

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07094

研究課題名(和文) がん細胞の翻訳制御におけるMnk経路とmTOR経路のクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Crosstalk between the Mnk- and mTOR-signaling pathways in tumor-related translational regulation

研究代表者

福永 理己郎 (Fukunaga, Rikiro)

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40189965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の増殖におけるMAPK-Mnk経路とPI3K-mTOR経路のクロストークによる翻訳制御の分子機構を解明するために、ヒトHeLa細胞を用いてCRISPR/Cas9法によるMAPKファミリー遺伝子およびmTOR複合体構成因子遺伝子の多重ノックアウトを行い、mTOR経路とMnk経路の相互作用を解析した。その結果、mTORC1を阻害するとMnk2の活性化を介して翻訳開始因子eIF4Eのリン酸化が亢進すること、このクロストークにはmTORC2とERKが関与することが示された。本研究により、がんの分子標的治療においてmTOR阻害剤とMnk阻害剤の併用効果が期待できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代のがん治療では、がん細胞の増殖や浸潤・転移を促進する情報伝達分子(情報伝達タンパク質)の働きを抑制する治療法(分子標的治療法)が数多く開発されている。本研究では、Mnkという細胞内情報伝達分子によってがん細胞の増殖やタンパク質合成が調節される仕組みを解明することを目的に研究し、Mnkの働きを抑える阻害薬の性質や、タンパク質合成阻害薬によるMnkの活性制御の仕組みの一端を解明した。この研究成果は、がん治療薬として既に使用されているエベロリムスに加えてMnk阻害薬を併用する新しい分子標的治療法の実用化に向けた理論的基盤を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：To investigate the crosstalk mechanism between the MAPK-Mnk and PI3K-mTOR pathways in growth-promoting translational regulation in tumor cells, we generated HeLa cells lacking the genes of MAPK family, and components of mTOR complexes by using the CRISPR/Cas9 method. We found that specific inhibition of mTORC1 by Everolims resulted in upregulation of eIF4E phosphorylation via Mnk2. We also found that this crosstalk is mediated by mTORC2 and ERKs but not by JNK or p38MAPK. This study would raise the potential for combination treatments of mTOR and Mnk inhibitors for tumor therapies targeting translational machineries.

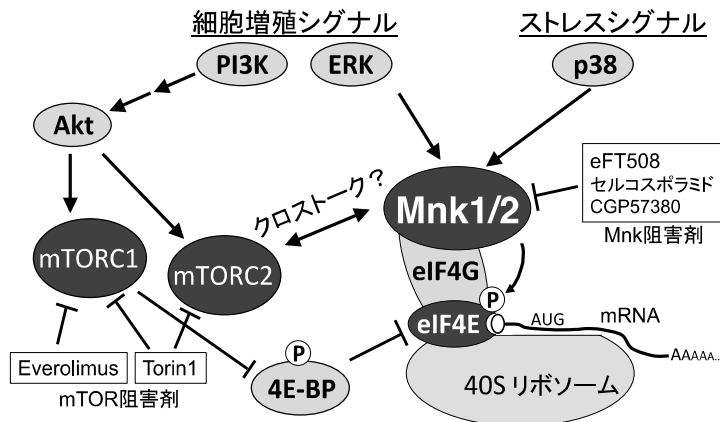
研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳制御 プロテインキナーゼ 細胞内情報伝達 Mnk MAPキナーゼ mTOR 翻訳開始因子

1. 研究開始当初の背景

(1) Mnk1 および Mnk2 は、ERK MAP キナーゼ (MAPK) および p38MAPK によって活性化されるセリン/トレオニンプロテインキナーゼであり、様々な細胞外刺激に応答して翻訳開始因子 4E (eIF4E) の Ser209 残基をリン酸化する (下図)。eIF4E は、真核生物 mRNA の 5' キャップ構造 (m⁷GpppN) と翻訳開始因子 4G (eIF4G) に結合して翻訳開始複合体を形成し、タンパク質合成に必須な律速因子として働いている。また、eIF4E は様々な悪性腫瘍において過剰発現しており、細胞のがん化・悪性化の促進因子の一つであると考えられている。eIF4E の活性は、主に mTOR と Mnk の 2 つのプロテインキナーゼ経路で制御されている。mTOR は PI-3 キナーゼ (PI3K) の下流で活性化され、eIF4E と eIF4G の結合を競合阻害する 4E 結合タンパク質 (4E-BP) をリン酸化して不活化することにより、翻訳開始複合体の形成を促進してタンパク質合成を活性化する。一方、Mnk による eIF4E のリン酸化は、細胞外刺激による mRNA 翻訳効率の変動や、一群の mRNA の選択的翻訳に機能することが示唆されており、様々な悪性腫瘍において Mnk 発現量の亢進とそれに伴う eIF4E リン酸化レベルの上昇が報告されている。

(2) 研究代表者ら平成 30 年度までの研究により、mTOR 複合体 1 (mTORC1) の阻害によって Mnk が活性化されることを見出し、両経路にクロストークが存在する可能性を示した。近年、分子標的がん治療薬の新たな標的としてタンパク質合成促進のシグナル伝達経路が注目され、mTORC1 特異的阻害剤であるラパマイシン類縁体 (エベロリムスなど) が臨床利用されてきたが、現在では制がん効果を高めるために mTOR の ATP 結合部位阻害剤 (汎 mTORC 阻害剤) の利用や Mnk 阻害剤 (eFT508 など) との併用が検討されている。そこで本研究では、がん細胞の増殖における Mnk の機能、および、mTOR と Mnk のクロストークの生理的意義を解明する研究を計画した。



2. 研究目的

本研究では、研究代表者が主にマウスの系で解明してきた Mnk の分子機能や生理的機能に関する知見を基に、各種のヒトがん細胞の細胞増殖における eIF4E リン酸化の生理的役割、Mnk1 と Mnk2 の機能的相違、および mTOR 経路とのクロストークを解明することを目的とし、具体的には以下の 3 つの主題に焦点を絞って計画を遂行した。

- (1) CRISPR/Cas9 システムを用いて種々のヒトがん由来細胞株の Mnk 遺伝子破壊を行い、Mnk 依存性増殖を示すがん細胞における Mnk-eIF4E 経路の機能を解明する。
- (2) 翻訳制御における Mnk 経路と mTOR 経路のクロストークの役割を解明し、mTOR 阻害剤と Mnk 阻害剤の併用による細胞増殖抑制作用の分子的基盤を解明する。
- (3) トランスレイトーム解析 (mRNA 翻訳プロファイリング) の改変法を開発して、Mnk-eIF4E 経路によって翻訳制御を受ける mRNA 群の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) まず, CRISPR/Cas9 システムを用いて HeLa 細胞および HEK293T 細胞の Mnk1 および Mnk2 遺伝子ノックアウト(以下, KO)を行い, 増殖因子, ストレス刺激, あるいは mTOR 阻害剤による Mnk-eIF4E 翻訳調節系の制御に関わるシグナル伝達系の解析を行った。また, Mnk1 と Mnk2 の生理的機能の違いを明らかにする目的で, Mnk1 と Mnk2 の様々なキメラ分子を作成して HeLa 由来 Mnk1/2-ダブルノックアウト(DKO)細胞に導入し, 血清刺激に対する各 Mnk キメラ分子の応答性を解析した。

(2) 野生型 HeLa 細胞および HeLa 由来 Mnk1/2-KO 細胞を利用して, 近年開発された Mnk 阻害剤 Tomivosertib (eFT508)の細胞内 Mnk1 および Mnk2 に対する阻害特性について, eIF4E のリン酸化を指標としてを解析した。

(3) 野生型 HeLa 細胞や Mnk1-KO HeLa 細胞を用いて, CRISPR/Cas9 法により MAPK(ERK1/2), JNK(JNK1/2/3), p38MAPK(p38 / / /), あるいは mTORC1/2 構成分子の網羅的ノックアウトを行い, Mnk-eIF4E 翻訳調節系の制御に関わるシグナル伝達系の解析を行った。

(4) Mnk1/2 が属する MAPKAP キナーゼファミリー (Mnk1/2, MK2/3/5, MSK1/2, RSK1/2/3/4) によるストレス応答翻訳制御を明らかにする目的で, 各遺伝子の単独 KO 細胞や多重 KO 細胞を作成してストレス刺激に対する応答性を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト HeLa 細胞や HEK293 細胞を用いて CRISPR/Cas9 システムによる Mnk1 および Mnk2 の遺伝子ノックアウトを行って解析した結果, 増殖刺激によって Mnk1 の活性が強く誘導されるのに対し, Mnk2 の活性は逆に抑制されることを見出した。そこで, ヒト Mnk1 とヒト Mnk2 のキメラ分子を構築して Mnk1/2-DKO 細胞で発現させ, 増殖刺激による Mnk 活性化動態を検討した結果, Mnk1 型(誘導的活性化), Mnk2 型(誘導的不活性化), 及び中間型(恒常的活性化)に分類され, 活性化動態を決定するのは主に 2 か所のリン酸化部位(ヒト Mnk1 の Thr209 及び Thr214)を含む領域であることが明らかになった。

(2) Mnk1-KO 細胞と Mnk2-KO 細胞を利用して, 近年開発された Mnk 阻害剤 Tomivosertib (eFT508)の細胞内 Mnk1 および Mnk2 に対する阻害特性を解析した結果, 本阻害剤は Mnk1 ($IC_{50}=9.8nM$)よりも Mnk2 ($IC_{50}=2.2nM$)を強く阻害することが示された。一方, Mnk1 と Mnk2 の両方を発現している野生型 HeLa 細胞では阻害効果が弱まる結果 ($IC_{50}=22nM$)となり, Mnk1 と Mnk2 の物理的/機能的相互作用が示唆された。

(3) CRISPR/Cas9 法によって複数の遺伝子を同時に KO する手法を開発するために, 7つの遺伝子 (Mnk1, p38 / , JNK1/2, ERK1, mLST8)の同時 KO を HeLa 細胞で試み, これら全ての遺伝子に欠変異が生じた細胞を効率よく作成できる方法を見出した。25 個のクローンを単離して解析した結果, 7クローン(28%)において7つ全ての遺伝子の発現が消失していることが確認され, 多数の遺伝子を同時に KO する方法を確立することができた。

(4) Mnk1 を活性化する MAP キナーゼ種を明らかにするために、HeLa 細胞を用いて p38^α, p38^β, p38^γ, ERK1, ERK2, JNK1, JNK2 の各遺伝子の単独 KO 細胞あるいは多重 KO 細胞を作製し、各種刺激における eIF4E リン酸化を解析した。その結果、anisomycin のストレス刺激による Mnk1 の活性化には主に p38^α が関与し、血清刺激による活性化には ERK1, ERK2 の双方が関与することが明らかになった。一方、JNK1/2 の各種 KO 細胞を作成して JNK 阻害剤 CC-401 による eIF4E のリン酸化阻害機構の解析を行った結果、本阻害剤の eIF4E リン酸化阻害効果は JNK 以外の経路あるいは Mnk の直接阻害によることが明らかとなった。

(5) 2種類の mTORC 複合体のうち mTORC1 のみを阻害する Everolimus と mTORC1/2 の両方を阻害する AZD8055 を用いて mTOR と Mnk1/2 のクロストークについて解析した結果、mTORC1 活性の阻害による eIF4E リン酸化の亢進は Mnk2 によって媒介されること、このシグナル経路の活性化には mTORC2 活性が関与することが示され、mTORC2 ? Mnk2 eIF4E と繋がる活性化経路の存在が示唆された。そこで、mTORC2 が Mnk2 活性化のクロストークに及ぼす影響を解析するために、mTORC2 の構成因子である mLST8, Sin1, Rictor の各遺伝子を Mnk1-KO HeLa 細胞で KO して解析した。その結果、Everolimus による Mnk2 の活性化には Sin1, や Rictor は必要でないが、mLST8 が何らかの関与をすることが示唆された。

(6) Everolimus による Mnk2 の活性化に関与する MAP キナーゼ種を明らかにするために、Mnk1 遺伝子を欠失した HeLa 細胞を用いて MAPK(ERK1/2), p38MAPK(p38^α / p38^β / p38^γ) の網羅的ノックアウトを行って解析した。このうちの ERK1/2-ダブル KO 細胞は増殖できずに死滅したため、p38^α / p38^β / p38^γ-四重 KO 細胞や ERK2/p38^α / p38^β / p38^γ-五重 KO 細胞を用いて解析した結果、p38 の全遺伝子と ERK2 を欠失しても Everolimus による eIF4E のリン酸化レベルの上昇が観察されることから、このクロストークは ERK1 または ERK2 を介することが示唆された。

(7) Mnk1/2 が属する MAPKAP キナーゼファミリー (Mnk1/2, MK2/3/5, MSK1/2, RSK1/2/3/4) によるストレス応答翻訳制御を明らかにする目的で、各遺伝子の単独 KO や多重 KO 細胞を作成してストレス刺激に対する応答性を解析した。その結果、CREB 転写因子のリン酸化には主に MSK1/2 サブファミリーが関与し、熱ショックタンパク質 25/27 のリン酸化には主に MK2/3 サブファミリーが関与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Elsesser Olga, Frob Franziska, Kuspert Melanie, Tamm Ernst R, Fujii Toshihiro, Fukunaga Rikiro, Wegner Michael	4. 巻 47
2. 論文標題 Chromatin remodeler Ep400 ensures oligodendrocyte survival and is required for myelination in the vertebrate central nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6208 ~ 6224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz376	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 該当する

1. 著者名 Frob Franziska, Sock Elisabeth, Tamm Ernst. R., Saur Anna-Lena, Hillgartner Simone, Williams Trevor J., Fujii Toshihiro, Fukunaga Rikiro, Wegner Michael	4. 巻 10
2. 論文標題 Ep400 deficiency in Schwann cells causes persistent expression of early developmental regulators and peripheral neuropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10287-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu Dong, Li Jin, Lin Hao, Lorsung Ethan, Le Nam, Singla Rubal, Mishra Abhishek, Fukunaga Rikiro, Cao Ruifeng	4. 巻 55
2. 論文標題 Circadian activities of the brain MNK eIF4E signalling axis contribute to diurnal rhythms of some cognitive functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	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) 10.1111/ejn.15678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩見実咲, 藤井忍, 藤井俊裕, 福永理己郎
2. 発表標題 Mnk1およびp38 MAPK / / 遺伝子の多重欠損HeLa細胞の作製と, これを用いたMnk2活性化機構の解析
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部大会 (オンライン@立命館大学)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木津美里、水野和史、藤井俊裕、藤井 忍、尾崎恵一、福永理己郎
2. 発表標題 JNK 阻害剤 CC-401 による翻訳開始因子 4E(eIF4E)リン酸化の抑制作用について (ノックアウト HeLa 細胞を用いた解析)
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会 (兵庫)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八幡美咲、野中有加里、藤井 忍、藤井俊裕、福永理己郎
2. 発表標題 Mnk1/Mnk2 キメラ分子を用いた Mnk 活性化動態の解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会 (兵庫)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田早希、後藤 遥、藤井 忍、藤井俊裕、福永理己郎
2. 発表標題 HeLa 細胞における Mnk1 および Mnk2 に対する Tomivosertib(eFT508)の阻害特性の解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会 (兵庫)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎瑠生、西村茅咲、大沢視人、藤井忍、伊藤千紘、藤井俊裕、福永理己郎
2. 発表標題 mTORC2構成因子の遺伝子欠損HeLa細胞を用いた, mTOR経路とMAPK-Mnk経路のクロストークの解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 尚美、延山 貴信、藤井 忍、伊藤 千紘、藤井 俊裕、福永 理己郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9法によるMAPK多重ノックアウトHeLa細胞の作成と、そのNHEJ修復部位のDeep Sequencing解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 千紘、中村 菜乃花、横田 のぞみ、藤井 忍、藤井 俊裕、福永 理己郎
2. 発表標題 ストレス応答プロテインキナーゼ(SAPKs)遺伝子の多重ノックアウトHeLa細胞の作成とシグナル経路の解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 千紘、中村 菜乃花、横田 のぞみ、藤井 忍、藤井 俊裕、福永 理己郎
2. 発表標題 ストレス応答プロテインキナーゼ(SAPKs)遺伝子の網羅的および単独残存型多重ノックアウトHeLa細胞を用いたシグナル経路の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 尚美、延山 貴信、藤井 忍、伊藤 千紘、藤井 俊裕、福永 理己郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9法によるMAPキナーゼ多重ノックアウトHeLa細胞の作成と、そのNHEJ修復部位のDeep Sequencing解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 オンライン
4. 発表年 2021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
研究 分担者	藤井 俊裕 (Fujii Toshihiro) (30580104)	大阪薬科大学・薬学部・助教 (34413)	R1年度およびR2年度のみ (R2年度末で退職のため)
研究 分担者	伊藤 千紘 (Ito Chihiro) (60639029)	大阪医科薬科大学・薬学部・助教 (34401)	R3年度のみ (藤井俊裕氏退職のため, R3年度より新規分担者)

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			
ドイツ	Friedrich-Alexander- Universität Erlangen	Universität Regensburg		
米国	University of Minnesota Medical School			