

論文の内容の要旨

新規 TGF- β 標的因子 TUFT1 の mTOR シグナルにおける機能解析

川崎夏実

1. 背景

mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin)は、細胞の増殖や生存に重要な役割を担う、非典型的なセリン/スレオニンキナーゼである。mTOR は構成サブユニットの違いにより、mTORC1 および mTORC2 という二つの複合体を形成する。そのうち、mTORC1 は、増殖因子やアミノ酸・細胞内の栄養・ストレス状態に応答して活性化され、mRNA の翻訳やリボソームの生合成を司る。mTORC1 の下流では、多くのプロセスが、がんの進行と深く関わるため、治療の標的として長く注目されてきた。しかし、現在までに開発されてきた阻害剤の効果は芳しくなく、新たなタイプの mTOR 阻害剤の開発が強く求められている。

メンブレントラフィックとは、膜や小胞を介した細胞内の物質輸送システムであり、Rab 低分子量 G タンパク質によって制御されている。Rab は、生体のさまざまなプロセスに関与する。このため Rab タンパク質自体や、その活性制御因子の異常が、がんに関係することは既に良く知られているが、Rab の発現異常ががんの悪性化に関わるメカニズムについては不明な部分が多い。また、メンブレントラフィックは mTOR の活性化の過程にも必要であるとも考えられてきた。正常な Rab の活性制御が、正常な mTOR の活性制御に必須であると考えられており、mTORC1 の活性を制御する Rab の制御因子もいくつか知られているが、Rab の活性と mTOR を結びつけるメカニズムは不明な部分が多く残されている。

肺がんの中で最も患者数の多い非小細胞肺がんの一つである肺腺がんにおいて、一般に予後良好因子として、転写因子 thyroid transcription factor-1 (TTF-1)が知られている。先行研究の結果、肺腺がん細胞において TTF-1 は transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルの細胞内情報伝達因子 Smad3-Smad4 複合体形成を核内で阻害し、がん抑制的に働くことが明らかとされてきた。TGF- β は、もともとがん抑制因子として注目されてきた因子であるが、その一方で、進行がんにおいては、がんの進展を促進する因子としても作用する (TGF- β 作用の二面性)。本研究では、発現マイクロアレイや chromatin immunoprecipitation (ChIP) –sequencing などの網羅的解析データを用いて、TTF-1 による発現抑制と Smad3 による発現誘導を受ける代表的な新規標的として TUFT1 を同定した。

TUFT1 はもともと、歯のエナメル質の発生、構造形成および石灰化に関与する因子として同定、解析されてきた。一方、歯以外にも肺・腎・肝臓などの組織、特にがん組織で広く発現が認められることが明らかとなり、普遍的な機能を持つことが期待された。TUFT1 とがんとの関連性を示唆する報告も複数存在するが、TUFT1 の詳細な機能については未だ明らかでない。以上のことが

ら、TUFT1 の肺がんなどにおける機能を解明することを目的として、本研究を開始した。

2. 結果

(1) がん抑制遺伝子 TUFT1 の同定

まず、*TUFT1* の発現が高いほど、肺がん、乳がん、胃がんなど複数のがんにおいて患者予後不良となることを見出した。特異的 siRNA を用いたノックダウン実験を行うと、*TUFT1* をノックダウンした細胞において、アクチンストレスファイバーの減少、運動能、細胞増殖能の低下を認めた。また、*in vivo* 実験系において、*TUFT1* ががんの増殖・転移にも影響を及ぼすことも見出した。さらに *TUFT1* の機能を網羅的に探索する目的で RNA-sequencing により遺伝子発現データを取得し、GSEA (gene set enrichment analysis)を行うと、*TUFT1* ノックダウン細胞と比較してコントロール細胞において mTORC1 シグナルに関する遺伝子セットが濃縮した。さらに *TUFT1* は mTORC1 シグナルにより翻訳制御を受ける主要な標的である RhoA、Rac1、Cdc42 および、cyclin D1 および cyclin D3 の発現をタンパク質レベルで制御することも示された。以上の結果を踏まえ、*TUFT1* と mTORC1 の関係について着目した。

(2) TUFT1 と mTORC1 シグナル

TUFT1 が mTORC1 に及ぼす影響を検討したところ、*TUFT1* のノックダウンは上流の AKT のリン酸化を低下させることなく、下流の S6K1 リン酸化レベルを低下させた。アミノ酸存在下において Rag が活性化を受けると、mTORC1 はリソソーム膜表面に局在し、活性化を受けることが知られる。そこで mTORC1 の細胞内局在に対する *TUFT1* の影響を調べたところ、*TUFT1* をノックダウンした細胞において、リソソームと mTOR 両者の細胞質全体への拡散を認めた。これは Rag とは独立した経路を介することを確認した。

(3) TUFT1 とメンブレントラフィック

以上の結果を受け、*TUFT1* がリソソームの機能に及ぼす影響について複数の手法により調べたが、*TUFT1* はリソソーム自体の活性には大きく影響しないものと考えられた。また、初期エンドソームの局在およびトランスフェリン取り込みアッセイの結果より、*TUFT1* はオルガネラ小胞の局在や細胞内輸送全般に関与することで、mTORC1 シグナルに影響するという仮説を立てた。

(4) メンブレントラフィックと mTORC1 シグナル

細胞内メンブレントラフィックは、微小管輸送に依存している。そこで、逆行性輸送を司るダイニンの阻害剤を用いたところ、リソソーム局在および AKT 非依存的な S6K1 リン酸化レベルの低下について、*TUFT1* のノックダウンと類似した表現型をもたらした。また、同じく微小管モータータンパク質である *Kif5b* を過剰発現させた場合にも、同様な結果を得た。また、リソソームの逆行性輸送を司る Rab7 の恒常活性型変異体を介して、リソソームの核周囲への集積を引き起こすと、*TUFT1* ノックダウンによる mTORC1 の活性低下をわずかにレスキューした。このことより、*TUFT1* による mTORC1 活性制御の一部は、リソソーム局在制御を介する可能性が示唆される一方、リソソーム局在に依存しないメカニズムの存在が示唆された。

(5) TUFT1 結合因子 RABGAP1 と mTORC1 シグナル

続いて TUFT1 の結合因子 RABGAP1 に着目した。RABGAP1 のノックダウンは、mTORC1 シグナルの活性低下と、リソソームの拡散を引き起こし、TUFT1 ノックダウン細胞と類似した表現型を示した。また、この表現型は RABGAP1 の GAP 活性依存的であることも見出した。さらに本研究では、RABGAP1 の標的候補のうち、mTORC1 シグナルに関与するものの一つとして Rab36 を同定した。さらに、RABGAP1 の Rab36 に対する GAP 活性は、TUFT1 の存在により亢進することも示された。以上の結果より、TUFT1 は RABGAP1 と協調して機能し、Rab36 をはじめとする Rab の活性を制御することで、mTORC1 シグナルを正に制御することが示唆された。

(6) 治験薬 perifosine の新規作用機序

最後に、TUFT1 によるメンブレントラフィック、細胞内コンパートメントの局在制御機構が、がんの治療標的となり得る可能性を探索するべく、薬剤感受性試験を行ったところ、TUFT1 の発現量と治験薬 perifosine の感受性が有意な負の相関を示した。Perifosine はアルキルリン脂質 AKT 阻害剤の一種であるが、多岐に渡る作用機序の詳細は明らかでない。Perifosine は、大腸がんおよび多発性骨髄腫において第三相試験に進んだ治験薬としても期待されており、作用機序の解明は急務である。本研究では、perifosine がリソソームおよび初期エンドソームの局在に影響を及ぼすことを示した。さらに、TUFT1 の発現が比較的低い NCI-H460 細胞において perifosine が AKT よりも低濃度の条件で S6K1 のリン酸化を抑制することも明らかとなった。以上の結果より、perifosine が、メンブレントラフィックへの影響を介して mTORC1 シグナルの抑制をする可能性と、その有用性が示唆されたと考える。

3. 考察

PI3K-AKT-mTOR シグナルは、がんの治療標的として長く注目され続けてきた。ところが、これまで数多くの阻害剤が開発されてきたものの、そのごく一部で治療効果が示されているに過ぎない。本研究の薬剤感受性試験の中で、その感受性と TUFT1 の mRNA 発現量に有意な負の相関が認められるとして同定した AKT 阻害剤 perifosine も、大腸がんおよび多発性骨髄腫において第三相試験に進んだものの、上市には至っていない。

Perifosine は、もともと AKT の PH ドメインに作用し、脂質ラフトへの移行を阻害すると考えられていたが、それ以外にも多岐に渡る作用を示し、作用機序の全貌は明らかでない。本研究では新たに、perifosine が TUFT1-RABGAP1 と関連したメンブレントラフィックに作用し、mTORC1 を直接阻害する可能性を示した。将来的に、TUFT1 自身もしくは関連するメンブレントラフィックが新たながんの治療標的、もしくはバイオマーカーとなり得ることに期待したい。