

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460211

研究課題名(和文) 母体と胎児間の栄養輸送におけるmTORシグナルの新たな役割

研究課題名(英文) The role of the mTOR signalling pathway in placental nutrient transport.

研究代表者

平野 剛 (HIRANO, TAKESHI)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：00322826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：mTORC1共免疫沈降法により同定されたP110は栄養感知システムに関わるmTORC1局在化機構やmTORC1の下流エフェクター制御機構などに関わる重要な因子である可能性が考えられた。また、ZNF512BはRaptorなどの既知の因子にはない栄養環境の変化に感受性を示すmTORC1の新規構成因子であり、栄養環境により局在を変化させることで栄養感知システムの末端機能を有している可能性が示唆された。今後、mTORC1栄養感知システムにおけるZNF512Bの役割および癌細胞と正常細胞との機能の違いについて多角的に検討し、栄養感知システムのメカニズムについて解析を行う。

研究成果の概要(英文)：The mTOR pathway represents an important intracellular regulatory process between nutrient and amino acid transport in the human placenta. PI3K and mTOR pathway, a novel p110 interacting protein was identified by the protein-protein interactions using co-immunoprecipitation. We demonstrate the p110 catalytic subunit directly binds to mTORC1. These results suggested that P110 is important factor and the mTOR regulator. We suggest that mTOR signaling represents an important regulatory pathway for placental nutrient transporters.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：胎盤栄養素輸送 医療薬学 食品栄養学 医薬品情報学 安全性学 mTOR 栄養感知システム 妊娠

1. 研究開始当初の背景

Barker DJ & Osmond C は「成人病胎児期発症説: Fatal Origins of Adult Disease」を提唱している。胎児期において低栄養に胎芽が曝露されると成人病の素因が形成されるというものであり、2005年栄養学分野のノーベル賞といわれているダノン国際栄養学術賞を受賞している。このように新生児の健康状態は胎児期の栄養状態が深く関与しており、出生後の環境だけではなく、子宮内にいる胎児期と出生後数ヶ月の栄養状態が極めて重要であることを示している。この胎児期における栄養状態には、母体と胎児を結ぶ唯一の臓器である胎盤が深く関与している。特に、胎盤における栄養素の輸送機構が正常に機能しない場合、胎児への栄養供給が不足するため子宮内胎児発育不全や神経管閉鎖障害の発症リスクが増大し、葉酸摂取不足は二分脊椎や無脳症等の先天性脊椎癒合不全を惹起することも示唆されている。

2006年には、厚生省から「妊産婦のための食生活指針」、日本産婦人科医会から「妊娠中の食事と栄養」が発行されている。これらは若年女性のダイエット願望に対して警鐘を鳴らし食育の意義を謳ったものである。また近年、胎児期の慢性的な低栄養状態は、発達障害の増加と臨床像の変化にも関連していることが示唆されており、大きな社会問題にもなっている。

以上のように、胎児期の栄養状態は胎児の発育のみならず、青年期以降の健康状態を反映するものとして極めて重要であり、胎児の栄養環境を良好に保つための基礎的な研究が必要であるが、疫学調査以外は倫理的な面から臨床研究は勿論、国内外の基礎研究は極めて少ない。

胎盤を通じて栄養素を胎児へ輸送するためのシステムとして、いくつかの胎盤トランスporterが知られている。これらのトランスporterは、アミノ酸、グルコース、葉酸などの栄養素の妊娠期による需要の変化に応じて高度に発現制御を受けている。これらの機構により、胎児の栄養環境が決定されるが、制御機構の詳細な分子基盤については明らかにされていない。環境に応じたトランスporterの発現制御には栄養感知システムの存在が否定できない。ラパマイシン標的タンパク質(mTOR: mammalian target of rapamycin)は、酵母からヒトまでの進化の過程で高度に保存されている生命維持に必須のシグナルであり、癌細胞でさえも突然変異していることが稀といわれる。それ故、正常細胞には極めて重要な生理的意義および機能がある。その役割として近年注目を集めているのが、細胞外の栄養環境、主にアミノ酸バランスの変化を感知し、タンパク質の翻訳・活性を制御する栄養感知システムとしての機能である。本機構はこれまで癌細胞のアミノ酸トランスporterと関連性が研究されてきたが、正常細胞、特に胎盤の細胞にお

ける栄養環境と妊娠期による栄養素トランスporterの発現変動との関連性については、ほとんど研究されていない。

妊娠の進行に伴い胎盤組織は大きく変化し、胎盤を形成する細胞が分化・多核化しているにも関わらず、妊娠期を通じた比較、あるいは評価した例は極めて少ない。mTORは、細胞外の栄養環境、主にアミノ酸バランスの変化を感知し、タンパク質の翻訳に影響を及ぼすことによって、細胞増殖、脂質代謝、インスリン抵抗性、オートファジー等に関わるタンパク質の活性を制御している。AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)は糖質などのエネルギー環境を感知しmTOR活性化に対しても影響を与えている。これらの栄養感知システムと胎盤に存在する各種栄養素トランスporter、母体胎児間輸送との関連についての知見はほとんどない。

本研究の進展は、精密にプログラムされた一連の遺伝子発現と子宮内で極めて速い速度で発育・発達を続けている胎児の健やかな誕生に多大な貢献をもたらす。妊娠初期における栄養素の欠如は胎児にとって致命的であり、エピジェネティックな変化も含めた研究意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでの研究では妊娠期全般における胎児の発育に関連した栄養素の母体胎児間輸送機構を明らかにしてきたが、本研究では、栄養感知システムとして機能しているmTORと妊娠期による栄養素トランスporterの発現制御の関連を詳細に明らかにすることとする。

妊娠の進行に伴う胎盤の形態変化を反映した様々な評価モデルを用い、栄養感知システムであるmTORおよび関連因子の活性化と各種栄養素トランスporter、特に妊娠初期に特異的な発現を確認したグルタミントランスporter-SNAT3(Slc38a3)等との関連を妊娠期毎に網羅的に解析・評価する。

本研究期間内に、母体と胎児間の栄養輸送におけるmTORシグナルの新たな役割について明らかにする。本研究の成果はmTORが栄養感知システムとして機能することを明らかにするだけでなく、食品栄養学、新生児学および医療薬学、ひいては国民生活に有益で価値のあるものとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 胎盤の形態変化を反映した細胞モデルによる活性化発現輸送能相関

栄養素トランスporterの対象は、前述のSNAT3(Slc38a3)の他、アミノ酸トランスporter(SLCファミリー)、グルコーストランスporter(GLUT, SGLTファミリー)、葉酸、カルニチンなどのビタミン類、ヌクレオチドトランスporterを網羅的に検討する。

化合物処置

臨床上問題となるビタミンKなどの脂溶性ビタミン、エタノール、ニコチン、バルプロ酸などの抗てんかん薬、経口抗糖尿病薬、スタチン系薬物、あるいはmTOR阻害薬エベロリムスなどを用いて、細胞増殖、妊娠期全般における栄養供給に及ぼす影響を検討する。例えば、催奇形性を有するサリドマイドの胎盤透過性は疑う余地はないものの、mTORシグナルおよび栄養素トランスポーターへの影響の観点から実施する。一方、栄養素トランスポーターの発現は性ホルモン分泌に対しても大きな影響を与えることから、forskolin, PKCなどによって胎盤の細胞を分化・誘導させた際のヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)産生とアロマターゼ活性についても詳細に確認することとする。

活性化 発現相関

各種化合物暴露後のmTORの活性化変動をmTOR活性化マーカーであるS6タンパク質のリン酸化レベルにて評価する。また、各化合物暴露後の各種栄養素トランスポーターの発現変動を同時に解析し、各種化合物とmTORの活性化、mTORの活性化と栄養素トランスポーターの発現変動との関連性について詳細に評価する。

活性化 輸送能相関

放射性同位体標識したL-グルタミンなどを用いて、各栄養素トランスポーター基質共存下での細胞内取り込み量、ラットにおける胎盤を介した基質輸送を測定する。各々、速度論的解析(Km, Vmax)にて輸送能を算出することで、グルタミントランスポーターSNAT3などの栄養素トランスポーターを機能面からも解析する。また、各種化合物処置後のmTOR活性化変動の結果とトランスポーターを介した輸送能の関連性を評価し、mTORの活性化と輸送能の変動が一致した栄養素トランスポーターを特定する。

(2) 局在化・生理機能解析

mTOR活性化と各種栄養素トランスポーター発現との直接な関連を評価するために、リン酸化S6タンパク質と各種栄養素トランスポーターを同時に蛍光標識し、両者の局在について比較検討する。先に示した各種妊娠モデル細胞やラット胎盤初代培養系を用いて、妊娠期全般に対する影響を詳細に解析する。

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 において一過性 P110 高発現モデル (P110 発現系) を作製した。P110 発現系に対して D-PBS を曝露させ、Western Blot 法により P70S6K や 4EBP1 のリン酸化レベルを評価し、P110 未導入細胞との比較を行った。また各種条件下の細胞溶解液を用いて関連タンパク質の免疫沈降を行い P110 の mTORC1 への結合量の比較を行った。mTOR、P110 の局在解析については免疫蛍光染色法を用いた。

本解析に使用する IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) は接着細胞の特性を維持したまま、細胞をイメージングし、形態情報のポピュレーション解析や分子局在の解析、細胞周期の解析、細胞質核のトランスロケーション解析が可能であり、本研究の進展に大きく貢献できる。

4. 研究成果

(1) 胎盤の形態変化を反映した細胞モデルによる活性化 発現 輸送能相関

妊娠の進行に伴う胎盤の形態変化を反映した様々な評価モデルを用い、栄養感知システムである mTOR および関連院試の活性化と各種栄養素トランスポーター、特に、妊娠初期に特異的に発現したグルタミントランスポーター SNAT3 (slc38a3) の他、アミノ酸トランスポーター、グルコーストランスポーター、葉酸、カルニチン等のビタミン類、核酸輸送に關与するヌクレオチドトランスポーターを網羅的に解析・評価した。

また、mTOR は細胞内外の栄養環境、主にアミノ酸バランスの変化を感知し、タンパク質の翻訳に影響を及ぼすことによって、細胞増殖、脂質代謝、インスリン抵抗性、オートファジー等に関わるタンパク質の活性を制御している。AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は糖質などのエネルギー環境を感知し、mTOR 活性化に対しても影響を与えている。これらの栄養感知システムと胎盤に存在する各種栄養素トランスポーター、母体胎児間輸送との関連性についての知見を得た。

(2) 新規 mTORC1 結合因子 P110 の栄養感知システムとしての生理機能解析

mTORC1 は mTOR を中心とした複合体であり、アミノ酸やグルコースを感知し生存を制御する栄養感知システムとして、細胞の恒常性の維持に寄与している。細胞外の栄養を感知した mTOR は細胞質から核膜周辺に局在するリソソームに移行し、P70S6K や 4EBP1 をリン酸化する事が報告されている。しかしながら、栄養シグナルに關与する mTORC1 結合因子の存在、あるいはリソソームへの詳細な移行システム等、栄養感知システムとしての機能に關する情報は少ない。そこで、mTORC1 における P110 の機能解析を実施した。

P110 発現系において、栄養枯渇環境で生じる 4EBP-1 の脱リン酸化が未導入細胞と比較しより短時間に進行する現象を確認した。栄養枯渇条件、mTOR-Raptor 解離条件下では、mTORC1 下流エフェクターである S6 RP リン酸化が抑制されても P110 の発現は変化しなかった。P110 局在解析の結果、P110 は核膜付近 (k-18) および核内 (H-180) への局在が認められた。Anti-Raptor 抗体を用いて mTORC1 との共免疫沈降を行い P110 の mTORC1 への結合量を検討した結果、ラパマイシン処置では、mTOR と Raptor が解離するため mTOR

の共沈量が減少した。また、P110の共沈量も同時に減少したことからP110はmTOR側に結合している可能性が示唆された。以上の結果、mTORC1共免疫沈降法により同定されたP110は栄養感知システムに関わるmTORC1局在化機構やmTORC1の下流エフェクター制御機構などに関わる重要な因子である可能性が考えられた。

mTORC1からRaptorを乖離し、細胞溶解液を共存させることによって、再び各分子を結合させることができるmTORC1再構成モデルを確立した。本法を用いることで、再構成モデルに認められる新たな5つの構成候補化合物から1つの新規分子ZNF512Bを同定することに成功した。また、mTORが栄養を感知しシグナルを下流に伝達する際にRaptorとの結合が必須であることから、mTORC1再構成モデルから同定されたZNF512BはmTOR栄養感知システムに関わる重要な因子であることが示唆された。

ZNF512Bは亜鉛を含むZinc Finger Proteinの一種であり転写因子であると予測されているが、明確な機能は明らかにされていない。また、核膜付近と核内への局在を確認したことから、核膜付近でシグナルを受け核内移行すると考えられた。mTORC1が栄養を感知すると、核膜付近に局在するリソソームに移行しシグナルを伝達することを考慮すると、その過程にZNF512Bが関与する可能性が極めて高い。そこでZNF512Bの富栄養条件と栄養枯渇条件におけるmTORC1への結合量の変化を免疫沈降法にて検討した。その結果、栄養枯渇条件でmTORC1への結合量が約1.7倍に増加することが確認され、かつmTORC1の下流エフェクターであるp-4EBP1の脱リン酸化がZNF512B未導入細胞に対して急速に亢進した。また、mTORC1の下流エフェクターであるS6 Kinaseのリン酸化はP110導入・未導入どちらにおいても5分の段階で完全に抑制された。しかしながら、翻訳開始因子eIF4Eに結合する翻訳リプレッサー4EBP1の脱リン酸化がP110導入細胞において急速に亢進する現象が生じた。したがって、P110は栄養環境の変化に対する感受性を制御している可能性が明らかとなった。

以上の結果より、ZNF512BはRaptorなどの既知の因子にはない栄養環境の変化に感受性を示すmTORC1の新規構成因子であり、栄養環境により局在を変化させることで栄養感知システムの末端機能を有している可能性が示唆された。今後、mTORC1栄養感知システムにおけるZNF512Bの役割および癌細胞と正常細胞との機能の違いについて多角的に検討し、栄養感知システムのメカニズムについて解析を行う。

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8件)

1. Yamamoto K, Shinomiya K, Ioroi T, Hirata S, Harada K, Suno M, Nishioka T, Kume M, Makimoto H, Nakagawa T, Hirano T, Bito T, Nishigori C, Miyake H, Fujisawa M, Hirai M.,

Association of Single Nucleotide Polymorphisms in STAT3 with Hand-Foot Skin Reactions in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Multiple Tyrosine Kinase Inhibitors: A Retrospective Analysis in Japanese Patients.

Target Oncol., 11(1), 93-99, (2015).
DOI: 10.1007/s11523-015-0382-9

査読有

2. Mizumoto A, Yamamoto K, Nakayama Y, Takara K, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M.,

Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor contributes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines.

J Pharmacol Exp Ther., 355(2), 152-158, (2015).

DOI: 10.1124/jpet.115.226639

査読有

3. Yamamoto K, Shichiri H, Uda A, Yamashita K, Nishioka T, Kume M, Makimoto H, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M,

Apoptotic effects of the extracts of cordyceps militaris via Erk phosphorylation in a renal cell carcinoma cell line.

Phytother. Res, 29, 707-713 (2015).

DOI: 10.1002/ptr.5305

査読有

4. Yamamoto K, Mizumoto A, Nishimura K, Uda A, Mukai A, Yamashita K, Kume M, Makimoto H, Bito T, Nishigori C, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M.

Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3).

PLoS One, 9(7):e102110, (2014).

DOI: 10.1371/journal.pone.0102110.

査読有

5. Yamamoto K, Uda A, Mukai A, Yamashita K, Kume M, Makimoto H, Bito T, Nishigori C, Hirano T, Hirai M,

Everolimus-induced human keratinocytes toxicity is mediated by STAT3 inhibition.

J Exp Clin Cancer Res, 32, 83, (2013).

DOI: 10.1186/1756-9966-32-83

査読有

6 . Kume M, Yasui H, Takahashi M, Yamawaki C, Higashiguchi K, Kobayashi Y, Kuroda D, Hirano T, Hirai M, Nakamura T, Perioperative change in plasma platinum concentration in patients receiving cisplatin-based chemotherapy. Jpn J TDM, 30(4):142-148 (2013). <http://jstdm.umin.jp/journal/3004.html>
査読有

7 . Omatsu H, Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Miki I, Tamura T, Nishiguchi K, Okamura N, Nakamura T, Azuma T, Hirano T, Ozawa K, Hirai M., TNF- α -857C>T Genotype is Predictive of Clinical Response after Treatment with Definitive 5-Fluorouracil / cisplatin-based Chemoradiotherapy in Japanese Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Int J Med Sci, 10(12), 1755-1760, (2013). DOI: 10.7150/ijms.6749
査読有

8 . Segawa M, Ogura J, Seki S, Itagaki S, Takahashi N, Kobayashi M, Hirano T, Yamaguchi H, Iseki K., Rapid stimulating effect of the antiarrhythmic agent amiodarone on absorption of organic anion compounds. Drug Metab Pharmacokinet. 28(3), 178-186, (2013). DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-010
査読有

〔学会発表〕(計1件)

1 . 七里博章、山本和宏、中川勉、平野剛、平井みどり、新規 mTORC1 結合因子 P110 の栄養感知システムとしての生理機能解析
第 37 回日本分子生物学会年会
平成 26 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平野 剛 (HIRANO Takeshi)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号：00322826

(2)研究分担者

平井 みどり (HIRAI Midori)
神戸大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70228766

(3)連携研究者

山本 和宏 (YAMAMOTO Kazuhiro)