

平成 28 年 4 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890015

研究課題名(和文)細胞増殖シグナルの再構成による癌細胞のMEK阻害剤抵抗性の解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of MEK inhibitor resistance in cancer cells based on reconstitution of cell growth signaling

研究代表者

小松 直貴 (Komatsu, Naoki)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30737440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Ras-Raf-MEK-ERKシグナル伝達経路は細胞増殖に深く関与し、多くの癌細胞でRasやRafの変異が見出される。MEK阻害剤はRaf変異癌細胞の細胞増殖を効果的に抑制するものの、Ras変異細胞では増殖抑制効果は低い。このMEK阻害剤抵抗性の動作原理を理解するために本研究ではRas下流のシグナル伝達分子の一つ、mTORC1の活性を人為的に制御し、活性化を計測する実験系の構築を行った。また細胞周期の進行を生きた細胞でリアルタイムに計測するための実験系の構築を行った。これらの実験系の併用により今後、細胞増殖やMEK阻害剤抵抗性を制御する原理が解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway plays pivotal roles in cell proliferation and cell growth and mutations in Ras or Raf have been frequently identified from various tumor cells. MEK inhibitors are effective in suppressing cell growth of Raf-mutant cells but not in Ras-mutant cells. To reveal working principles of the MEK inhibitor resistance in cancer cells, in this study, we constructed a system for controlling and monitoring mTORC1 activity, which is a downstream signaling of Ras. In addition, we established stable cell lines for analyzing dynamics of cell cycle progression of living tumor cells under perturbations of ERK or mTORC1 signaling. Combination of these approaches would be expected to identify the principles of cell growth control and that of MEK inhibitor resistance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 細胞増殖 生細胞イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Ras-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路は細胞増殖や癌化に深く寄与することが知られており、KRas 変異や BRAf 変異が多くの癌で見出される。MEK 阻害剤はこれら ERK 経路に変異を有する癌に対する抗癌剤として有望視されている。しかしながら MEK 阻害剤は BRAf 変異癌には奏功する一方、KRas 変異癌への増殖抑制効果は部分的である。この癌細胞における MEK 阻害剤抵抗性についてその分子機構がいくつか提唱されつつある。

(2) その一方で細胞内シグナル伝達と MEK 阻害剤抵抗性についての定量解析の不足により KRas 変異細胞がどのような動作原理により MEK 阻害剤抵抗性を示すかについてはほとんど未解明のままである。研究代表者は以前の研究により、BRAf 変異細胞および KRas 変異細胞の両方で MEK 阻害剤依存的に ERK 活性が同程度に減少すること、加えて BRAf 変異細胞は MEK 阻害剤により細胞増殖が抑制されるが、KRas 変異細胞では増殖がそれほど抑制されないことを見出していた。これは提唱されている MEK 阻害剤抵抗性の分子機構の一つである、ERK 経路内の負のフィードバック機構による ERK 再活性化では説明できないため、別の分子機構によるものと考えられた(文献)。また PI3K-Akt-mTORC1 経路がその別の分子機構(の一つ)である可能性を示した。しかしながら ERK 経路と mTORC1 経路がどのようにして細胞増殖促進および MEK 阻害剤抵抗性を示すのかその動作原理は依然として十分理解されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では ERK 経路と mTORC1 経路の活性を人為的に制御することで細胞増殖の促進がおきるか、すなわち細胞増殖シグナルが再構成可能か検証することで細胞増殖促進の動作原理を理解することを目指した。ERK 活性の人為制御系はすでに発表されている一方で、mTORC1 活性の人為制御系は開発されていないことから、まず mTORC1 活性の人為制御系および活性計測系の樹立を本研究の目的 1 とした。

(2) ERK 活性および mTORC1 活性は細胞周期進行を介して細胞増殖を促進することが知られているが、これまではセルソーティングでの解析に終始していた。このため各分子活性が細胞周期のどのフェイズの進行に寄与しているかを検証する上で十分な時間分解能での解析は未だ行われていない。そこで本研究では阻害剤処理および分子操作による細胞周期進行を高い時間分解能で解析するために細胞周期進行を生細胞かつ 1 細胞レベルで解析するための実験系の樹立を目的 2 とした。

## 3. 研究の方法

(1) mTORC1 上流因子の一つ、PI3K の制御サブユニットである p85 の部分配列、inter SH2 (iSH2) ドメインを細胞質から形質膜へ人為的に移行させることで PI3K 下流因子を活性化できることが知られている。そこで青色光依存的かつ可逆的にヘテロ 2 量体を形成する CRY2-CIB 系を利用することで青色光照射により iSH2 ドメインを形質膜移行させ、これにより mTORC1 活性化を誘導する系を構築することとした。具体的には CIB N 末端側部分配列(以下、CIBN)と形質膜移行シグナル配列融合タンパク質の発現 DNA コンストラクトおよび CRY2、iSH2 ドメインおよび局在確認用の赤色蛍光タンパク質(mCherry)の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製した(以下、mTORC1 活性化系と呼ぶ)。mTORC1 活性化系で実際に mTORC1 活性が上昇することを確認するために生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)の原理に基づく S6K バイオセンサーを構築、利用することとした。これは分子活性の 1 細胞計測に用いてきた FRET バイオセンサーで計測に用いる青色の励起光により mTORC1 活性化系を意図しないタイミングで発火させてしまうこと、このため励起光を使わない手法が必須となるからである。S6K は mTORC1 直下の分子であり、これを mTORC1 活性の代替マーカーとして利用することとした。すなわち、mTORC1 活性化系と BRET S6K バイオセンサーをヒト由来培養細胞の一つ、HeLa 細胞に発現させ、青色光照射により mTORC1 活性化が惹起できるか BRET 計測により解析した。

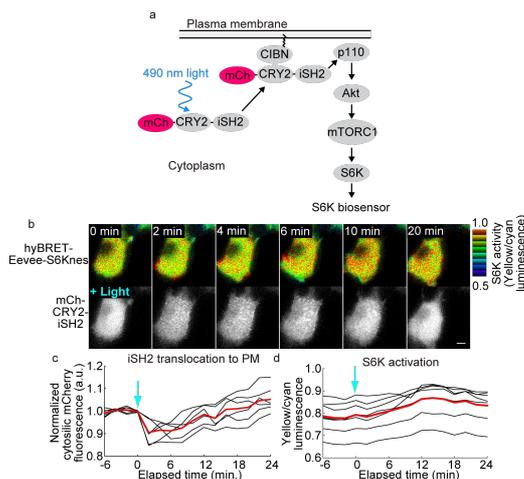
(2) Fucci は細胞周期を生細胞で 1 細胞レベルで可視化するための蛍光プローブであり、Fucci 発現細胞にて分子活性操作を行うことで ERK 経路および mTORC1 経路が細胞周期における制御点のいずれに関与するか解析可能である。Fucci は G0/G1 マーカー(mCherry-hCdt1)および S/G2/M マーカー(mVenus-hGem)から成る。解析を容易とするために、Fucci の 2 つのマーカーと細胞核追跡用のマーカー(H2B-mTurquoise2)を単一コンストラクトで発現させ、かつレンチウイルスベクターを利用することで種々の癌細胞株への遺伝子導入を省力化することを計画した。このために H2B-mTurquoise2、mCherry-hCdt1 および mVenus-hGem の 3 遺伝子をコードする cDNA 配列を自己切断 2A ペプチドをコードする DNA 配列で連結させ(以下、細胞周期マーカーセットと呼ぶ)、レンチウイルスベクターへの導入を行った。一方でオワンクラゲ由来蛍光タンパク質である mVenus と mTurquoise2 それぞれの塩基配列の相溶性が高いためにレンチウイルスの逆転写に起因する DNA 配列の組み換え反応がおこること、これによって細胞周期マーカー

ーセットの遺伝子が細胞に適切に導入できないおそれがあった。そこで mVenus と mTurquoise2 のアミノ酸配列を変えずに塩基配列の相同性を下げるコドン多様化処理を細胞周期マーカーセットの遺伝子について行った。最後に細胞周期マーカーセットを安定発現させた癌細胞の細胞周期を CO2 インキュベータ付き蛍光顕微鏡により経時観察し、細胞周期の進行が追跡可能か検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) S6K 活性を可視化する BRET バイオセンサーの開発

研究代表者は以前 S6K 活性を蛍光イメージングにより可視化する S6K FRET バイオセンサーを開発している(文献 )。このバイオセンサーに含まれるシアン色蛍光タンパク質(CFP)の C 末端側にウミシイタケ由来蛍光タンパク質(RLuc8)を融合することにより、生物発光を利用して細胞内の S6K 活性を計測可能なバイオセンサーを作製した。RLuc8 から CFP へのエネルギー移動によって生じるシアン色発光および RLuc8 から YFP へのエネルギー移動によって生じる黄色発光を蛍光イメージングにより取得、それらの発光強度比を計算することにより、実際に成長因子刺激による細胞内 S6K 活性化を可視化可能であることを示した。この新規 BRET バイオセンサーは部分配列を入れ替えることにより別の標的分子の活性を計測可能であり、汎用性の高い系であると考えられる。発光計測は化合物の自家発光の影響を排除できることから新規薬剤スクリーニング系への応用も今後期待できる。



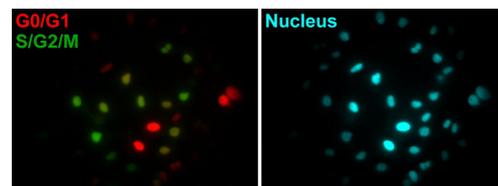
(図 1: 青色光依存的な mTORC1 活性化および mTORC1 活性の生細胞計測)

a. 実験系の概略図。b. S6K 活性(疑似カラー表示)(上行)および mCherry 融合タンパク質の細胞内局在(下行)の経時変化。c および d. mCherry シグナルの局在(c)または S6K 活性(d)の定量結果。

##### (2) 青色光依存的な mTORC1 活性化とその計測

形質膜局在型 CIBN と mCherry-CRY2-iSH2 融合タンパク質および 4-(1)で作製した S6K BRET バイオセンサーを HeLa 細胞に一過的に発現させた。血清飢餓および暗所下で数時間培養した後に発光イメージングにより S6K 活性を、緑色の励起光を用いた蛍光イメージングにより mCherry 付加タンパク質の局在変化をそれぞれ経時的に計測した(図 1)。計測途中で青色光を 1 回だけ短時間照射したところ、細胞質に局在していた mCherry 蛍光が 2 分以内に形質膜へ移行し、数分かけて形質膜局在が解消する様子が観察された。一方 S6K 活性は青色光照射 15 分後に活性上昇のピークをもつ一過性の活性化を示した。興味深いことに S6K 活性は青色光照射前の時点で細胞間でばらつきがあり、青色光照射後はこのばらつきを保ったまま活性上昇を示した。このことは PI3K 経路に加えて別経路によっても S6K(mTORC1)活性が制御されている可能性を示唆するものである。

##### (3) 細胞周期マーカーセット安定発現細胞株の樹立および細胞周期進行の定量計測



(図 2: 細胞周期マーカーセットを発現する癌細胞)

A459 ヒト肺癌細胞株にレンチウィルスをを用いた遺伝子導入により G0/G1 マーカー(左図赤色)、S/G2/M マーカー(左図緑色)および核マーカー(右図シアン色)を安定発現させた結果。

ヒト由来細胞である MCF10A, A549 および A375 細胞についてレンチウィルスを介した遺伝子導入により細胞周期マーカーセットを安定発現させた。蛍光イメージングにより 3 種類の細胞周期マーカーが核に発現することを確認した(図 2)。加えて 48 時間程度細胞を経時観察することにより、G0/G1 マーカーおよび S/G2/M マーカーの発現量(蛍光強度)が周期的に入れ替わること、すなわち細胞周期進行を可視化できていることを確認した。また細胞の継代を続けても細胞周期マーカーセットが安定して保持されることを確認した。さらに MEK 阻害剤投与により、A549 細胞では MEK 阻害剤投与後最初の細胞分裂は高確率で進行するが娘細胞の多くが G1/G0 基で細胞周期進行が停止することを示唆する観察結果を得た。A549 細胞が MEK

阻害剤抵抗性癌細胞であるが、今後他の MEK 阻害剤感受性癌細胞および正常細胞での細胞周期進行と比較することで、MEK 阻害剤に脆弱性を示す細胞周期の制御点をあぶりだすことができる可能性がある。加えて ERK 活性化系および項目 4-(2) で作製した mTORC1 活性化系と併用することで ERK および mTORC1 が細胞周期のどの制御点に寄与するか解析可能になると期待される。

< 引用文献 >

Hatzivassiliou G. *et al.*, *Nature* (2013) vol.501, pp.232-236.

Komatsu N. *et al.*, *Mol.Biol.Cell.* (2011) vol.22, pp.4647-4656.

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 2 件 )

Naoki Komatsu, Yoshihisa Fujita, Michiyuki Matsuda and Kazuhiro Aoki  
mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells  
*Oncogene* 査読有り vol.34, pp.5607-5616, 2015.  
DOI: 10.1038/onc.2015.16

小松直貴、松田道行

Ras/Rap

生体の科学, 査読無し, 66(5), pp.402-403, 2015.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

小松直貴、松田道行、青木一洋  
KRas 変異および BRAf 変異による癌細胞増殖促進は mTORC1 活性化に収束する  
第 67 回日本細胞生物学会大会 (2015 年 6 月 30 日 ~ 2015 年 7 月 2 日) タワーホール船堀、東京

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

該当無し

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

該当無し

取得状況 ( 計 0 件 )

該当無し

[ その他 ]

ホームページ等

該当無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小松 直貴 (KOMATSU, Naoki)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号 : 30737440

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し