

中皮腫治療標的因子探索を目的とした mTOR 経路制御機構の解析

愛知県がんセンター研究所
分子腫瘍学部 主因研究員
佐藤 龍洋

研究の背景・目的

中皮腫は、肺・心臓・腸などの臓器を保護する膜に存在する中皮細胞のがん化により引き起こされる病気である。なかでも肺を覆う胸膜の中皮腫が約 80%と最も多く、その主な原因はアスベストの曝露である。アスベストの輸入は 1970 年代にピークを迎え、その後 1990 年代後半まで輸入されていたが、中皮腫発症までの潜伏期間が 30-40 年と長いため、現在も患者が増え続けている。中皮腫は早期発見が難しく、外科的手法により除去することが困難である。現在の化学療法で用いられているシスプラチンとペメトレキセドの併用投与は患者の生存期間を延長するものの中皮腫の縮小にはいたらず、また、重篤な副作用も問題となっている。このため、より有効な新規中皮腫治療薬の開発が求められている。

中皮腫においては Hippo シグナル伝達経路異常が高頻度で見られ、また、Hippo シグナル伝達経路の異常は mTOR シグナル伝達経路の活性化をもたらすと言われている。mTOR 活性化は中皮腫を誘導と推測できるが、mTORC1 活性化が中皮細胞がん化をひきおこす分子機構についてはいまだ不明な点がおおい。本研究では、申請者らが見出した mTORC1 活性化因子 Rheb、および Rheb に結合する新規タンパク質 SmgGDS に着目し、中皮細胞に及ぼす影響とその分子機序を解析した。

研究結果・考察

Rheb-mTORC1 経路が中皮細胞がん化に関与するかどうかを調べるため、GFP-Rheb、もしくはコントロールとして GFP を発現させた不死化中皮細胞を作成した。GFP-Rheb を発現した細胞では GFP を発現した細胞と比較して S6K、S6 のリン酸化量が高く、mTORC1 シグナル伝達経路が活性化した細胞が作成できた。これらの細胞増殖を継時的に観察したところ、培養後 3 日目において GFP-Rheb 発現細胞はコントロール細胞より早い増殖能を示した。また、コントロール細胞と比較して GFP-Rheb 発現細胞は多数のスフィアを形成した。これら

の結果から、Rheb は中皮細胞において mTORC1 を活性化するとともに、がん化を促進すると考えられた。

次に Rheb の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、GFP-Rheb の蛍光は、核近傍および細胞質に強く観察された。各種細胞内小器官のマーカーと共染色を行ったところ、GFP-Rheb は Golgin97, LAMP1 と共局在することがわかった。これらの結果から、Rheb は細胞質とゴルジ体、リソソームに局在すると考えられた。

SmgGDS は細胞質に局在すると考えられていることから、Rheb は SmgGDS と細胞質で結合すると考えられる。そこで FLAG-Rheb を HEK293T 細胞に発現させた後、細胞質画分を精製して Rheb-SmgGDS 間結合を検出した。免疫沈降を行った結果、SmgGDS は FLAG-Rheb と細胞質で結合していることを明らかにした。また、Rheb の脂質修飾領域を欠如した変異体は SmgGDS との結合が非常に弱く、一方、Rheb の不活性型変異体は SmgGDS と強く結合した。これらの結果から、SmgGDS は Rheb の不活性体と結合すること、その結合に Rheb の脂質修飾が必要であることが示唆された。

Rheb-SmgGDS 結合による mTORC1 活性への影響を調べるため、SmgGDS のノックダウンを実施した。その結果、SmgGDS をノックダウンした細胞は、mTORC1 基質の S6K、S6 のリン酸化が低下していた。また、ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して、アミノ酸や血清刺激による S6K、S6 リン酸化の上昇が見られなかった。最後に、Rheb が高活性化した TSC2 ノックアウトマウス由来腎臓がん細胞、およびその細胞に TSC2 を再発現させて Rheb を抑制したコントロール細胞を用いて SmgGDS のノックダウンを行ったところ、Rheb 高活性化細胞でのみ SmgGDS による増殖抑制が観察された。

本研究により、SmgGDS が Rheb の局在、および mTORC1 シグナル伝達経路の活性化に関与することを見出した。また Rheb の高発現は中皮細胞がん化を促進すると考えられた。これらの研究成果は、今後の中皮腫発症機構の解明や中皮腫治療薬の開発に貢献すると期待される。