

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19015

研究課題名(和文)がん細胞におけるmTORシグナル伝達系の役割

研究課題名(英文)The role of mTOR signaling in cancer cells

研究代表者

佐藤 龍洋(Sato, Tatsuhiro)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70547893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRheb-mTORシグナル伝達経路による細胞がん化、悪性化に及ぼす影響を解析した。その結果、Rhebの新たなエフェクターとしてCADを同定、DNA複製の基質供与に関わる可能性を明らかにした。また、mTOR複合体の1つ、mTORC2がFilamin Aをリン酸化し、メラノーマの細胞運動制御に関わることを明らかにした。さらに、Rheb-mTORを制御するSmgGDSや、mTOR複合体1を活性化させるMTOR遺伝子変異を乳がん、腎がんサンプルより同定し、mTOR経路を介した細胞がん化機構の解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of Rheb-mTOR signaling pathway in tumor development and malignancy was analyzed. We found that Rheb binds and activates CAD, leading to increased nucleotide pool that is required for DNA replication. Moreover, filamin A was found to be phosphorylated by mTOR complex 2 to regulates the migration in melanoma cells. We also revealed SmgGDS as a regulator of Rheb-mTOR signaling pathway and MTOR gene mutations, that activates mTOR complex 1, in breast cancer and renal cell carcinoma. These findings is suggested to contribute to elucidating the molecular mechanism by which mTOR signaling promotes tumor formation.

研究分野：がん細胞生物学

キーワード：Rheb mTOR

1. 研究開始当初の背景

Rheb-mTOR シグナル伝達経路は、生体内の栄養状態に反応して、細胞増殖を制御する。その制御機構の破たんは、がんの発症と密接に関係するとが示唆されているにもかかわらず、Rheb-mTOR シグナル伝達経路が細胞がん化にどうつながるのか、また Rheb-mTOR 活性化や細胞内局在の変化がどのように制御されているかなど、いまだ不明な点が多く残されていた。

次世代シーケンサーを用いたがんゲノム解析により、種々のがんにおける mTOR 遺伝子変異が次々と見つかってきていたが、mTOR の遺伝子変異とその機能の関連性についてはほとんど解明されていなかった。

そこで本研究では、Rheb-mTOR シグナル伝達に關与する新規タンパク質の解析、mTOR シグナル伝達経路を遮断するクルクミンの作用、および mTOR 活性化に影響を与えるがん遺伝子変異に着目し、これを解析した。具体的には、(1) Rheb の新規標的因子として我々が同定したピリミジン合成律速酵素 CAD に着目し、Rheb-CAD 新規経路による細胞への影響やがん化への関与の可能性の検討を行った。(2) また、mTOR 複合体の1つである mTORC2 の結合タンパク質として同定した filamin A について解析し、がん細胞における mTORC2-filamin A の役割を解析した。(3) さらに、Rheb-mTOR の局在や活性化に關与する新規タンパク質の探索・同定とその分子機構の解析、(4) Rheb-mTORC1 の抑制により大腸がん細胞の増殖を抑制すると考えられているクルクミンの分子基盤の解析、および(5) がん細胞における *MTOR* 遺伝子変異の解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞において高頻度に活性化される Rheb-mTOR の分子機構を詳細に検討することにより、細胞がん化やがん細胞増殖機構の一端を解明し、新規治療法の開発や治療標的因子の同定に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞は適切な培地を用い、すべて 37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。(2) 細胞内ピリミジンヌクレオチド量は SAX 強アニオン交換カラムを用いて HPLC 装置により測定した。(3) がん細胞運動は蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により解析した。(4) クルクミンによる細胞内リン酸化タンパク質の変化は、クルクミンで処理した細胞、未処理の細胞からそれぞれリン酸化タンパク質を濃縮した後、これらのタンパク質をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、等電点電気泳動、およびポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、それぞれのタンパク質のリン酸化量を蛍光強度の違いにより比較・同定した。(5) mTOR 遺伝子

変異の機能解析においては、英国サンガー研究所に登録された遺伝子変異データベースを参照し、対象となる遺伝子変異については mTOR cDNA をもとに PCR で同様の変異を挿入した後、培養細胞にその遺伝子を導入して細胞内シグナル伝達経路への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Rheb 結合タンパク質 CAD の解析

CAD はピリミジンヌクレオチド合成に關わるタンパク質である。このことから、Rheb は CAD を介して細胞内ピリミジンヌクレオチド量を増大させ、がん細胞で活発に行われる DNA 複製の材料を供給していると予想された。そこで、Rheb が恒常的に活性化した TSC2 ノックアウトマウス由来腎臓がん細胞(E8)、およびその細胞に TSC2 を再発現させた細胞(T2-5)を用いて、細胞内ピリミジンヌクレオチド量を測定した。その結果、E8 においてピリミジンヌクレオチドである UTP、CTP 量の上昇が見られた(図1左)。

また、T2-5 細胞をインスリンで刺激して、より生理的な条件で TSC2 を抑制し Rheb-mTORC1 を活性化させた場合にもピリミジンヌクレオチド量の上昇が見られたが、この上昇は mTORC1 阻害剤ラパマイシンではある程度の抑制が見られるものの完全には抑制できず、mTORC1 非依存的に Rheb によるピリミジンヌクレオチド量の制御がうかがえた(図1右)。一方、プリンヌクレオチドである ATP、GTP 量の上昇は観察されなかった。これらの結果から、Rheb-CAD シグナル伝達経路が、mTOR 非依存的にピリミジンヌクレオチド合成を促進すると考えられた。

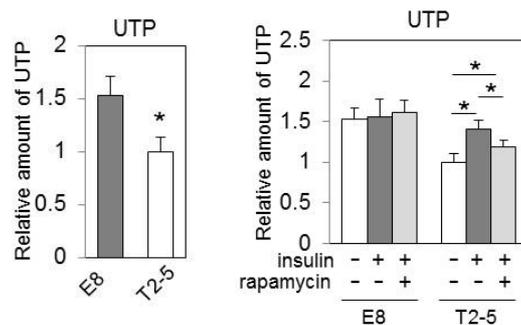


図1. Rheb 活性化細胞における細胞内ピリミジン量の増大

(左) TSC2 ノックアウトマウス由来腎臓がん細胞(E8)、およびその細胞に TSC2 を再発現させた細胞(T2-5)を用いて、ピリミジンヌクレオチドである UTP の細胞内存在量を測定した。(右)インスリン刺激、および mTORC1 阻害剤ラパマイシンを添加した時の細胞内 UTP 量を測定した。*, P<0.05

(2) がん細胞における mTORC2-filamin A 新規経路の役割の解析

mTORC2 による filamin A リン酸化をつきとめ、この生理的意義を解析した。Filamin A は細胞と細胞外基質の接着に関わる足場タンパク質インテグリンと結合するが、mTORC2 にリン酸化されない filamin A の変異体は野生型 filamin A と比較してインテグリンとの結合が弱かった。そこで、filamin A を発現しないメラノーマ細胞 (M2 細胞) を用いて filamin A を発現させ、野生型 (wt) と比較して非リン酸化型 (S2152A) が運動先端でインテグリンと結合し、運動促進に必要な接着斑を形成するか観察した。その結果、非リン酸化型変異体 S2152A は野生型 (wt) と異なり、メラノーマ細胞の運動先端に局在するものの、接着斑のマーカである vinculin とは共局在しなかった (図 2)。このことから、mTORC2 による filamin A リン酸化は接着斑を介したメラノーマ細胞の運動に重要な働きをすると考えられた。がん細胞の運動は、がんの浸潤や転移に関与すると考えられており、mTORC2 の活性化はメラノーマにおいて、これらの働きに関与すると示唆される。

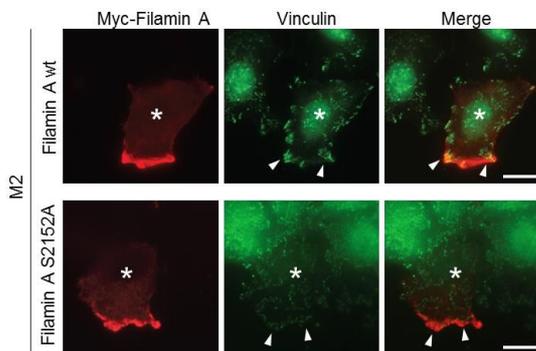


図 2. Rheb 活性化細胞における細胞内ピリミジン量の増大
Filamin A を発現しないメラノーマ細胞 (M2 細胞) に Filamin A の野生型 (WT) もしくは非リン酸化型 (S2152A) を発現させ、その局在を Myc 抗体で検出した。また、運動先端における接着斑の形成を vinculin 抗体で検出した。* は細胞の核、矢頭は細胞の運動先端を示す

(3) Rheb の新規結合因子 SmgGDS の機能解析

我々が Rheb と結合するタンパク質として新規の同定した SmgGDS について、その結合様式を解析したところ、SmgGDS は Rheb の不活性化型に強く結合することを見出した。また、また、Rheb に修飾される脂質依存的に結合することを明らかにした。次に、SmgGDS が Rheb の活性に影響を及ぼすか検討したところ、Rheb の活性には影響を及ぼさないことがわかった。しかし興味深いことに、SmgGDS の細胞内発現をノックダウン法により抑制したところ、Rheb の局在が変化することが新

にわかった。

SmgGDS の細胞内発現をノックダウンにより抑制したところ、Rheb による mTOR 活性化が低下した (図 3)。このことから、SmgGDS による Rheb の局在制御は mTORC1 活性化に重要な役割を果たすと示唆された。これらの結果から、SmgGDS は mTOR 経路が活性化された種々のがんに対して新たな治療ターゲットとなることが期待された。

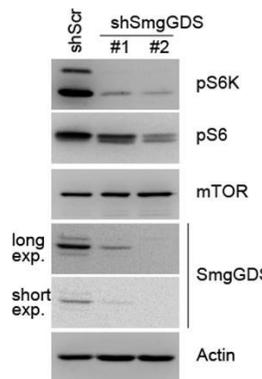


図 3. SmgGDS ノックダウンによる mTORC1 シグナル伝達経路の抑制
SmgGDS をノックダウン (shSmgGDS #1 および shSmgGDS #2) したところ、コントロール (shScr) と比較して mTORC1 基質の S6K リン酸化 (pS6K)、S6 基質の S6 リン酸化 (pS6) が共に低下した。

(4) クルクミンの分子基盤の解析

大腸がん細胞株である SW480 と SW620 を用いてクルクミンを作用させたところ、濃度依存的に細胞増殖を抑制した。また、これらの細胞では mTOR 複合体の 1 つである mTORC1 の活性化が有意に阻害された。そこでクルクミンを処理した細胞内でのシグナル伝達経路の変化を蛍光 2 次元電気泳動解析により網羅的に解析した (図 4)。

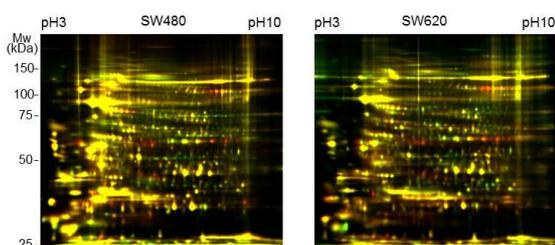


図 4. クルクミン処理により変化するリン酸化タンパク質の網羅的解析

クルクミンを処理した細胞のリン酸化タンパク質を赤色蛍光色素で、未処理の細胞のリン酸化タンパク質を緑色蛍光色素でラベルした後、それらを混合して 2 次元電気泳動で展開した。緑で示されるスポットがクルクミン処理によりリン酸化が低下するタンパク質、赤は反対にリン酸化が上昇するタンパク質、黄色で示されるスポットはリン酸化に変化が起きないタンパク質と推測される。

リン酸化に変動のあったスポットを切り出し、LC-MS/MS装置によりタンパク質を同定した結果、クルクミンは mTORC1 経路だけでなく非常に多くのシグナル伝達経路に影響を及ぼすことがわかった。また、クルクミンは p53 のさまざまな部位のリン酸化だけでなく、MAPK 経路タンパク質のリン酸化を上昇させたことから、この経路を活性化すると考えられた。MAPK 経路はがん細胞の増殖促進に関わることから、クルクミンの抗がん作用の減弱に関わると予測された。そこで、クルクミンに加えて MAPK 阻害剤を併用したところ、大腸がん細胞 SW480, SW620 の増殖阻害に相加的な効果が得られた(図5)。本研究結果は、クルクミンが mTOR 活性を阻害するだけでなく、MAPK 阻害剤との併用により大腸がんに対する治療に有効である可能性が示唆された。

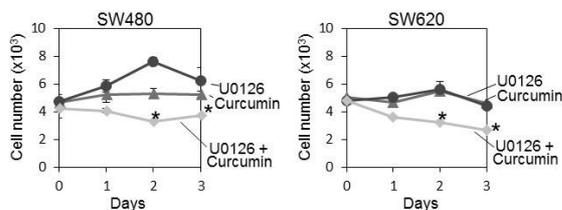


図5. クルクミンと U0126 の併用による大腸がん細胞の増殖抑制効果
大腸がん細胞 SW480(左)および SW620(右)をそれぞれクルクミン、MAPK 阻害剤 U0126、およびその両方の存在下で培養し、細胞数をプロットした。*, P<0.05

(5) MTOR 遺伝子変異の解析

英国サンガー研究所に登録された遺伝子変異データベースから、腎臓がん、子宮体がんにおける MTOR 遺伝子変異を抽出し、その変異が mTOR タンパク質および mTOR シグナル伝達経路にどのような影響を与えるか検討した。



図6. MTOR 遺伝子変異の解析
子宮体がん(上段) 腎臓がん(下段)において報告されている MTOR 遺伝子変異を解析し、mTORC1 活性を測定した。一番左が野生型(WT)、左から2番目が既知の活性化変異体(E2419K)の活性を示す。3番目以降の赤色で示したものが変異による活性化を表している。

その結果、複数の変異が mTOR の活性を数倍上昇させることが明らかとなった(図6)。がん細胞における mTOR 活性化機構は不明な点が多いが、本研究により、活性化機構のひとつとして MTOR 遺伝子変異の可能性が明らかとなった。今後、MTOR 遺伝子変異を検出することによって、特異的な阻害剤による有効な分子標的治療が可能となることが期待される。

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 2件)

Sato T, Higuchi Y, Shibagaki Y, Hattori S. Phosphoproteomic Analysis Identifies Signaling Pathways Regulated by Curcumin in Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.* 37: 4789-4798. 2017. 査読有

Sato T, Ishii J, Ota Y, Sasaki E, Shibagaki Y, Hattori S. Mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 regulates filamin A-dependent focal adhesion dynamics and cell migration. *Genes Cells.* 21: 579-593. 2016. 査読有

[学会発表](計 3件)

関戸 好孝、松下 明弘、向井 智美、佐藤 龍洋 「Transcriptional coactivator TAZ enhances malignant phenotypes of mesothelioma cells」EMBO workshop 'The Hippo pathway across species and disciplines'、2017年

佐藤 龍洋 「SmgGDS による mTORC1 活性化がん細胞の調節」第75回日本癌学会学術総会、2016年

佐藤 龍洋、玉野井 冬彦、服部 成介 「Rheb-mTORC1 によるヌクレオチド生合成制御機構の解析」第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会、2015年

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 龍洋 (Sato, Tatsuhiro)

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍

学部・主任研究員

研究者番号：70547893

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし