

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06018

研究課題名(和文) アミノ酸エンドサイトーシスの分子機序と生理機能

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and physiological function of amino acid endocytosis

研究代表者

渋谷 周作 (Shibutani, Shusaku)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：20534473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：mTORC1は細胞内の生合成を活性化させる主要な代謝シグナル複合体である。本研究では、様々な腫瘍由来細胞株においてエンドサイトーシス阻害剤が細胞増殖抑制作用とmTORC1活性抑制作用を示すことが確認された。また、エンドサイトーシス阻害剤は腫瘍細胞特異的にS期の細胞を増加させ、アポトーシスを誘導することが確認された。

一方、アミノ酸飢餓時にはエンドサイトーシス活性が増加することが報告されており、細胞が必要なアミノ酸を確保するためのメカニズムであると考えられているが、この現象にエンドサイトーシス関連遺伝子のダイナミンが関与することを、ロックアウト細胞を用いた実験により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、がん細胞に対するエンドサイトーシス阻害剤の細胞増殖抑制作用と、がん細胞にとって重要なアミノ酸確保経路であるエンドサイトーシスの、より詳細なメカニズムが明らかとなった。エンドサイトーシス阻害剤は細胞の栄養取り込み阻害剤として働き、本研究で示されたように栄養要求性の高いがん細胞への対抗するための手段として有効である可能性がある。さらに、エンドサイトーシス活性の調節により適度な栄養取り込みの抑制が実現できれば、過栄養によって引き起こされる肥満や生活習慣病(糖尿病、高血圧、脂質異常症など)の治療薬・予防薬として有効である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：mTORC1 is a major metabolic signaling complex that activates cellular biosynthesis. In this study, we found that endocytosis inhibitors suppressed cell proliferation and mTORC1 activity in various tumor-derived cell lines. It was also confirmed that endocytosis inhibitors increased the number of S-phase cells and induced apoptosis in a tumor-specific manner.

On the other hand, it has been reported that endocytosis activity increases during amino acid starvation, which is thought to be a mechanism to ensure that cells obtain necessary amino acids. Experiments using dynamin-1/2/3 triple knockout cells revealed that dynamin is involved in this phenomenon.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス アミノ酸 ダイナミン 栄養シグナル mTORC1

## 1. 研究開始当初の背景

mTORC1 はアミノ酸-タンパク質代謝を担う主要なシグナル複合体である。1990 年代より mTORC1 がアミノ酸によって活性化されることが知られていたが、2008 年頃からの一連の研究報告により (Sancak et al. 2008 Science など)、アミノ酸がリソソームの内腔に到達した時に mTORC1 を活性化させることが判明した。しかし、どのような経路でアミノ酸がリソソーム内に入るのかが依然として不明であった。本申請者はこの点に注目して研究を進め、細胞外液取り込み機構であるエンドサイトーシスによりアミノ酸がリソソーム内腔に輸送され、mTORC1 を活性化するというメカニズムを明らかにした (Shibutani et al. 2017 JBC)。このことから、エンドサイトーシスをターゲットとすることで、細胞が利用するアミノ酸などの栄養素の量を調節し、細胞機能を制御できる可能性が考えられた。

エンドサイトーシス阻害剤である Dynasore (ダイナミン阻害剤) は、ヒト肺がん由来の A549 細胞 (Shen et al. 2018 BBRC) やヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞 (Lee et al. 2016 Anticancer Res.) などに対して細胞増殖抑制作用を示すことが報告されており、その抗腫瘍効果が期待されている。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多く、エンドサイトーシス阻害剤の抗がん効果の臨床応用にはより詳細な検討が必要である。

一方、がん細胞がアミノ酸飢餓時にエンドサイトーシスによる細胞外栄養素の取り込み活性を増加させることが知られている (Palm et al. 2015 Cell)。このメカニズムより、がん細胞は細胞外液に含まれるタンパク質を取りこみ、細胞内で分解することで、自身の活発な生合成に必要なアミノ酸を確保していると考えられている。この際、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスが用いられると考えられているが、その他の種類のエンドサイトーシスの関与は不明であり、検証が必要である。

## 2. 研究の目的

本申請研究においては、アミノ酸エンドサイトーシスのより詳細なメカニズム、および細胞機能におけるエンドサイトーシスの重要性を理解することを目的とする。具体的には、本研究においては、がん細胞に対するエンドサイトーシス阻害剤の細胞増殖抑制作用と、がん細胞にとって重要なアミノ酸確保経路であるエンドサイトーシスの、より詳細なメカニズムを検討した。

エンドサイトーシスは細胞の栄養取り込み機能として働き、栄養要求性の高いがん細胞への対抗するための手段として有望だけでなく、適度な栄養取り込みの抑制が実現できれば、過栄養によって引き起こされる肥満や生活習慣病(糖尿病、高血圧、脂質異常症など)の治療薬・予防薬として有効である可能性がある。

## 3. 研究の方法

16 種類の上皮系腫瘍細胞株および造血管腫瘍細胞株を対象に、生細胞数測定の指標として用いられる MTT アッセイを行い、Dynasore の細胞増殖抑制作用の検証を行った。そのうち、Dynasore への高感受性が確認されたヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat) を用い、Dynasore による細胞周期の変化およびアポトーシスの誘導をフローサイトメトリーを用いて検証した。また、各種の細胞内シグナル経路をウェスタンブロット法で検証した。Dynasore で活性化されたシグナル経路については、それらの阻害剤を Dynasore と同時投与し、効果を確認した。

アミノ酸飢餓時のエンドサイトーシス活性増加にダイナミンや各種の細胞内シグナルが関与するかどうかを確認するため、ダイナミン 1/2/3 トリプルノックアウト MEF 細胞を用いて実験を行った。細胞外液取り込み活性の評価は、蛍光標識デキストランを細胞に投与し、フローサイトメトリーを用いて行った。

## 4. 研究成果

MTT アッセイにより様々な腫瘍細胞株に対する Dynasore の増殖抑制効果を確認したところ (図 1) Dynasore に対する感受性は、上皮系腫瘍よりも造血管腫瘍において感受性が高い傾向が認められた (data not shown)。比較対象として用いた Torin 1 (mTORC1/2 阻害剤) も細胞増殖抑制効果を示したが (図 1) Torin 1 と Dynasore の mTORC1 抑制効果を比較したところ、Dynasore の細胞増殖抑制効果は mTORC1 抑制によるものだけではないことが示された (data not shown)。

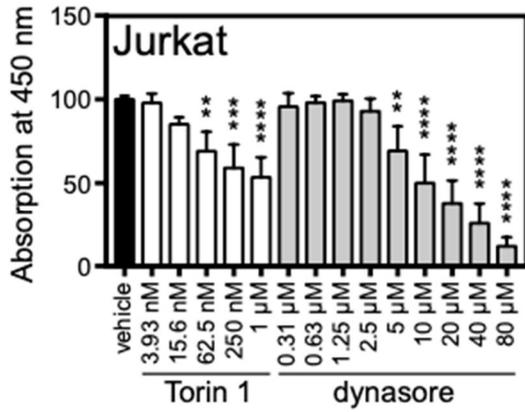


図 1 : MTT アッセイによる細胞代謝活性の測定

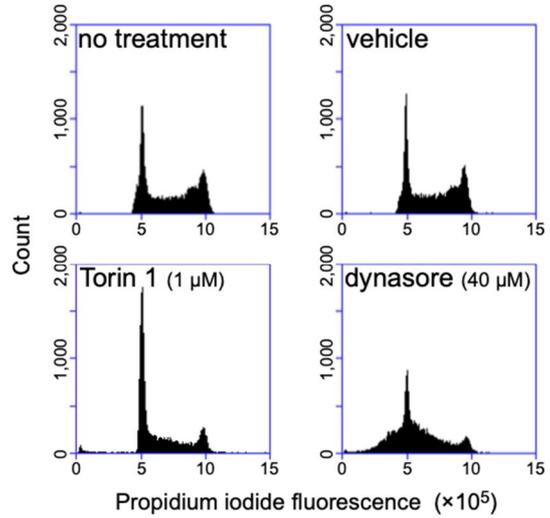


図 2 : フローサイトメトリーによる DNA 量の測定

次に、Jurkat 細胞を用いて細胞周期の変化およびアポトーシスの誘導をフローサイトメトリー法で検証したところ、Sub-G1 期細胞および S 期細胞の増加が確認された (図 2)。Sub-G1 期細胞の増加から、Dynasore 投与によりアポトーシスが誘導されていることが示唆された。さらに TUNEL 染色を行ったところ、実際に Dynasore 投与によりアポトーシスが誘導されていることが確認された (図 3)。これらの細胞においては、DNA ダメージ応答を示唆する Histone H2A.X と Chk1 のリン酸化が認められた (図 4)。これらの結果から、Dynasore の投与により DNA 複製が

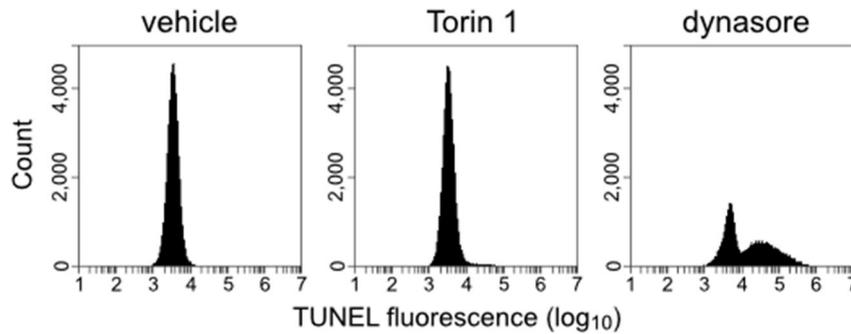


図 3 : フローサイトメトリーによるアポトーシスの検証

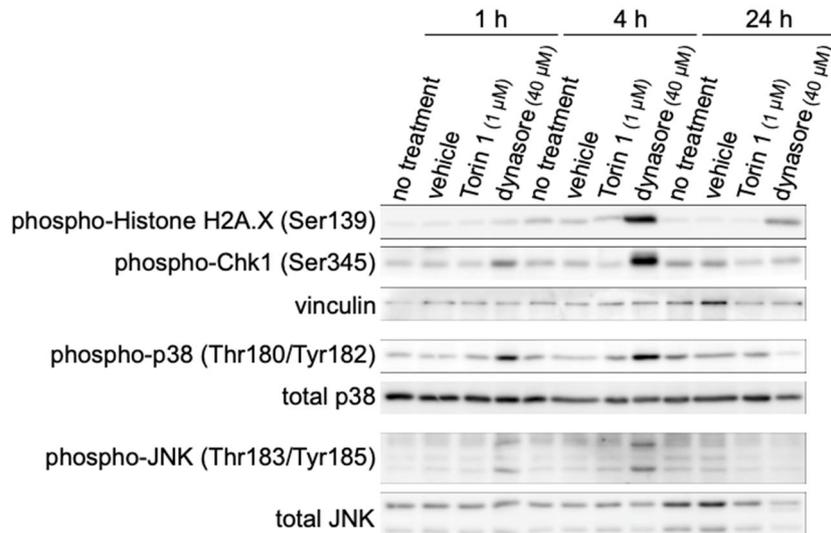


図 4 : dynasore による Chk1, p38, JNK シグナルの活性化

阻害されていることが推察された。また Dynasore によりストレス MAPK である p38 と JNK の

リン酸化が認められた(図4)。そこで、p38、JNK、DNA ダメージ応答経路の主要分子である ATR および ATM に対する阻害剤を Dynasore と同時投与したところ、ATR 阻害剤の使用時に Dynasore によるアポトーシスが增強された(図5)。一方、正常単核球においては Sub-G1 期細胞の増加、アポトーシスの誘導、Histone H2A.X のリン酸化、p38 のリン酸化などの反応が認められなかったことから (data not shown) Dynasore の細胞増殖抑制効果が腫瘍細胞に特異的であることが示唆された。

以上の結果から、エンドサイトーシス阻害剤が造血器腫瘍に対する抗がん剤として有用である可能性が示され、ATR 阻害剤による DNA ダメージ応答の抑制がエンドサイトーシス阻害剤の作用を增強することが明らかとなった。

また、ダイナミン 1/2/3 トリプルノックアウト MEF 細胞を用いて、蛍光標識デキストランの取り込み活性を確認したところ、ノックアウト前の細胞においてはアミノ酸飢餓により取り込み活性が増加していたのに対し、ノックアウト後の細胞においてはアミノ酸飢餓に対して取り込み活性が変化しなかった (data not shown)。このことから、アミノ酸飢餓時の細胞外液取り込み亢進にはダイナミンが関与していることが明らかとなった。アミノ酸飢餓時のエンドサイトーシス活性増加のメカニズムについては、各種の細胞内シグナルの関与や細胞周期への影響など、より詳細を解明すべく、現在検討を進めている。

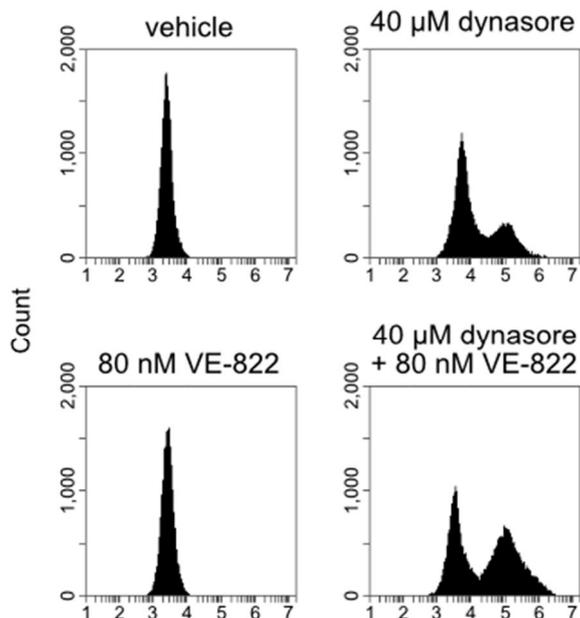


図5：ATR 阻害剤による dynasore 誘導性アポトーシスの增強

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Igase Masaya, Fujiki Noriyuki, Shibutani Shusaku, Sakai Hiroki, Noguchi Shunsuke, Nemoto Yuki, Mizuno Takuya	4. 巻 388
2. 論文標題 Tenovin-6 induces the SIRT-independent cell growth suppression and blocks autophagy flux in canine hemangiosarcoma cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111810 ~ 111810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.111810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igase Masaya, Shibutani Shusaku, Kurogouchi Yosuke, Fujiki Noriyuki, Hwang Chung Chew, Coffey Matt, Noguchi Shunsuke, Nemoto Yuki, Mizuno Takuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Combination Therapy with Reovirus and ATM Inhibitor Enhances Cell Death and Virus Replication in Canine Melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 49 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2019.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onishi Keiko, Shibutani Shusaku, Goto Nanami, Maeda Yuki, Iwata Hiroyuki	4. 巻 260
2. 論文標題 Amino acid starvation accelerates replication of Ibaraki virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 94 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 TSURUTA Yuya, SHIBUTANI Shusaku, WATANABE Rie, IWATA Hiroyuki	4. 巻 81
2. 論文標題 Apoptosis induced by Ibaraki virus does not affect virus replication and cell death in hamster lung HmLu-1 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 197 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Nanami, Shibutani Shusaku, Miura Noboru, Watanabe Rie, Iwata Hiroyuki	4. 巻 552
2. 論文標題 Thapsigargin suppresses alpha 1-acid glycoprotein secretion independently of N-glycosylation and ER stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Nobuyuki, Shibutani Shusaku, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 552
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 191 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末村美希, 渋谷周作, 岩田祐之
2. 発表標題 エンドサイトーシス阻害剤によるがん細胞増殖抑制メカニズムの検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊賀瀬雅也, 藤木範之, 渋谷周作, 酒井治, 根本有希, 水野拓也
2. 発表標題 SIRT阻害剤Tenovin-6は犬血管肉腫細胞に対してリソソーム機能障害を誘導する
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibutani S
2. 発表標題 アミノ酸取り込みによる細胞内代謝シグナルの駆動
3. 学会等名 山口大学研究拠点形成シンポジウム「がんの増殖制御」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibutani S
2. 発表標題 細胞内代謝の新規制御メカニズムの発見とがん細胞への応用
3. 学会等名 山口大学研究推進体「小動物のガンに対するトランスレーショナル研究ユニット」第2回シンポジウム「さまざまな視点からガンを斬る」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibutani S
2. 発表標題 エンドサイトーシスとアミノ酸-タンパク質代謝制御機構の関係
3. 学会等名 第1回HiHA & HIRAKU若手研究者Workshop (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田祐希、大西慶子、鶴田祐哉、渋谷周作、岩田祐之
2. 発表標題 イバラキウイルスの宿主細胞侵入経路の解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------