–1945.
- Noh WC, Mondesire WH, Peng J, et al. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3): 249–258.
- Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, et al. Dissociation of rapro from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 2004; 9(4): 359–366.
- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4991–5004.
- Kondo K, Yao M, Yoshida M, et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 58–68.
- Rini BI. Metastatic Renal Cell Carcinoma: Many treatment options, One Patient. *J Clin Oncol* 2009; 19: 3225–3234.
- Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and independent pathways. *Cancer Cell* 2003; 4: 147–158.
- Thomas GV, Tran C, Mellinger IK, et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* 2006; 12: 122–127.
- Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature* 2008; 592–603.
- Meric-Bernstam F, Gonzales-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2278–2287.
- Lane HA, Wood JM, McSheehy PM, et al. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1612–1622.
- Edinger AL, Linardic CM, Chiang GG, Thompson CB, Abraham RT. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res* 2003; 63: 8451–8460.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307(5712): 1098–1101.

MUDr. Hana Študentová

Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
hanastudentova@email.cz
