

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22240088

研究課題名(和文)細胞内膜系コンパートメントを介するがん増殖制御機構

研究課題名(英文)Regulation of tumor growth via intracellular membrane compartments

研究代表者

岡田 雅人 (OKADA, Masato)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円、(間接経費) 11,220,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の増殖は、がん原遺伝子の変異による増殖シグナル経路の制御破綻によって加速する。本研究は、リソソーム膜上の足場タンパク質p18を経由するがん増殖シグナル経路、MAPK経路およびmTOR経路の意義と制御機構を解明することを目的として行った。主にp18を欠損する細胞およびマウス個体を用いた解析より、p18がmTORC1の活性化を担う制御複合体をリソソーム膜上で形成し、細胞の増殖・分化、およびがん増殖の促進に必須の役割を担うこと、また、p18-mTORC1経路による転写因子FoxO3aを介する細胞周期およびリソソームを介する物質代謝の制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumor growth is promoted by persistent activation of growth signaling, which is caused by mutations of various proto-oncogenes. In this study, we investigated the function and regulation mechanisms of the major growth signaling pathways, the MAPK and mTOR pathways, via the scaffold protein p18 that is anchored to the surface of lysosomes. Using p18 knockout cells and mice, we found that p18 forms a regulatory complex (Ragulator) required for activation of mTORC1, and plays crucial roles in regulating cell growth, proliferation, differentiation, and tumor growth. We also clarified the roles of the p18-mTORC1 pathway in the regulation of cell cycle via the transcription factor FoxO3a and lysosome-mediated catabolism. These findings shed new lights on the roles of the intracellular membrane compartments, e.g. lysosomes, in the regulation of tumor promoting signaling.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：腫瘍増殖 シグナル伝達 リソソーム ラフト mTOR 足場タンパク質

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の増殖は、EGFR、Src、Ras 等のがん原遺伝子産物の恒常活性化による下流シグナルの制御破綻によって加速する。これまでの膨大な先行研究により、遺伝子発現に至るまでのシグナル経路の大枠が明らかになってきているが、まだその多くが点と線で結ばれた平面図であり、実際の細胞内での空間的な配線図はまだ描けていないのが実状である。がん増殖に関わるとされる MAPK 経路などに関しては、細胞内の多様なコンパートメントに特異的な足場タンパク質が存在し、それらが使い分けられることによってシグナルが空間的に制御されることが明らかにされている。しかしながら、がん増殖シグナルの制御に関わる細胞内コンパートメントに関してはまだ不明な点が多く残されている。

我々は、がん原遺伝子産物 Src の機能と制御機構に関する研究を一貫して続けている。これまでに、Src の特異的な制御因子である Csk を発見し、Src の制御機構を明らかにしてきた(Nada et al. Nature, 1991; Nada et al. Cell, 1993)。その後、Csk の機能制御に関わる結合因子として Cbp をコレステロールなどが濃縮された細胞膜ナドメイン(ラフト)より同定し、ラフトを介する Src の制御機構を明らかにした(Kawabuchi et al. Nature, 2000)。さらに、Cbp およびラフトが Src のがん化能を抑制する機能を有することを見いだした(Oneyama et al. Mol Cell, 2008)。がん化シグナルが細胞内で空間的に制御されることを提唱した。

一方で我々は、新たな Src 基質としてリソソームのラフトに特異的に局在するアダプター様タンパク質 p18 を同定し、p18 が MAPK 経路の MEK1 特異的な足場タンパク質と考えられていた p14-MP1 と複合体を形成して機能することを見いだした(Nada et al. EMBO J, 2009)。また、p18 欠損細胞の解析から、p18 がエンドソーム系の相互作用を活性化することによってがん形質と関連する細胞機能(接着、運動、分泌など)を統御する機能があることや、細胞増殖の制御にも関わることを見いだした。さらに、p18 が Src、K-Ras、Pak1 などのがん遺伝子発現による足場非依存性増殖能の獲得に必須となることをも明らかにした。これらの結果から、リソソーム膜上の p18 を経由する経路ががん増殖シグナルのメインルートの一つとなる可能性が示唆された。しかしながら、1) リソソーム膜上の p18 を経由するシグナル経路の本体、2) そのシグナル経路によるエンドソーム系の制御や細胞増殖促進機構、3) p18 本来の生理機能などの解明が重要課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の課題: 1) リソソーム膜上の p18 を経由するシグナル経路の本体、

2) そのシグナル経路によるエンドソーム系の制御や細胞増殖促進機構、3) p18 本来の生理機能を解明することにより、リソソーム膜上の p18 を経由するシグナル経路のがん増殖制御における役割を明らかにすることを目的とする。また、それらの基礎情報をもとに、ヒトがんに対する新たな治療標的を探索する。

3. 研究の方法

1) リソソーム膜上の p18 を経由するシグナル経路の本体解明

p18 と複合体を形成する p14/MP1 が MAPK 経路の MEK1 の足場となることが報告されていたが、それ以外の経路との関連性を探るために、p18 と結合するタンパク質の網羅的な探索を行う。具体的には、p18 欠損細胞に FLAG タグを付けた p18 を発現させて、それに結合するタンパク質を pull-down 法により精製する。得られたタンパク質を質量分析計で同定する。

2) p18 経由のシグナルによる細胞増殖およびエンドソーム系の制御機構の解明

細胞増殖に関しては、p18 欠損細胞と正常細胞を用いて、p18 に依存して変動する増殖シグナル伝達系をウエスタンブロッティング法等により詳細に解析する。変動が認められた分子については、その過剰発現やノックダウン実験により機能を明らかにする。エンドソーム系については、特にリソソームの細胞内動態や機能を比較解析する。

3) p18 の生理機能の解明

p18 のコンディショナル KO マウスを作製して、その表現型を詳細に解析する。まずは、K5 promoter を用いて Cre を表皮細胞に特異的に発現させ、表皮組織形成における p18 の生理機能を組織化学的手法等により解析する。

4) 新たながん治療標的の探索

p18 が形成する複合体を標的とした薬剤開発を目指して、複合体の相互作用表面の構造解析を試みる。

4. 研究成果

1) リソソーム膜上の p18 を経由するシグナル経路の本体

p18 と結合する分子として、当研究室においても p14/MP1 に加えて RagC が同定された(Takahashi, et al. BBRAC, 2012, Nada et al. Methods Enzymol. 2014)。また、当研究室と米国 Sabatini 博士らとの共同研究によって(Sanak et al. Cell, 2010)、リソソーム膜上の p18/p14/MP1 複合体(Ragulator と命名)と結合した RagA/C が mTORC1 をリソソームにリクルートして活性化することが示された。さらに、p18 欠損細胞では MAPK 経路の MEK および ERK の活性変動が小さいことから、p18 の MAPK 経路への寄与は大きくないことも示された(Mori et al. PLoS One, 2014)。以上の結果から、mTORC1 経路がリソソーム膜上

の p18 を経由する主要なシグナル経路であることが明らかとなった (図 1)

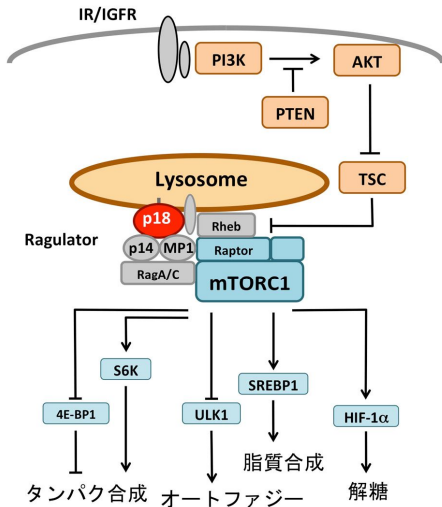


図 1. リソソーム膜上の p18 と mTORC1 経路

2) p18 経由のシグナルによる細胞増殖およびエンドソーム系の制御機構

細胞増殖に関しては、p18 の欠損により mTORC1 が不活性化し、それに伴って細胞増殖能が著しく低下することを明らかにした (Mori et al. PLoS ONE, 2014)。その際の細胞内シグナル分子の動態を詳細に解析した結果、mTORC1 の活性低下の代償として mTORC2 が活性化し、その重要な下流因子である SGK1 キナーゼの分解が亢進していることが見いだされた。さらに、SGK1 の標的転写調節因子である FoxO1 および FoxO3 のリン酸化状態が著明に変化して、核内に移行して活性化することが見いだされた。その結果、FoxO が制御する細胞周期阻害因子 p21/p27 の発現が誘導され、細胞周期が停滞することが確認された。以上の結果から、リソソーム上の p18-mTORC1 が mTORC2 と協調して細胞周期の制御を担うことが明らかとなった (図 2)

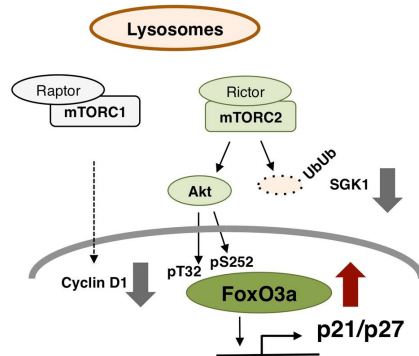


図 2. p18 欠損による増殖抑制機構

エンドソーム系に関しては、p18 欠損細胞と正常細胞について、特にリソソームの成熟と機能を比較解析した。その結果、p18 欠損細胞では、未成熟なリソソームが大量に蓄積し、また、細胞外から取り込んだ物質のリソ

ソームでの消化効率が著しく低下していることを見いだした (Takahashi, et al. BBRAC, 201)。さらに、この現象がラパマイシンという抗生物質で mTORC1 を特異的に阻害しても観察されることから、リソソーム上の p18-mTORC1 経路が、リソソーム自体の成熟や他のオルガネラ (後期エンドソームなど) との相互作用において重要な役割を担うことが示唆された (図 3)

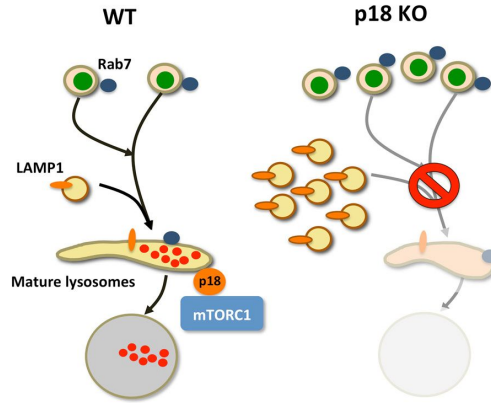


図 3. p18 欠損によるリソソーム成熟の異常

3) p18 の生理機能

表皮細胞特異的な p18 のコンディショナル KO マウスを作製した。KO マウスは正常に生まれるが、重篤な脱水症状を呈して生後一日以内に全て死亡した。表皮組織を観察した結果、KO マウスの表皮には角質層が形成されないことが見いだされた (図 4)。詳細な免疫組織化学解析により、p18 の欠損によってオートファジーの制御やセラミドなどの脂質成分の合成に異常が生じ、角化細胞への終末分化や角化層形成、すなわち表皮バリア形成が不全となっていることが観察された。また、培養表皮細胞の解析からオートファゴソームのリソソームを介する分解に異常が認められ、この系においても p18-mTORC1 のリソソームの成熟や機能における役割が示された (Soma-Nagae et al. J. Cell Sci., 2013)。これらの結果から、リソソーム上の p18-mTORC1 経路が、細胞増殖のみならずリソソームの機能制御にも重要な役割を果たすことが明らかとなり、リソソームが細胞の恒常性を制御する中心的なシグナルプラットフォームとして機能することが示唆された (図 5)。

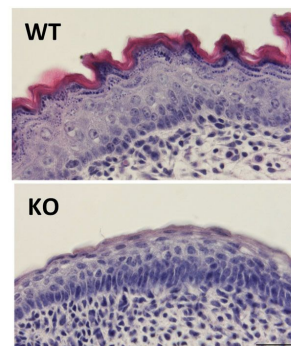


図 4. 表皮特異的 p18 欠損マウスの表現型

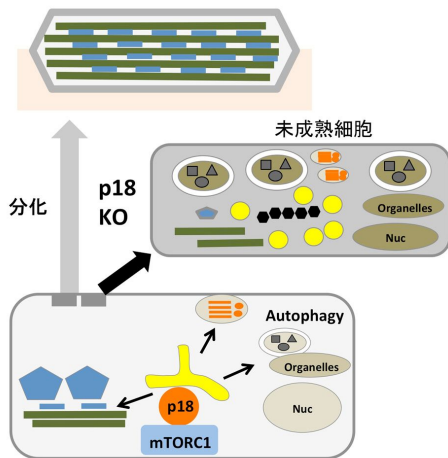


図5. p18欠損による角化細胞の分化異常

4) 新たながん治療標的の探索

p18 が形成する複合体を標的とした薬剤開発を目指して、複合体の相互作用表面の構造解析を試みた。p18 がコアとなる Regulator (p18-p14-MP1-HBXIP-p10 の5者複合体) の大腸菌での発現系を構築し、複合体の単離に成功した。現在、結晶化に向けて大量発現および高度精製の条件決定を進めている(図6)。

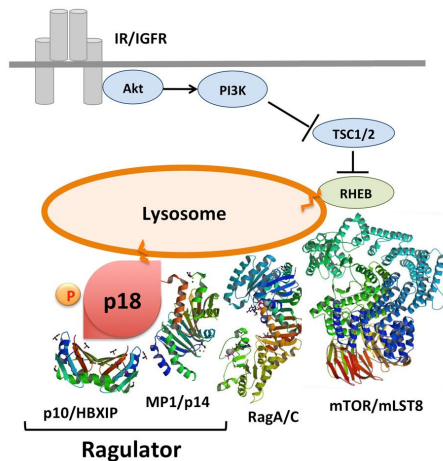


図6. p18と相互作用する分子群の構造的特徴

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15件)【全て査読有り】

- (1) Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS ONE* 2014 Feb 18;9(2):e88891. doi: 10.1371/journal.pone.0088891
- (2) Kajiwara K, Yamada T, Bamba T, Fukusaki E, Imamoto F, Okada M, Oneyama C. c-Src-induced activation of ceramide

metabolism impairs membrane microdomains and promotes malignant progression by facilitating the translocation of c-Src to focal adhesions. *Biochem J*. 2014 Feb 15;458(1):81-93. doi: 10.1042/BJ20130527.

- (3) Nada S, Mori S, Takahashi Y, Okada M: p18/LAMTOR1: a late endosome/lysosome-specific anchor protein for the mTORC1/MAPK signaling pathway. *Methods Enzymol*. 2014;535:249-63. doi: 10.1016/B978-0-12-397925-4.00015-8.
- (4) Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Oneyama C, Okada M: The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. *J Cell Sci* 2013 Aug 15;126(Pt 16):3575-84. doi: 10.1242/jcs.121913.
- (5) Oneyama C, Kito Y, Asai R, Ikeda J, Yoshida T, Okuzaki D, Kokuda R, Kakumoto K, Takayama K, Inoue S, Morii E, Okada M. MiR-424/503-mediated Rictor upregulation promotes tumor progression. *PLoS ONE* 2013 Nov 11;8(11):e80300. doi: 10.1371/journal.pone.0080300.
- (6) Tanaka H, Akagi K, Oneyama C, Tanaka M, Sasaki Y, Kanou T, Lee YH, Yokogawa D, Dobenecker MW, Nakagawa A, Okada M, Ikegami T: Identification of a new interaction mode between the Src homology 2 domain of C-terminal Src kinase (Csk) and Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains. *J Biol Chem* 2013 May 24;288(21):15240-54. doi: 10.1074/jbc.M112.439075
- (7) Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M: The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 Jan 27;417(4):1151-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.082.
- (8) Okada M: Regulation of Src family kinases by Csk. *Int J Bio. Sci* 2012;8(10):1385-97. doi: 10.7150/ijbs.5141.
- (9) Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M: MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene* 2012 Mar 29;31(13):1623-35. doi: 10.1038/onc.2011.367.
- (10) Masuda H, Nakamura, Takata N, Itoh B, Hirose T, Moribe H, Mekada E, *Okada M: MIG-13 controls anteroposterior cell migration by interacting with

- UNC-71/ADM-1 and SRC-1 in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 2012 Mar 23;586(6):740-6. doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.031.
- (11) Kuroiwa, Oneyama C, Nada S, *Okada M: The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *J Cell Sci* 2011 May 15;124(Pt 10):1726-38. doi: 10.1242/jcs.080291.
- (12) Suzuki K, Oneyama C, Kimura H, Tajima S, Okada M: Down-regulation of the tumor suppressor Cbp/PAG1 is mediated by epigenetic histone modifications via the MAPK/ PI3K pathway. *J Biol Chem* 2011 May 6;286(18):15698-706. doi: 10.1074/jbc.M110.195362
- (13) Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K, Okada M: MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene* 2011 Aug 11;30(32):3489-501. doi: 10.1038/onc.2011.63.
- (14) Yoshida S, Hong S, Suzuki T, Nada S, Mannan AM, Wang J, Okada M, Guan KL, Inoki K: Redox regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity by modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase pathway. *J Biol Chem* 2011 Sep 16;286(37):32651-60. doi: 10.1074/jbc.M111.238014.
- (15) Kanou T, Oneyama C, Kawahara K, Okimura A, Ohta M, Ikeda N, Shintani Y, Okumura M, Okada M: The transmembrane adaptor Cbp/PAG1 controls the malignant potential of human non-small cell lung cancers that have c-src upregulation. *Mol Cancer Res* 2011 Jan;9(1):103-14. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0340.
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- (1) 岡田雅人「リソソーム上の mTOR キナーゼを介する細胞の分化増殖制御」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
- (2) 森俊介「リソソームタンパク質動態の網羅的解析」第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 21 日、愛知県産業労働センター
- (3) 梶原健太郎、小根山千歳、岡田雅人「Src 活性化に伴うセラミドの増加はがん形質発現を促進する」がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム、2013 年 1 月 30 日、学術総合センター
- (4) 長江多恵子、北川真理、名田茂之、森俊介、高橋祐介、岡田雅人「マウス表皮形成には p18-mTORC1 経路を介したリソソーム代謝が必要である」第 85 回日本生化学会年会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (5) 吉川由利子、小根山千歳、飯野琢也、岡田雅人「細胞膜ミクロドメイン"脂質ラフト"を介した c-Src が形質発現シグナル制御機構の解明」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場
- (6) 梶原健太郎、小根山千歳、今本文男、岡田雅人「Src 活性化に伴うセラミドの増加はがん形質発現を促進する」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場
- (7) Kentaro Kajiwara, Chitose Oneyama, Masato Okada "Alteration of ceramide metabolism is required for c-Src redistribution to focal adhesions and following activation of signal transduction pathways during cell transformation" The 4th EMBO meeting, Sept. 24, 2012, Nice Acropolis, France
- (8) 森俊介、小根山千歳、名田茂之、岡田雅人「細胞増殖における後期エンドソームアンカータンパク質 p18 の役割」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜
- (9) Kentaro Kajiwara, Chitose Oneyama, Fumio Imamoto, Masato Okada "Metabolic alteration of lipid components in membrane microdomain by c-Src-induced transformation"第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜
- (10) Taeko Soma-Nagae, Mari Kitagawa, Shigeyuki Nada, Kentaro Kajiwara, Masato Okada "LAMTOR1 (p 18) is required for epidermal barrier formation"第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜
- (11) 森俊介、小根山千歳、岡田雅人「腫瘍増殖における後期エンドソーム-MAPK アンカータンパク質 p18 の役割」第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場
- (12) 長江(相馬)多恵子、名田茂之、北川真理、高橋祐介、森俊介、岡田雅人「後期エンドソーム膜上蛋白 LAMTOR1 の表皮バリア形成への必要不可欠性」第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 28 日、北海道大学
- (13) Shigeyuki Nada, Shunsuke Mori, Taeko Soma-Nagae, Yusuke Takahashi, Masato Okada "The late endosomal signaling of mTOR and MAPK takes differential roles in the cellular proliferation and the membrane trafficking" 第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日、北海道大学
- (14) 森俊介、小根山千歳、名田茂之、岡田雅人「腫瘍増殖における後期エンドソーム-MAPK アンカータンパク質 p18 の役割」第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年

12月9日、神戸ポートアイランド、

〔図書〕(計1件)

岡田雅人、宮崎香編「タンパク質実験ノート」
改訂第4版、2011年10月、羊土社

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田雅人 (OKADA, Masato)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058