
原 著

mTORC1 シグナル制御による髄芽腫細胞の増殖抑制

垣 矢 直 雅

新潟大学大学院医歯学総合研究科

分子神経生物学分野

(主任：那波 宏之教授)

Inhibition of mTORC1 Signaling Suppresses Medulloblastoma Cell Growth

Naomasa KAKIYA

*Department of Molecular Neurobiology, Brain Research Institute,
Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Sciences
(Director: Prof. Hiroyuki NAWA)*

要 旨

免疫抑制剤であるラパマイシンは mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の選択的な阻害剤であり、抗腫瘍効果が報告されている。

髄芽腫細胞株である DAOY 細胞の細胞増殖における mTORC1 シグナルの役割を検討した。mTORC1 はロイシンによっても活性調節されているので、細胞内取り込みを行うシステム L アミノ酸トランスポーターの阻害剤である 2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) 及び不活性型ロイシンアナログの Ac-Leu-NH₂ を用いて、mTORC1 シグナルの抑制を試みた。BCH, Ac-Leu-NH₂ ともに DAOY 細胞において濃度依存的に mTORC1 シグナルを低下させ、細胞数の減少をもたらした。eIF4E-binding protein (4EBP) のリン酸化サイトをアラニンに置換した mutant 4EBP を強制発現して mTORC1 下流の翻訳抑制を行うことによっても DAOY 細胞の細胞数の減少が認められた。

本実験では、顕著な細胞死やオートファジーのない条件下で、DAOY 細胞の細胞数の低下が見られたことから、mTORC1 シグナルの阻害が翻訳を抑制して細胞増殖を低下させたことが強く示唆された。

キーワード：mTORC1, p70S6K, 4EBP, LAP1, ロイシン

Reprint requests to: Naomasa KAKIYA
Department of Molecular Neurobiology
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野 垣 矢 直 雅

緒 言

髄芽腫は小児の小脳由来の未分化細胞を起源とする腫瘍であり、手術、放射線療法及び化学療法が行われる。近年、mammalian target of rapamycin (mTOR) の特異的阻害剤であるラパマイシンやそのアナログが、種々の腫瘍細胞の成長/増殖を抑制することが報告されている。

mTORはラパマイシンの標的分子として同定された酵母のTORの哺乳類でのホモログで、PIKファミリーに属する蛋白質キナーゼである。結合分子の違いによりラパマイシン感受性のmTOR complex 1 (mTORC1)、非感受性のmTORC2を形成する。mTORC1は翻訳(蛋白合成)およびオートファジー(蛋白分解)を制御し、細胞内の蛋白質のレベルを調節することで細胞の成長(サイズの増大や増殖)を担っている。mTORC1の基質として、翻訳調節因子であるp70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K)、eIF4E-binding protein (4EBP)、オートファジーの誘導に参与するULK1が報告されている¹⁾。

p70S6Kは多能性キナーゼであり、翻訳過程の開始因子であるeukaryotic initiation factor 4B、伸長因子であるeukaryotic elongation factor 2の活性化を通して、タンパク合成を制御している²⁾。また細胞サイズ・増殖・成育に参与することが示唆されており、p70S6Kを欠いたマウスでは細胞・身体サイズの抑制が見られることから、p70S6Kが細胞の成育面に、多大な影響力を持つことが明らかとなっている³⁾。

4EBPはcap結合タンパク質であるeukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)と結合し、eIF4F複合体形成を阻害している。4EBPはmTORC1の活性化に伴いリン酸化を受けてeIF4Eと解離することで、結果として翻訳開始の引き金となる。このようにmTORC1の基質は蛋白合成の制御因子であり、細胞の成長に深く関与している。またmTORC1はULK1のリン酸化を通じてオートファジーを抑制しており、mTORC1の阻害はオートファジーを誘導する。これらのことからmTORC1はがん治療の標的分子として考えられている。

mTORC1はインシュリンやEGFなどのチロシンキナーゼ型受容体のリガンドの成長因子によって活性化されるばかりでなく、アミノ酸、グルコースといった栄養素を感知して活性化される⁴⁾。活性化の経路に関してはまだ明らかでない点も多いが、著者らは神経細胞においてもロイシンがmTORC1を活性化することを報告している⁵⁾。ロイシンを細胞内に取り込む機構については、神経細胞においてはシステムLアミノ酸トランスポーターであることを明らかにしている。システムLアミノ酸トランスポーターはL-type amino acid transporter 1 (LAT1)あるいはLAT2が補助因子である4F2 heavy chain (4F2hc)とヘテロ二量体を形成し、機能性のトランスポーターとして働く。LAT1が種々の悪性腫瘍細胞で発現の亢進する癌・胎児性トランスポーターであり、正常細胞には類似の構造を持つLAT2が発現することが知られる⁶⁾。LAT1は大型の中性アミノ酸を輸送する交換輸送活性を示し、LAT2と比較して必須アミノ酸取り込み能力が高く、発現数も多いため、下流シグナルをより亢進することが示唆される。

そこで本研究では、ヒト髄芽腫細胞株DAOY細胞を用い、システムLアミノ酸トランスポーター特異的阻害剤であるBCH、およびロイシンアナログでmTORC1活性化作用を持たないAc-Leu-NH₂⁷⁾のmTORシグナル抑制作用と細胞数の変化を調べた。更に、リン酸化サイトがアラニンに置換されたmutant 4EBP (5A)⁸⁾の過剰発現によりmTORの基質である4EBPの下流シグナルを操作し、DAOY細胞の細胞数への影響を調べた。

材料と方法

培養細胞

ヒト小児髄芽腫細胞由来細胞株(DAOY細胞)は5%ウシ胎仔血清(FBS; BSI社)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma社)のメディウム中で5% CO₂, 37℃のインキュベーターで培養した。

RT-PCR

ISOGEN (日本ジーン社) を用いて DAOY 細胞から RNA を抽出後, 得られた RNA をテンプレートとし, RT-PCR HIGH-PLUS kit (TOYOBO 社) と, 以下のプライマーを用いて RT-PCR を行った. 4F2hc: Forward 5'-TGAATGAGTT-AGAGCCCGAGAAGCA-3', Reverse 5'-CTTCT-GCGCCGCTAGCTCGCGACAA-3', LAT1: Forward 5'-ATTATACAGCGCCTCTTTGCCATG-3', Reverse 5'-TGGAGGATGTGAACAGGGACCCATT-3', LAT2: Forward 5'-ACCGAAACAACAC-CGAA AAG-3', Reverse 5'-CAATCCAGAC-GATGAGAGCA-3', 予想される PCR 産物はそれぞれ 308 bp, 306 bp, 203 bp である.

試薬処理, サンプル調整

6well-dish に 5×10^5 cells/well となるように DAOY 細胞を播種し, N-acetyl-leucine amide (Ac-Leu-NH₂; Bachem 社), (cis)-3-Amino-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid hydrochloride (BCH; Sigma 社) を 2 時間処理した. Lysis buffer (2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete EDTA-free; Roche 社) 1mM Na₃VO₄, 20 mM NaF) で細胞を溶解. 溶解液の超音波処理を行った後, 16°C で 15,000 rpm, 30 分間の遠心分離を行い, 上清を回収した. タンパク濃度を測定後, プルダウンサンプル調整は別途, Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech 社) の Sepharose beads を添加し 4°C で 2 時間転混した. 4°C, 3,000 rpm, で遠心後, 上清を除去し, Sepharose の洗浄を行った. 5× Sample buffer (50% glycerol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% β-mercaptoethanol, BPB) を用いてサンプル調製を行った.

放射ラベルロイシンの取り込み

[¹⁴C]ロイシンの取り込みと BCH による阻害の実験は既報⁵⁾ と同様の方法で行った.

ウエスタンブロット

サンプルを 95°C で 5 分間熱処理し, アクリルアミドゲルで電気泳動を行い, 分離後ゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写, 10% BSA/TNT (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.05% Tween20, 150 mM NaCl) で室温, 3 時間ブロッキング. 1 次抗体で一晩, 4°C で反応させた. 洗浄後, 適切な 2 次抗体で室温, 1 時間反応させた. 洗浄後, ECL (Perkin Elmer 社) を用いてフィルム感光により蛋白シグナルを検出した. 1 次抗体は下記のものを用いた. anti-phospho-p70 S6Kinase (Thr389; CST), anti-p70 S6 Kinase (ST: H-9; Santa Cruz 社), phospho4E-BP1 (Thr36/47) (CST 社), phospho-mTOR (Ser 2448; CST 社), mTOR (MBL 社).

トランスフェクション

6well-dish に DAOY 細胞を 5×10^5 cells/well 播種. 翌日, Fugene 6 Transfection Reagent (Roche 社) を用いて付属の説明書通りに行った. 24 時間後, 96well-dish に 10^4 cells/well でまきかえを行い, 72 時間後に細胞数測定実験で使用した.

細胞数測定

96well-dish に DAOY 細胞を 1×10^4 cells/well 播種し, 0, 10, 30mM の Ac-Leu-NH₂, 0, 3, 10 mM の BCH, 及び 20 nM Rapamycin (CAL-BIOCEM 社) を 24 時間ごとに 2 回添加し, 48 時間後に WST 法 (Cell counting kit 8: 同仁社) を用いて, 吸光測定 (450nm) により評価を行った.

結 果

DAOY 細胞でのシステム L アミノ酸トランスポーター構成分子の発現とロイシン取り込みへの役割

DAOY 細胞におけるシステム L アミノ酸トランスポーターの構成分子である LAT1, 4F2hc, LAT2 の mRNA の発現を RT-PCR により検出した (図 1A). LAT1 は, 補助因子である 4F2hc と共に RNA の発現が見られた. 一方, 正常神経細

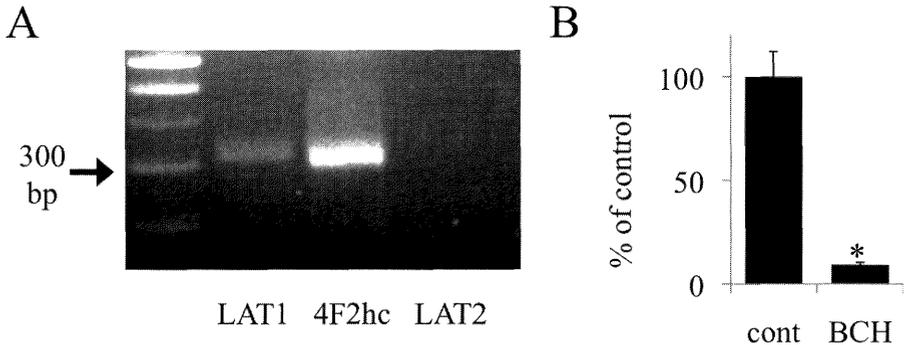


図1 DAOY細胞でのアミノ酸トランスポーター特異性
 A) DAOY細胞でのLAT1, 4F2hc, LAT2のRNAをRT-PCRで確認。
 B) DAOY細胞での10mM BCHによるロイシン取り込みへの影響。
 (n = 5, P * < 0.01)

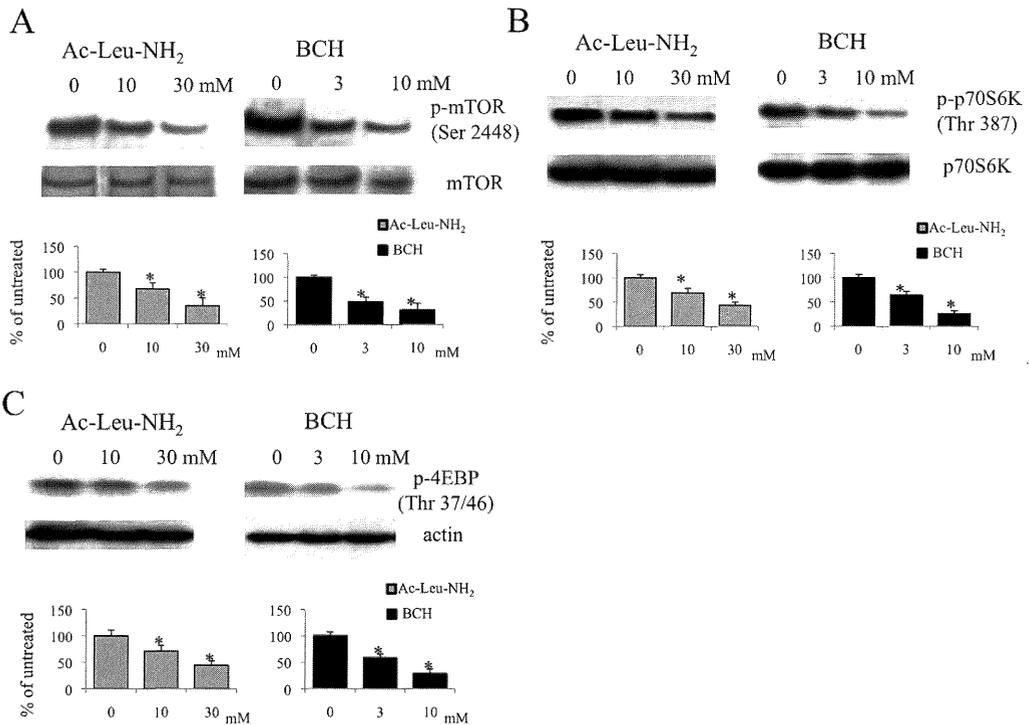


図2 DAOY細胞でのmTORC1経路へのAc-Leu-NH₂, BCH処理の影響
 A) Ac-Leu-NH₂, BCHによるDAOY細胞での濃度依存的なp-p70S6Kへの影響. グラフはp70S6K量で補正されたp-p70S6K量比を表示.
 B) Ac-Leu-NH₂, BCHによるDAOY細胞での濃度依存的なp-mTORへの影響. グラフはmTOR量で補正されたp-mTOR量比を表示.
 C) Ac-Leu-NH₂, BCHによるDAOY細胞での濃度依存的な4EBPへの影響. グラフはactin量で補正されたp-4EBP量比を表示.
 A-C) n = 3, P * < 0.01

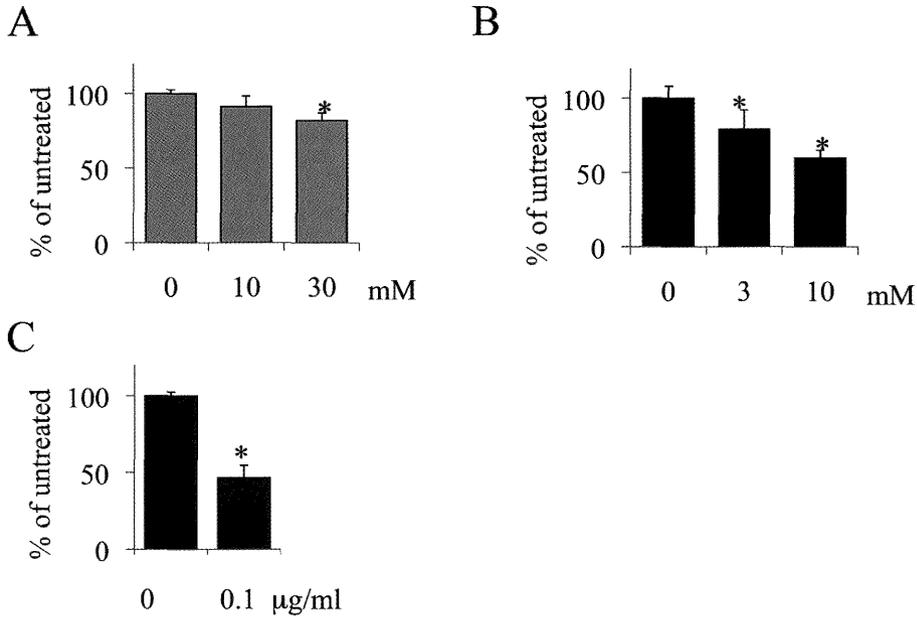


図3 DAOY細胞でのAc-Leu-NH₂, BCH処理による細胞数への影響
 A) Ac-Leu-NH₂によるDAOY細胞での濃度依存的な細胞数への影響.
 B) BCHによるDAOY細胞での濃度依存的な細胞数への影響.
 C) 0.1mg/mlラパマイシンによるDAOY細胞での細胞数への影響.
 A-C) n = 5, P * < 0.01

胞で発現がみられるLAT2のmRNAはDAOY細胞では発現していなかった。DAOY細胞ではLAT1, 4F2hcがヘテロ二量体を形成し、アミノ酸トランスポーターとして機能していることが示唆された。次にロイシンの取り込みがシステムL系を介しているかをこのトランスポーターの特異的阻害剤であるBCHを用いて調べた(図1B)。DAOY細胞では細胞内へのロイシンの取り込みに、システムLアミノ酸トランスポーターが大きな役割を果たしていることが明らかとなった。

DAOY細胞でのロイシンの作用の阻害によるmTORシグナル経路への影響

ロイシンはmTORC1の活性化を、神経細胞を含む種々の細胞で引き起こすことが知られている⁹⁾。そこでロイシンの作用を阻害するため、mTORC1活性化作用を持たないアナログであるAc-Leu-

NH₂、およびシステムLアミノ酸トランスポーターの選択的阻害剤BCHを用いた。これら薬剤によるmTORC1シグナル経路への影響を、活性変化に伴うリン酸化比率の変化をウエスタンブロットにより評価した。Ac-Leu-NH₂とBCHはmTOR、そしてmTORの基質であるp70S6K, 4EBPのリン酸化を濃度依存的に抑制した(図2A-C)。

DAOY細胞でのロイシンの作用の阻害による細胞数への影響

DAOY細胞では他の腫瘍細胞で報告されているようにラパマイシンにより細胞成育が大きく阻害された(図3A)。つまりDOY細胞ではmTORC1依存性の細胞成長があると考えられた。そこでmTORC1経路を阻害したAc-Leu-NH₂, BCHをDAOY細胞に作用させ、細胞数の変化を調べ

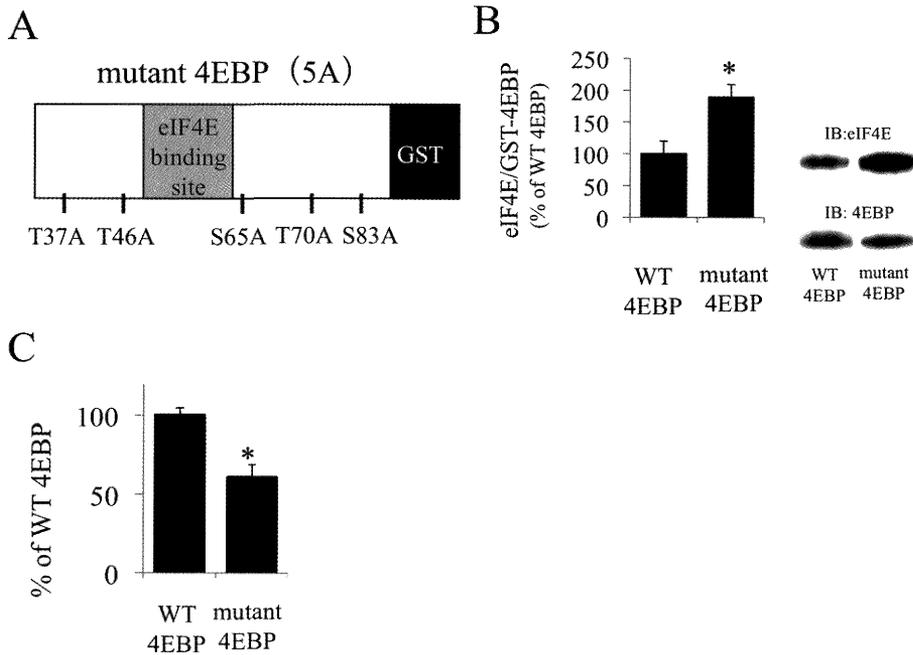


図4 mutant 4EBP (5A) による, mTOR 下流シグナル抑制効果

A) Mutant 4EBP (5A) 模式図

B) WT-, mutant-4EBP の GST を利用したプルダウン後, 4EBP, eIF4E 抗体でウエスタンブロットにより検出. グラフは 4EBP 量で補正された eIF4E 量比で表示. (n = 3, P * < 0.01)

C) DAOY 細胞での mutant 4EBP (5A) による細胞数への影響. (n = 4, P * < 0.01)

た. 結果として, Ac-Leu-NH₂, BCH 共に濃度依存的に DAOY 細胞の細胞数の増加を抑制した. この濃度の範囲では両薬剤とも細胞死を引き起こさなかった. すなわち, Ac-Leu-NH₂, BCH によるロイシンの作用の抑制が, mTOR シグナルを不活性化し, 細胞成長の抑制が起こったと推察された (図 3B, C).

DAOY 細胞での mutant 4EBP (5A) の細胞生存への影響

mTORC1 シグナルはオートファジーにも関与することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾. またオートファジーはがん治療のターゲットの過程にもなっている. そこで, 図 3 で示された細胞数の減少が, オートファジーである可能性を排除するため, 4EBP

の強制発現の実験を行った. 4EBP のリン酸化部位を全てアラニンに置換した mutant 4EBP (5A) (図 4A) を遺伝子導入すると, 血清刺激下でも WT 4EBP より多く eIF4E と結合していた (図 4B). eIF4E は 4EBP と結合していると eIF4G と結合できず, eIF4F 複合体を形成できない. この状態は翻訳が抑制された状態である. この状態における細胞数の変化を調べた. WT 4EBP を一過性に発現させた形質移入細胞と比較し, mutant 4EBP (5A) ではより顕著な細胞数の減少が確認された (図 4C). 以上の結果より, mTORC1 から 4EBP を介した翻訳を抑制することによって, 図 3 と同様に細胞数の増加が抑制された. 以上のことから, BCH, Ac-Leu-NH₂ による細胞数の減少は, オートファジーの誘導によるものではなく,

タンパク合成の抑制による結果であることが強く示唆された。

考 察

mTORC1 は栄養素シグナルと増殖シグナルを統合し、細胞の成長を司るキナーゼである。その特異的阻害剤であるラパマイシンやそのアナログは種々の腫瘍細胞の成長を抑制することが報告されている。本研究では mTORC1 の上流のアミノ酸によるシグナル伝達を阻害することによって、髄芽腫細胞の増殖を抑制することを初めて示した。このことは mTORC1 を分子標的として抗腫瘍薬の開発を考える際に、当該分子そのものだけではなく「カスケード」を標的として、多点での創薬の可能性を示すものである。

mTORC1 の阻害は翻訳抑制とオートファジーの誘導を引き起こすが、mutant 4EBP を用いた実験から、翻訳抑制が大きな役割を果たしていることが明らかになった。細胞は分裂する際に、一定の大きさになる必要があることが酵母などの研究から示唆されているので、mTORC1 の阻害により細胞成長が抑制され、増殖抑制につながるのかもしれない。

アミノ酸は蛋白質の「原料」に留まらず、細胞内シグナルカスケードのトリガーとして機能することが明らかとなってきた¹²⁾¹³⁾。分岐鎖アミノ酸であるロイシンが mTORC1 を活性化することが示されてきたが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。

本研究でも Ac-Leu-NH₂、BCH のパーシャルな効果を考えると、mTORC1 シグナルの活性化路については他のアミノ酸トランスポーターを介した作用や新規の細胞表面受容体なども考慮する必要があるのかもしれない¹⁴⁾。

mTOR は蛋白の合成や分解といった転写以降の細胞内イベントで大きな役割を果たす分子であり、生物学的作用としては、エネルギー代謝や神経機能などまで幅広いものがある。その活性を多点で制御することは細胞内の生化学的反応と生物学的応答を探るためのツールとなるばかりでな

く、ここでも示した癌などの疾患に対する創薬という観点からも重要なものであると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、ご指導頂いた新潟大学脳研究所・分子神経生物学分野の那波宏之教授、武井延之助教授に深く御礼申し上げます。

また、ラボメンバーの御厚意に深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N and Mizushima N: Nutrient - dependent mTORC1 Association with the ULK1 - Atg13 - FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981 - 1991, 2009.
- 2) Mieulet V, Roceri M, Espeillac C, Sotiropoulos A, Ohanna M, Oorschot V, Klumperman J, Sandri M and Pende M: S6 kinase inactivation impairs growth and translational target phosphorylation in muscle cells maintaining proper regulation of protein turnover. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C712 - C722, 2007.
- 3) Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC and Thomas G: S6K1 (-/-)/S6K2 (-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin - sensitive 5' - terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen - activated protein kinase - dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24: 3112 - 3124, 2004.
- 4) Shaw RJ and Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 25; 441: 424 - 430, 2006.
- 5) Ishizuka Y, Kakiya N, Nawa H and Takei N: Leucine induces phosphorylation and activation of p70S6K in cortical neurons via the system L amino acid transporter. *J Neurochem* 106: 934 - 942, 2008.
- 6) Kim DK, Kim IJ, Hwang S, Kook JH, Lee MC, Shin BA, Bae CS, Yoon JH, Ahn SG, Kim SA,

- Kanai Y, Endou H and Kim JK: System L - amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neurosci Res* 50: 437 - 446, 2004.
- 7) Shigemitsu K, Tsujishita Y, Miyake H, Hidayat S, Tanaka N, Hara K and Yonezawa K: Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 26: 303 - 306, 1999.
- 8) Eguchi S, Tokunaga C, Hidayat S and Oshiro N: Different roles for the TOS and RAIP motifs of the translational regulator protein 4E - BP1 in the association with raptor and phosphorylation by mTOR in the regulation of cell size. *Genes Cells*. 11:757 - 766, 2006.
- 9) Murin R and Hamprecht B: Metabolic and regulatory roles of leucine in neural cells. *Neurochem Res* 33: 279 - 284, 2008.
- 10) Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M and Kim DH: ULK - Atg13 - FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell* 20: 1992 - 2003, 2009.
- 11) Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA and Sellers WR: mTOR inhibition reverses Akt - dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF - 1 - dependent pathways. *Nat Med* 10: 594 - 601, 2004.
- 12) Kanai Y and Hediger MA: Primary structure and functional - characterization of a high - affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467 - 471, 1992.
- 13) Wang X and Proud CG: The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiol* 21: 362 - 369, 2006.
- 14) Mortimore GE, Wert JJ Jr, Miotto G, Venerando R and Kadowaki M: Leucine - specific binding of photoreactive Leu(7) - MAP to a high - molecular - weight protein on the plasma - membrane of the isolated rat hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 200 - 208, 1994.

(平成24年1月17日受付)
