

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15086

研究課題名(和文) 栄養シグナルと炎症を結ぶ新規シグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Deciphering the signal transduction pathway linking nutrition and inflammation

研究代表者

中山 敬一 (Nakayama, Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80291508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は高感度質量分析計による定量的リン酸化プロテオミクス技術を用いて、のべ20000を超えるリン酸化について定量解析を行った結果、mTORC1の下流分子として転写因子FOXK1を含む36分子を同定した。さらにFOXK1によって誘導される遺伝子として、単球の遊走因子である炎症性ケモカインのCCL2を同定した。腫瘍細胞の皮下移植実験の結果、ラパマイシン投与、FOXK1の抑制、CCL2の抑制によって、それぞれTAMの浸潤抑制が認められた。このことより、mTORC1-FOXK1-CCL2経路は栄養シグナルと炎症をつなぎ、がんの発生や進展に重要な役割を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Excessive nutrition gives rise to noninfectious inflammation, a major component of metabolic syndrome, but the molecular mechanism by which nutrient signalling triggers inflammation has remained poorly understood. Here we show that the transcription factor forkhead box K1 (FOXK1) links nutrient signaling mediated by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) to inflammation. FOXK1 was dephosphorylated in response to mTORC1 activation, and such dephosphorylated FOXK1 directly induced expression of CCL2, an inflammatory chemokine. The mTORC1-FOXK1-CCL2 pathway was found to be integral to infiltration of tumor-associated macrophages (TAMs) that support tumor growth. Depletion of FOXK1 in tumor cells thus attenuated TAM infiltration and tumor growth in mice in a manner similar to rapamycin treatment. Our results suggest that FOXK1 plays a central role in nutrient signalling to noninfectious inflammation.

研究分野：分子生物学

キーワード：慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は長期にわたる過栄養が原因であり、一方で近年は「慢性炎症」というキーワードでしばしば語られる。すなわち糖尿病では複数の臓器が慢性炎症状態にあり、それが病態の悪化・慢性化の原因という理解である。予備的解析からわれわれは mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) によって転写因子 FOXK1 のリン酸化が制御され、炎症性ケモカイン CCL2 の転写が誘導されるという新規のシグナル経路 (mTORC1-FOXK1-CCL2 経路) を見出した。既に mTORC1・CCL2 はともに糖尿病の悪化因子として独立に報告されており、このことは、本シグナル経路全体が糖尿病の発症に関わることを示唆するものである。

栄養シグナルの司令塔である mTORC1 の研究は長い歴史があるが、これまで mTORC1 がリン酸化させる下流分子の同定は難しく、その知見は限定的であった。よって必然的に「栄養に応じてどのような現象が起こるのか」についての理解も限定的であった。そこでわれわれは、定量的リン酸化プロテオミクス解析 (Phospho-iTRAQ 解析) を用いて、このシグナル伝達系の全貌を明らかにし、各々の生物学的現象における鍵分子を見つけてきた。本研究では、特に栄養シグナルと慢性炎症惹起の観点から研究を行った。

## 2. 研究の目的

現代は「過栄養」の時代である。メタボリック症候群や糖尿病に代表されるように、過栄養は慢性炎症に結びつくことが推測されているが、その機序の解明はほとんど行われていない。われわれは予備的な研究により、栄養シグナルと炎症を直接繋ぐシグナル伝達経路 (mTORC1-FOXK1-CCL2 経路) を発見した。本申請研究では特に糖尿病の視点から本シグナル経路の重要性を示すことを目的とする。特に、このシグナル伝達の中心的な転写因子 FOXK1 が糖尿病発症に関わるメカニズムの解明と、その治療に関する応用に向けた基礎的な研究を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) FOXK1 欠損マウスの作製と耐糖能の解析

FOXK1 欠損マウスの作製については、転写活性部位をコードする 4 番エクソンと 5 番エクソンの両方を欠損させたマウスを作製した。コンディショナルノックアウトマウス作製を目的とし、4 番エクソンと 5 番エクソンを挟む形で 2 つの loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを構築した。このうち片方の loxP 配列には 2 つの FRT 配列に挟まれた PGK-Neo-pA が連結されており、これをセクションマーカーとして ES 細胞のクローニングを行った。この ES 細胞から

マウス個体を作製し、できたキメラマウスに CAG-FLPe Tg マウスとかけ合わせることで、loxP 配列の Germline への移行を確認すると同時に、2 つの FRT 配列に挟まれた PGK-Neo-pA を除いた。この FOXK1<sup>flox/flox</sup> マウスと aP2-Cre Tg マウス及び Adiponectin-Cre Tg マウスとの掛け合わせを行い、脂肪特異的な FOXK1 欠損マウスを作製した。

### 2) FOXK1 阻害剤の開発と糖尿病の治療応用への展開

FOXK1 阻害剤作製のためのスクリーニング系の構築を目指し、以下の複数の項目について遺伝子改変を行った細胞株を作製した。FOXK1 によって発現が誘導される CCL2 について、ゲノム編集技術を用いて EGFP 遺伝子と置き換えた細胞を作製した。一方で NF-κB 経路は CCL2 の遺伝子発現に大きな影響を及ぼし、微小な活性化がシグナルノイズに繋がる可能性が高いため、これを抑制する目的で RelA を欠損させた細胞を調製した。さらにグローバルな転写抑制によるレポーターの抑制を除去するため、ネガティブコントロールとして CMV-tdTomato の発現カセットをゲノムに挿入した。

## 4. 研究成果

### 1) FOXK1 欠損マウスの作製と耐糖能の解析

FOXK1 を全身で欠損させたマウスを作製したところ、B6 マウスのバックグラウンドにおいて胎生期で発生が止まり、マウスは産まれてこないことがわかった。しかしながら FOXK1<sup>flox/flox</sup> マウスについてはメンデルの法則に従って生まれ、FOXK1 の発現が維持されており、マウスの作製に成功していることが確認された。現在脂肪特異的な FOXK1 欠損マウスへの高脂肪食の長期投与を開始しているが、現在のところコントロールと比べて体重に違いが見られていない。今後は継時的に耐糖能・インスリン抵抗性を測定し、これらを比較してゆく。

### 2) FOXK1 阻害剤の開発と糖尿病の治療応用への展開

上記の複数の複雑な遺伝子改変について、ゲノム編集技術を行うことでこれを成功した。CCL2 を EGFP に置き換えた細胞株で EGFP の発現を確認し、また RelA を欠損した細胞においては TNF-α 刺激により NF-κB 経路を活性化させた際にも CCL2 の発現上昇が完全に抑えられることを確認した。しかしながら、インスリンによる EGFP のシグナル増強がクリアには観察されず、創薬スクリーニングをワークさせる上で課題が残されている。現在はこれを解決するため、EGFP シグナルの変動を増幅するための工夫を行っており、この問題を解決することで、薬剤スクリーニングの系は完成する。

## 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5件)

- ① Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y.: Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neurosci.* 18: 657-665 (2015). 査読有. DOI: 10.1038/nn.3989
- ② Watanabe, K., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: FBX021 mediates the ubiquitylation and proteasomal degradation of EID1. *Genes Cells* 20: 667-674 (2015). 査読有. DOI: 10.1111/gtc.12260
- ③ Tsukada, Y., Akiyama, T., Nakayama, K. I.: Maternal TET3 is dispensable for embryonic development but is required for neonatal growth. *Sci. Rep.* 5: 15876 (2015). 査読有. DOI: 10.1038/srep15876
- ④ Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: FBXL12-mediated degradation of ALDH3 is essential for trophoblast differentiation during placental development. *Stem Cells* 33: 3327-3340 (2015). 査読有. DOI: 10.1002/stem.2088
- ⑤ Nita, A., Nishiyama, M., Muto, Y., Nakayama, K. I.: FBXL12 regulates T-cell differentiation in a cell-autonomous manner. *Genes Cells* in press. (2016). 査読有. DOI: 10.1111/gtc.12360

[学会発表] (計10件)

- ① 中山敬一. 全タンパク質の絶対定量情報に基づくがん代謝シフトの数理科学的解明. 第29回日本医学会総会 2015 関西. 京都. (4/12, 2015).
- ② 中山敬一. 全タンパク質絶対定量がもたらす生命科学革命. 第58回日本神経化学会大会. 大宮. (9/11, 2015).
- ③ 中山敬一. 次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. 第40回医用マスペクトル学会年会. 浜松. (9/17, 2015).
- ④ 中山敬一. がん幹細胞の細胞周期調節機構の解明と治療への応用. 第74回日本癌学会学術総会. 名古屋. (10/9, 2015).
- ⑤ 中山敬一. がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第26回日本消化器癌発生学会総会. 米子.

(11/20, 2015).

- ⑥ 中山敬一. 次世代プロテオミクスが解き明かす生命システムの全体像. 第38回日本分子生物学会年会. 神戸. (12/3, 2015).
- ⑦ 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).
- ⑧ 中山敬一. 細胞周期から見たがん幹細胞の治療抵抗性のメカニズム. 日本がん分子標的治療学会第11回トランスレーショナルリサーチワークショップ. 東京. (1/15, 2016).
- ⑨ Nakayama, K. I. Large-scale targeted proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism. The 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. Maui, USA. (2/18, 2016).
- ⑩ 中山敬一. 次世代プロテオミクスによるがん代謝シフトの全体像の解明. CRESTシンポジウム「トランスオミクスによる生命システムの解明」. 東京. (3/3, 2016).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 癌の処置のための方法  
発明者: 中山敬一、三森功士  
権利者: 国立大学法人九州大学  
種類: PCT 出願  
番号: PCT/JP2015/86383  
出願年月日: 2015年12月25日  
国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

なし

[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

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)  
九州大学生体防御医学研究所・主幹教授  
研究者番号: 80291508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者  
なし