

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830078

研究課題名(和文)新規mTOR下流シグナル経路による癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanistic insights of tumor promotion via a novel mTOR signaling pathway

研究代表者

中津海 洋一 (Hirokazu, Nakatsumi)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：20596837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまながんにおいて、PI3K-AKT-mTORC1の異常活性化が高頻度に観察され、がん促進効果が報告されてきた。しかしながらmTORC1の異常活性化によるがん促進の分子メカニズムについては不明な点が多かった。今回我々が同定したmTORC1-FOXK1-CCL2経路について、がん促進作用があることを明らかにし、またそのメカニズムとして炎症性マクロファージの腫瘍浸潤を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells and tumor-associated macrophages accumulate to tumor sites and construct tumor microenvironment, which promote immune suppression and tumor progression. The accumulation of the myeloid cells is known to be dependent on tumor cell-derived chemokine CCL2. The overexpression of CCL2 is clinically observed in various types of tumor. However, it is poorly understood how CCL2 is upregulated in tumor cells. Here, we show that CCL2 transcription is regulated by mammalian target of rapamycin complex 1, which is frequently activated in downstream of PI3K/AKT pathway in tumor cells. The mTORC1-dependent CCL2 expression is mediated by dephosphorylation of transcription factor FOXK1. Blocking mTORC1-FOXK1 axis prevents CCL2-dependent accumulation of myeloid cells and tumor progressions. These results provide a molecular mechanism bridging from tumor initiation to constructing tumor microenvironment.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：mTORC1 CCL2 がん マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) は真核生物全般に広く保存されたリン酸化酵素であり、栄養応答システムと細胞増殖を関連させる司令塔として機能する。ところが mTOR の生理機能を実際に担うのはさらにシグナル下流にある分子群であるため、ラパマイシンの薬理作用や mTOR の生理機能の全容解明は下流分子群の同定と機能解析の完遂によってのみ達成される。しかしながら、現在知られている下流分子だけでは mTOR の機能の説明には不十分であり、そのごく一部しか説明できていない。

申請者らはリン酸化タンパク質の大規模な定量解析技術 (Phospho-iTRAQ システム) を確立し、10,000 を超えるリン酸化を同定し、また 4 つのサンプル間で各々の変動を定量することができるようになった。申請者はこの技術を用いて mTOR の下流分子群の大規模な探索を行い、新規下流分子を 20 分子を発見した。その中にはフォークヘッド転写因子 FOXK1 が含まれており、申請者はこれに着目することにした。さらにマイクロアレイ解析を行い、mTOR-FOXK1 経路の下流で発現上昇する遺伝子は炎症性ケモカインである CCL2 が唯一であることを明らかにした。

申請者が新規に同定した mTOR-FOXK1-CCL2 経路は、栄養シグナルを受けると転写因子によって炎症応答が惹起される可能性を示している。このことは矛盾を含むように見えるが、mTOR と CCL2 に共通する生理現象として、がん進展という側面から考察すると、整合性のある作業仮説 (後述) が浮かび上がる。

mTOR の異常活性化はさまざまな癌において観察されており、ラパマイシンは抗癌作用を発揮する。一方で CCL2 は腫瘍における慢性炎症病態に深く関与しており、がんを促進することが知られている。すなわち新規シグナル経路の上下に位置する分子が、ともにがん進展というキーワードによって繋がれる。そこで本申請研究では作業仮説として、「腫瘍において mTOR-FOXK1-CCL2 経路

が活性化し、がんが促進される」と考えて検証を行う。ラパマイシンの抗がん作用が報告されてから 10 年以上が経ったが (Markus G et al. Nat. Med., 2002)、そのメカニズムはこれまで明確なコンセンサスが取られていなかった。本研究が達成されれば、この問いに解を与えることとなり、その意義は大きい。申請者が行った予備的研究から、癌細胞である HCT116 細胞株において FOXK1 の発現を抑制すると、腫瘍の増大が阻害されることが分かっている。本申請研究では FOXK1 を含むシグナル経路とがん進展の間の因果関係を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では mTOR と FOXK1 と腫瘍について互いの関連を明らかにする。即ち以下の項目の検証を行う。

- ・ FOXK1 の発現抑制によって腫瘍が抑制されるか。

- ・ FOXK1 による CCL2 の転写は mTOR 依存的ながん進展に必要なか。

- ・ ラパマイシンによる腫瘍抑制効果に、FOXK1 の抑制は寄与しているか。

- ・ ラパマイシンは、腫瘍由来の CCL2 に依存して起こる単球の浸潤を抑制するか。

以上の解析から、mTOR-FOXK1-CCL2 経路によるがん促進を確かなものにすると同時に、この経路の重要性を明らかにしていく。最終的には抗癌剤のターゲットとして FOXK1 や CCL2 の可能性を示したい。

またこれまでの報告で mTOR 依存的ながん進展は HIF (Hypoxia Inducible Factor) を介するとされてきた (Brugarolas JB. et al, *Cancer Cell*, 2003)。しかしながら現在でも、mTOR のリン酸化活性がいかんして HIF の発現を上昇させるかについてほとんど明らかになっていない。また mTOR 依存的でありながらも HIF に依存しないがん進展経路の存在が報告されており、HIF の発現上昇ががん進展の原因となっているのか、単に付随して観察される現象なのかは不明である。つまり、mTOR 依存的ながん促進のメカニズムについては詳細なメカニズムが不明である。その本体として FOXK1 の機能が明らかになれば、学

術的な意義は大きい。

3. 研究の方法

本研究ではこれらの結果を踏まえ、mTOR-FOXK1-CCL2 軸が癌進展に果たす役割を検討する。実験系としては、Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞株をマウスに皮下注射し、腫瘍大、浸潤マクロファージを測定する系を用いる。LLC 細胞株の Raptor、FOXK1、CCL2 について shRNA を用いてノックダウンした細胞株を樹立し、Dish 上で培養した場合の増殖能の比較、マウス皮下に注射した場合の腫瘍大等の比較を行い、当該シグナル経路の機能を示す。またラパマイシン投与による上記項目の比較を行い、同様の結果が示されるかを検討する。これらの個体レベルの詳細な解析から、最終的には FOXK1 を標的とした癌治療戦略の可能性を検証する。

4. 研究成果

LLC 細胞株を用いて Raptor、FOXK1、CCL2 についてノックダウン細胞株を樹立したところ、in vitro での増殖能には全く変化を示さず、コントロール細胞と比較して特に違いは無かった。しかしながらマウスに皮下注射したところ、その腫瘍重量は3種の細胞株において有意に減少していた。これらの腫瘍重量の減少にCCL2抑制を介した浸潤マクロファージの抑制が寄与している可能性を考えて、腫瘍浸潤マクロファージのプロファイルをFACS解析によっておこなったところ、CD206⁺ F4/80⁺ の古典的 M2 タイプのマクロファージの減少が観察された。また Mac1⁺ Ly6C⁺ の Monocytic MDSCs についても減少傾向が見られる一方で、CD11c⁺ MHCII⁺ の TIDCs については変化が無く、また Mac1⁺ Ly6G⁺ の Granulocytic MDSCs についても変化が見られなかった。これらの現象は Raptor、FOXK1、CCL2 の各々のノックダウン細胞株全てにおいて観察されたものであり、単独の経路を介したものと考えられた。またラパマイシン投与の浸潤マクロファージ・腫瘍大への影響を比較してみたところ、150 µg/kg/day という一般的な投与量の 1/10 の濃度において十分な浸潤マクロファージ

の減少が観察され、それと呼応するように腫瘍重量の減少も観察された。これらのことから、mTOR-FOXK1-CCL2 経路を標的としたがん治療戦略の有用性を示すことができた。

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2件)

中津海洋一，松本雅記，中山敬一．
FOXK1 links mTORC1 pathway to inflammation. 第37回日本分子生物学会年会．横浜．(12/4, 2014)．

中津海洋一，松本雅記，中山敬一．
mTORC1 の活性化は FOXK1 経路を介して炎症を誘導する．第38回日本分子生物学会年会．神戸．(12/4, 2015)．

[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]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中津海 洋一 (NAKATSUMI, Hirokazu)

(九州大学生体防御医学研究所学術研究員)

研究者番号：20596837

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：