

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07255

研究課題名（和文）新規mTORシグナル伝達機構による細胞がん化促進機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of cellular tumorigenesis by a novel mTOR signaling pathway

研究代表者

佐藤 龍洋（Sato, Tatsuhiro）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：mTORC1の活性を制御する因子SmgGDSの分子機序を解明した。また、mTORC1によって直接リン酸化されるタンパク質2種についてそのリン酸化部位を決定した。次に悪性中皮腫について解析を行い、mTORC1活性調節に関わる遺伝子群の発現変動を同定し、患者予後との関連を明らかにした。また、SmgGDSの発現抑制によって悪性中皮腫細胞内のmTORC1活性が阻害され、腫瘍の増殖が阻害されることを細胞株を用いた実験、モデルマウスを用いた実験によって明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はmTORC1調節機構の一端を明らかにしている。mTORC1は細胞増殖やオートファジーの制御を通じて生体の多くの機能に関与しており、本研究成果はそれらの分子機序の解明につながると期待できる。また、mTORC1制御機構の破綻はがんをはじめ、種々の疾患と密接に関連しており、これら疾患の分子機序の解明や、悪性中皮腫をはじめとする種々のがんに対する新たな治療戦略の構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of mTORC1 regulation by SmgGDS was revealed. Further, the phosphorylation sites of two proteins that are directly phosphorylated by mTORC1 were identified. Analysis of malignant mesothelioma identified changes in the expression of genes involved in the regulation of mTORC1 activity, which were associated with the prognosis of mesothelioma patients. We found that suppression of SmgGDS expression inhibits mTORC1 activity in malignant mesothelioma cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rheb SmgGDS mTOR mTORC1

1. 研究開始当初の背景

mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) は 2 つの異なる複合体 mTORC1 (mTOR complex 1) および mTORC2 (mTOR complex 2) を形成し、多様な細胞機能を制御するセリン・スレオニンキナーゼである(Saxton et al., *Cell*, 2017)。mTORC1 は細胞の増殖促進、オートファジー抑制などを担うが、がん細胞では mTORC1 制御機構がしばしば破たんしており、全がんの約 70%で mTORC1 の異常活性化が見られる (Forbes et al., *Nucleic Acids Res.*, 2011)。がん細胞の mTORC1 活性化の原因としては *PTEN*、*PIK3CA* などの PI3K-mTOR 関連遺伝子の変異などが挙げられるが、活性化分子機構が不明のがんも多い。

研究代表者は当初、悪性中皮腫に着目し、Rheb-mTORC1 活性化機構の解析を行っていた。悪性中皮腫はアスベスト曝露により発症する希少ながんの一種であり、患者の予後が極めて不良であることから、治療標的薬の開発が急務であるとされている。悪性中皮腫においては、mTORC1 活性化が高頻度で見られることが知られており、マウスを用いた実験においても mTORC1 の人為的な高活性化によって中皮腫発症が認められるなど、mTORC1 活性化と悪性中皮腫の発症に強い関連があることが示唆されてきた (Guo et al., *Oncogene*, 2014)。しかし、mTORC1 関連因子の遺伝子変異は稀であり、mTORC1 が悪性中皮腫細胞内でどのようにして活性化し、細胞がん化に寄与しているのかについて調べる必要があった。

研究代表者らは研究開始前に、mTORC1 活性化因子である Rheb に直接結合する新規タンパク質として SmgGDS を同定していた。このタンパク質は mTORC1 シグナルの活性調節に関与すると考えられたが、その分子機序は分かっていなかった。そこで、悪性中皮腫を含む種々の mTORC1 活性化を伴う腫瘍において SmgGDS の関与とその分子機構を調べ、SmgGDS が新たな治療標的となりうるか検討することとした。また、研究代表者らは他にも mTORC1 の新規基質候補を 3 つ同定しており、mTORC1 シグナル伝達経路におけるこれらの未知の機能を持つタンパク質への修飾を介した細胞がん化機構の可能性について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞における mTORC1 シグナル伝達機構の新たな制御機構を解明し、新規分子標的としての可能性を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) mTORC1 による目的のタンパク質がリン酸化されるかについては試験管内反応により検討した。mTORC1 は免疫沈降法により精製し、目的のタンパク質は大腸菌から精製してこれらを混合し、反応溶液内で反応させてリン酸化の程度を検出した。

(2) SmgGDS による Rheb の細胞内局在の制御については、細胞分画法と顕微鏡観察により検討した。細胞分画は細胞をダウンス型ホモジナイザーで破碎した後、遠心法により各画分を得た。

これらのサンプルをウエスタンブロットングに供し、Rheb の局在量を検討した。顕微鏡観察においては、蛍光タンパク質 GFP と融合した Rheb を細胞内に発現させ、SmgGDS 発現量変化による Rheb の局在を観察した。

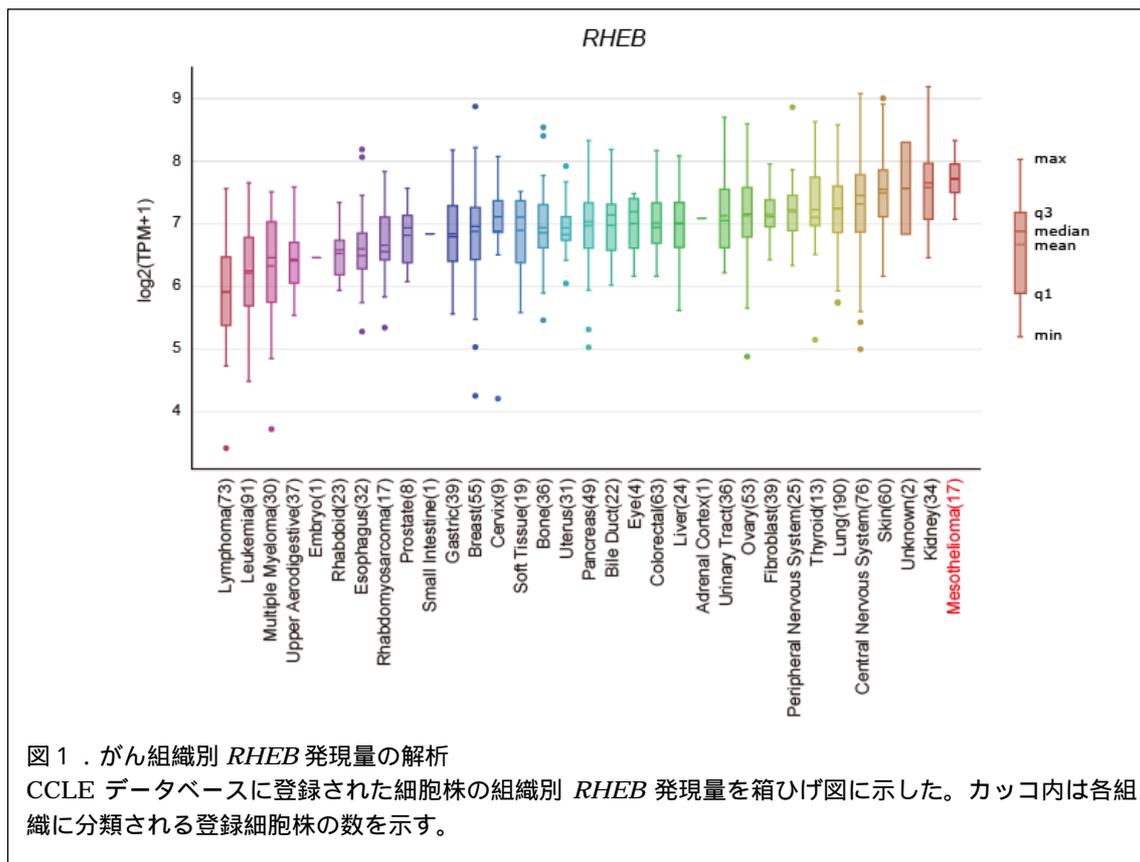
(3) SmgGDS の発現量変化による mTORC1 の活性は、mTORC1 シグナル伝達経路である S6K, S6 のリン酸化量により測定した。mTORC1 が高活性化した悪性中皮腫細胞株として PTEN 遺伝子発現が欠損した ACC-MESO-1, Y-MESO-25 細胞株を使用した。

(4) 悪性中皮腫モデルマウスは、ヌードマウス胸腔内に悪性中皮腫細胞を移植して作製した。腫瘍増殖のモニタリングのために移植細胞に luciferase 遺伝子を導入し、マウス体内での腫瘍細胞内 SmgGDS 発現抑制のために Tet-On SmgGDS shRNA 発現システムを構築した。これらを用いてマウス内腫瘍増殖を経時的に測定し、治療標的としての SmgGDS について評価した。

4. 研究成果

(1) mTORC1 新規基質候補 3 種はいずれも試験管内反応により mTORC1 によってリン酸化され、mTORC1 の基質となることが示された。また、mTORC1 によりリン酸化されるアミノ酸部位を特定した。これらの結果から、新規 mTORC1 シグナル伝達経路とこれらによる新たな機能制御の可能性が示唆された。

(2) 悪性中皮腫における mTORC1 活性化の原因について検討するため、データベースを用いた mTORC1 活性化関連遺伝子の発現量を解析したところ、他のがん種と比較して悪性中皮腫細胞株群における RHEB の発現量が高いことがわかった(図1)。また、悪性中皮腫患者の約 4 割

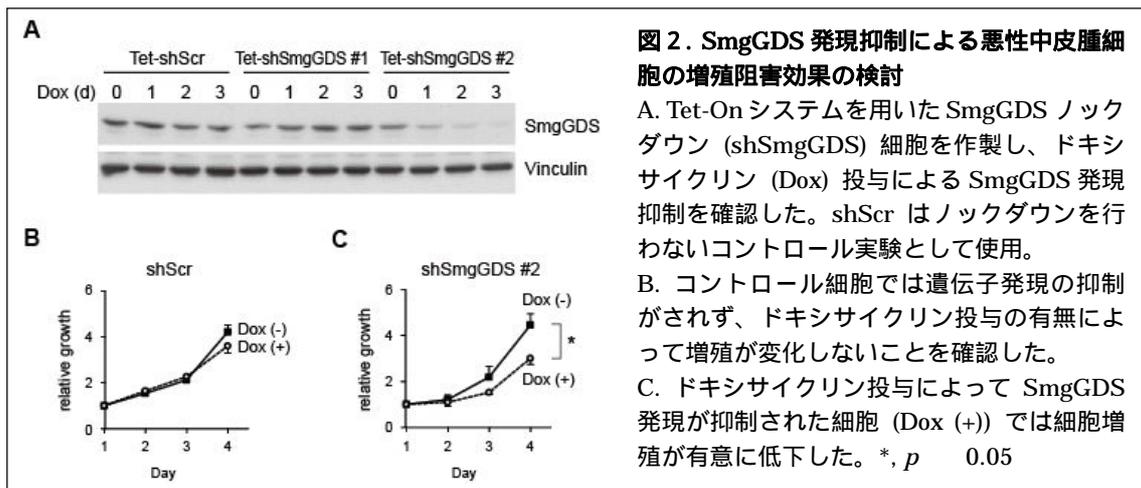


において RHEB を含む mTORC1 活性化関連遺伝子の発現変動が見られ、これらの患者はその他

の悪性中皮腫患者と比較して予後不良であることがわかった。悪性中皮腫における mTORC1 の高活性化の原因の一つとして、mTORC1 制御遺伝子の発現変動が考えられ、mTORC1 が悪性中皮腫の悪性化に関与する可能性が示唆された。

(3) Rheb と結合する SmgGDS はタンパク質の局在を制御する機能を有すると報告されている。そこで、SmgGDS の Rheb へ結合が Rheb の局在を変化させるか検討した。その結果、Rheb はコントロール細胞では細胞質に多く局在するのに対し、SmgGDS をノックダウンした細胞では局在が一部細胞質から細胞膜へとシフトすることが明らかになった。さらに Rheb の細胞内局在を蛍光タンパク質を融合した Rheb を発現させて顕微鏡で観察したところ、野生型 Rheb はゴルジ体やリソソームなどの細胞内小器官に加えて、細胞質全体に広く局在したが、SmgGDS と結合できない Rheb 変異体を発現した細胞においては、細胞質の蛍光が減少していた。これらの結果から、SmgGDS は Rheb を結合することで、細胞内膜にアンカーされた Rheb を細胞質へと遊離させると示唆された。

(4) Rheb の局在は mTORC1 の活性制御に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、mTORC が活性化した悪性中皮腫細胞株を用いて、SmgGDS による Rheb の局在変化が mTORC1 の活性を制御するか検討した。SmgGDS をノックダウンしたところ、Rheb の活性は変化しないが、mTORC1 の活性が有意に減少することを見出した。これらの結果から、SmgGDS は Rheb の局在制御を介して mTORC1 シグナル伝達経路を活性化していると考えられた。さらに、SmgGDS による mTORC1 活性化が悪性中皮腫の細胞増殖に関与しているか検討した。mTORC1 が強く活性化した悪性中皮腫細胞を用いて SmgGDS 発現をノックダウンにより抑制したところ、細胞の増殖が有意に低下することがわかった (図 2)。



(5) 悪性中皮腫のモデルマウスを用いて SmgGDS の発現抑制ががんの進展を抑制するか検討した。その結果、ドキシサイクリンを投与したマウスでは、投与していないコントロールマウスと比較して腫瘍の増殖が有意に抑制され、SmgGDS が悪性中皮腫の治療標的となる可能性が示された。mTORC1 は他の種々の疾患と密接に関連しており、本研究成果を通じてこれら疾患の分子機序の解明や新たな治療法の開発が促進されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tatsuhiko Sato, Satomi Mukai, Haruna Ikeda, Emi Mishiro-Sato, Ken Akao, Toshiyuki Kobayashi, Okio Hino, Wataru Shimono, Yoshio Shibagaki, Seisuke Hattori and Yoshitaka Sekido	4. 巻 -
2. 論文標題 Silencing of SmgGDS, a Novel mTORC1 Inducer That Binds to RHEBs, Inhibits Malignant Mesothelioma Cell Proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0637	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤龍洋、向井智美、関戸好孝
2. 発表標題 SmgGDSによるRheb-mTORC1シグナル伝達制御と悪性中皮腫がん化への関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤龍洋、関戸好孝
2. 発表標題 中皮腫におけるmTORシグナル伝達経路の活性化と新規治療標的因子の探索
3. 学会等名 第1回日本石綿・中皮腫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤龍洋、向井智美、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるRheb-SmgGDS-mTORシグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学分野 HP
http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html

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
---------	---------