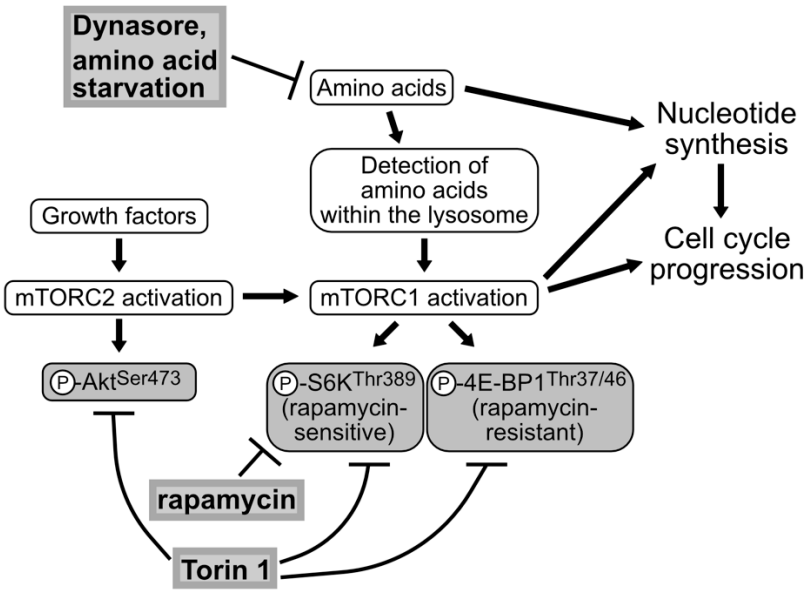
152　代謝抑制剤としてのエンドサイトーシス阻害剤の検証	渋谷　周作

【目的】mTORC1 は、アミノ酸ータンパク質代謝を担う主要なシグナル複合体である。mTORC1 は細胞外のアミノ酸によって活性化されることが知られていたが、近年、アミノ酸による mTORC1 活性化のメカニズム解明が急速に進み、細胞外のアミノ酸がリソソームの内腔に到達した後に mTORC1 を活性化することが判明した。しかし、細胞外のアミノ酸がどのようにしてリソソーム内腔に到達するのかは不明瞭な点が多かった。我々は最近の報告において「ダイナミン依存性エンドサイトーシスによりアミノ酸が細胞内に取り込まれ、mTORC1 を活性化する」というメカニズムを明らかにした。この発見により、エンドサイトーシス阻害剤が mTORC1 阻害剤として機能する可能性が示された。本研究においては「過栄養を原因とする疾患の治療・予防に向けたエンドサイトーシス制御」という新しいアプローチの実現に向けて、細胞レベルでの栄養取り込み阻害剤としてのエンドサイトーシス阻害剤が、細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】HEK293T 細胞を用いて実験を行った。ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるダイナソア、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン、mTORC1/2 阻害剤である Torin 1、アミノ酸飢餓を引き起こすアミノ酸不含培地で細胞を処理し、ウエスタンブロット法により各種の mTORC1/2 ターゲットリン酸化サイトを検証した。また、細胞数の測定、WST アッセイによる細胞代謝活性の測定、フローサイトメトリーによる細胞周期プロファイルの検証を行った。

【結果】比較的弱い mTORC1 阻害剤であるラパマイシンは、ラパマイシン感受性リン酸化サイトである S6K（Thr389）の脱リン酸化を誘導し、代謝抑制効果を示した。一方、ダイナソア、Torin 1、アミノ酸飢餓は、S6K（Thr389）だけでなく、ラパマイシン非感受性リン酸化サイトの 4E-BP1（Thr37/46）も脱リン酸化したことから、強力な mTORC1 抑制作用を有することが示された。さらに、ダイナソア、Torin 1、アミノ酸飢餓により、細胞代謝の抑制だけでなく、細胞増殖の抑制が認められた。フローサイトメトリーを用いて細胞周期をより詳細に解析した結果、これらの薬剤・飢餓による細胞増殖抑制は S 期における停滞が原因であることが推測された。

mTORC1 を介した各種阻害剤の細胞増殖への影響



152. 代謝抑制剤としてのエンドサイトーシス阻害剤の検証

渋谷　周作

山口大学 共同獣医学部 獣医衛生学分野

Key words：mTORC1，アミノ酸，エンドサイトーシス，シグナル伝達

緒　言

Mechanistic target of rapamycin complex 1（mTORC1）は、アミノ酸ータンパク質代謝を担う主要なシグナル複合体であり、がんや老化の進行に関係が深いと考えられている。mTORC1 は細胞外のアミノ酸によって活性化されることが知られていたが、近年、アミノ酸が mTORC1 を活性化するメカニズムが急速に明らかになりつつある［1］。細胞外のアミノ酸は、リソソームの内腔に到達した後、細胞質の mTORC1 のリソソームへの移動を誘導することによって mTORC1 を活性化する。この活性化は、リソソーム膜上の mTORC1 活性化因子である Ras homolog enriched in brain（Rheb）と mTORC1 が出会うことによる。しかし、細胞外のアミノ酸がどのようにしてリソソーム内腔に到達するのかは不明瞭な点が多かった。我々は最近の報告において「細胞外液取り込み機構であるエンドサイトーシスによりアミノ酸が細胞内に取り込まれ、mTORC1 を活性化する」というメカニズムを明らかにし［2］、この発見により、エンドサイトーシス阻害剤が mTORC1 阻害剤として機能する可能性が示された。

過去の報告では、mTORC1 を適度に抑制すると様々な細胞内シグナル伝達経路が活性化し、一般的に生体にとって望ましい反応が起こることが知られている（オートファジーの亢進、タンパク質・脂質合成の低下、炭水化物の利用低下、インスリン感受性の増加、寿命の延長）［3］。実際に、既存の mTORC1 阻害剤がすでに免疫抑制剤、抗がん剤として臨床応用されているが、mTORC1 をターゲットとした阻害剤を細胞に投与すると、代償性の栄養利用（外界からの栄養取り込み亢進・オートファジーによる栄養素生成の亢進）が起こる［4］。このことが、阻害剤としての完全性を損ねている。エンドサイトーシス阻害剤はこれらの代償性反応をも阻害するため、効率よく細胞の栄養利用を阻害することができると考えられる。また、mTORC1 阻害剤は長期投与すると、近縁の mTORC2 も阻害してしまう。mTORC1 阻害剤はこのオフターゲット効果（mTORC2 阻害）により、インスリン抵抗性の増悪などの副作用を引き起こすことが知られている［3］。一方、エンドサイトーシス阻害剤はその作用メカニズムから考えて mTORC2 に影響を及ぼさないと考えられ、実際に影響しないことが確認されている［2］。

本研究においては「過栄養を原因とする疾患の治療・予防に向けたエンドサイトーシス制御」という新しいアプローチの実現に向けて、細胞レベルでの栄養取り込み阻害剤としてのエンドサイトーシス阻害剤が、細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

方　法

1.　細胞

HEK293T（293T）細胞は理化学研究所から購入し、10% fetal bovine serum（FBS）および 1×ストレプトマイシン／ペニシリンを含む DMEM 培地（Wako）内で 5% CO_2 インキュベーターを用いて培養した。

2.　ウエスタンブロット

293T 細胞を 10% Nu-serum（Thermo Fisher）を含む RPMI 培地（Wako）に懸濁し、コラーゲン（Cellmatrix type I-C、新田ゼラチン）でコートした 12 ウェルプレートに 2×10^5 cells/well で播種した。ダイナミン阻害剤 Dynasore（ダイナソア）（Abcam）は FBS 中のアルブミンによって不活化されることが報告されているため［5］、ダイナソア処理時には FBS の代わりに Nu-serum を用いた。細胞を CO_2 インキュベーター内で 18～21 時間培養した後、各図に記

載の通りに細胞を処理した。その後、細胞を Phosphate-buffered saline（PBS）にて洗浄し、氷冷した Lysis バッファー（20 mM Tris-HCl（pH 7.5）、50 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、2.5 mM Pyrophosphate、1 mM β-glycerophosphate、1 mM Orthovanadate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail（cOmplete, Sigma-Aldrich））を加えて細胞を溶解した。細胞溶解液は 14,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、上清を SDS-PAGE サンプルバッファーと混合した後、95℃で 5 分間処理した。サンプルは 10%または 15%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンはブロッキングバッファー（0.1% Tween 20 および 2%スキムミルクを含む Tris-buffered saline）で処理し、目的のタンパク質を特異的な一次抗体および二次抗体で検出した。検出には EzWestLumi plus（Atto）と LuminoGraph I（Atto）を用いた。

3. 細胞数の測定

293T 細胞を 10% Nu-serum を含む RPMI 培地に懸濁し、コラーゲン（Cellmatrix type I-C）でコートした 6 ウェルプレートに 2×10^5 cells/well で播種した。細胞を CO_2 インキュベーター内で 20.5～21 時間培養した後、各図に記載の薬剤で 24 時間処理した。その後、細胞を 500 μl の 0.05%トリプシンで剥離し、500 μl の 10% Nu-serum 含 RPMI 培地を加えて懸濁した。さらに等量の 0.4%トリパンブルーを加え、TC20 全自動セルカウンター（Bio-Rad）を用いて細胞数を測定した。得られた結果は、Prism 7（GraphPad Software）を用いた ANOVA および Dunnett の多重比較検定により統計解析を行った。

4. Water-soluble Tetrazolium salts （WST）アッセイ

細胞の代謝活性を測定するために、Cell Counting Kit-8（同仁化学）を用いた WST アッセイを行った。293T 細胞を 10% Nu-serum を含む RPMI 培地に懸濁し、96 ウェルプレートに 1×10^4 cells/well で播種した。細胞を CO_2 インキュベーター内で 20.5～21 時間培養した後、各図に記載の薬剤で 24 時間処理した。各処理は 3 ウェル分行い、平均値を算出した。薬剤処理後、10 μl の Cell Counting Kit 試薬を各ウェルに加え、プレートを CO_2 インキュベーター内で 2 時間静置し、iMark プレートリーダー（Bio-Rad）を用いて 450 nm の吸光度を測定した。薬剤自体が 450 nm 吸光度値をもつ場合があるため、細胞を含まず薬剤のみ加えたウェルの 450 nm 吸光度値をバックグラウンド値として用いた。得られた結果は、Prism 7（GraphPad Software）を用いた ANOVA および Dunnett の多重比較検定により統計解析を行った。

5. フローサイトメトリー

上述の「細胞数の測定」と同様の方法で、293T 細胞を 6 ウェルプレート内で培養し、各図に記載の薬剤で 24 時間処理した。その後、細胞を 500 μl の 0.05%トリプシンで剥離し、500 μl の 10% Nu-serum 含 RPMI 培地を加えて懸濁した。細胞を 1.5 ml チューブに移し、1,500 rpm（200×g）で 3 分間遠心し、上清を除去したのち、細胞を 1 ml の氷冷した 70%エタノールに懸濁し、氷上で 30 分間静置して固定した。その後、細胞を 2,500 rpm（500×g）、4℃で 2 分間遠心し、上清を除去し、0.2% gelatin を含む PBS で洗浄した後、50 μl の 100 μg/ml DNase-free RNase と 300 μl の 50 μg/ml ヨウ化プロピジウムを加えて核を染色した。染色後の細胞は BD Accuri C6 フローサイトメーター（BD Biosciences）を用いて測定した。

結果および考察

1. エンドサイトーシス阻害剤はラパマイシン非感受性の 4E-BP1 リン酸化サイトの脱リン酸化を誘導する。

mTORC1 はセリン・スレオニンキナーゼ複合体である。過去の研究において、mTORC1 阻害剤であるラパマイシンは mTORC1 によるリン酸化サイトの一部のみを脱リン酸化することが明らかにされている［6］。我々は以前の研究において、ダイナソアによるエンドサイトーシス阻害が、mTORC1 活性の抑制を引き起こすことを示した［2］。しかし、これはラパマイシン感受性の（比較的脱リン酸化されやすい）リン酸化サイトである S6K（Thr389）を用いた実験によるものであったため、ラパマイシン非感受性の（脱リン酸化されにくい）リン酸化サイトについてはエンドサイトーシス阻害の効果は不明であった。本研究において我々は、まずラパマイシン感受性サイトである S6K（Thr389）が 80 μM のダイナソアによって脱リン酸化されることを再確認した（図 1）。同様に、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン、mTORC1/2 阻害剤である Torin 1、アミノ酸飢餓によっても S6K（Thr389）の脱リン酸化が確認された（図

1)。

続いて、ラパマイシン非感受性の 4E-BP1（Thr37/46）リン酸化サイトについても調べた。過去の報告と一致するように［7］、4E-BP1（Thr37/46）は 50 nM および 250 nM Torin 1 やアミノ酸飢餓によって脱リン酸化されたが、ラパマイシン処理では脱リン酸化されなかった（図 1）。一方、80 μM ダイナソアによって 4E-BP1（Thr37/46）は脱リン酸化された。よって、ダイナソアによるエンドサイトーシス阻害は、Torin 1 やアミノ酸飢餓と同様に、比較的脱リン酸化されにくいラパマイシン非感受性リン酸化サイトをも脱リン酸化することが明らかとなった。

mTORC2 によってリン酸化される Akt（Ser473）は、Torin 1 によって脱リン酸化されたが、ダイナソア、アミノ酸飢餓、ラパマイシンいずれによっても脱リン酸化されないことが確認された（図 1）。

以上の結果より、ダイナソアおよびアミノ酸飢餓は、ラパマイシン非感受性リン酸化サイトである 4E-BP1（Thr37/46）の脱リン酸化を誘導することから、Torin 1 と同様に強力な mTORC1 抑制作用を持つが、mTORC2 活性には影響を与えずに mTORC1 特異的である点において Torin 1 とは異なることが示された。リソソーム内のアミノ酸は v-ATPase や SLC38A9 などの分子を介してリソソーム膜上の Rag GTPase を活性化し、Rag と mTORC1 の結合を開始させることで mTORC1 をリソソームにトラップし、リソソーム上の mTORC1 活性化因子である Rheb による mTORC1 活性化を促進する［1］。ダイナソアによるエンドサイトーシス阻害は、細胞外のアミノ酸がリソソーム内腔に輸送されるのを防ぎ、アミノ酸飢餓と同様の結果をもたらしたと推測される。

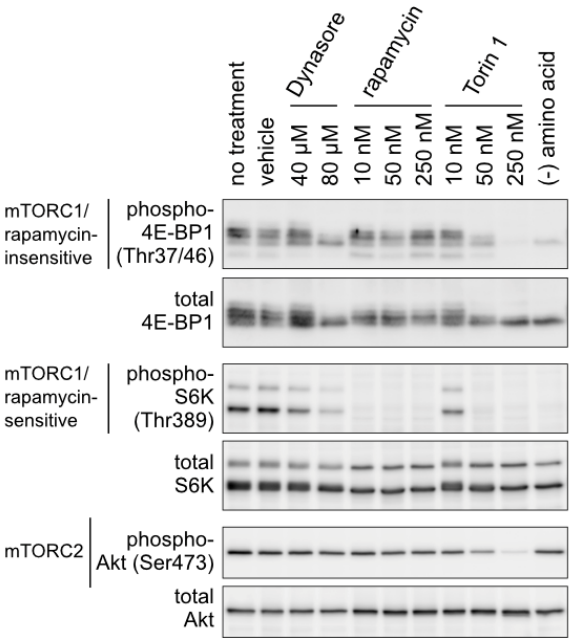


図 1. ダイナソアはラパマイシン非感受性のリン酸化サイト 4E-BP1（Thr37/46）を脱リン酸化する
293T 細胞を 0.1% DMSO （vehicle）、ダイナソア、ラパマイシン、Torin 1 で 24 時間処理した。または、10%の透析済み Nu-Serum を含むアミノ酸不含 RPMI1640 培地で 24 時間処理し、アミノ酸飢餓を行った。3 回の独立した実験の代表例を示す。

2. エンドサイトーシス阻害剤は細胞の増殖および代謝を抑制する。

以上の結果より、エンドサイトーシス阻害剤により mTORC1 活性が強力に抑制されることが明らかとなった。その結果、細胞機能にどのような影響があるのかを調べるため、我々はまず、エンドサイトーシス阻害が細胞増殖に及ぼす結果を検証した。過去の報告により、Torin 1 はラパマイシンよりも強く細胞増殖を抑制し、その細胞増殖抑制は mTORC2 に非依存的であることが示されている［7］。この報告と一致するように、24 時間の Torin 1 処理により、薬剤濃度依存的に細胞数が減少したが、ラパマイシンは細胞数にはほとんど影響しなかった（図 2A）。一方、ダイナソアによるエンドサイトーシス阻害およびアミノ酸飢餓は、細胞数を大きく減少させた（図 2A）。トリパンブルー染色により細胞の生存率を測定したところ、すべての処置群において明らかな細胞死は確認されなかった（図 2B）。したがって、

図 2A でみられた細胞数の減少は細胞死の誘導によるものではなく、細胞増殖の抑制によるものだと推測された。

続いて、細胞の代謝活性を測定する WST アッセイを行った。WST 試薬は細胞内の NADH や NADPH により還元されることで発色するため、細胞の代謝活性の指標として用いられる。図 2C に示すように、ダイナソアと Torin 1 は同様に濃度依存的に細胞代謝を抑制した。アミノ酸飢餓も細胞代謝を強く抑制した。一方、ラパマイシンは濃度非依存的に代謝を抑制した。

ラパマイシン非感受性のリン酸化サイトを有する 4E-BP1 は、細胞周期の制御因子の発現に関与することが示されている［7］。このことと一致するように、4E-BP1 の脱リン酸化を誘導したダイナソア、アミノ酸飢餓、および Torin 1 は強く細胞増殖および細胞代謝を抑制し、4E-BP1 脱リン酸化を誘導できないラパマイシンは細胞代謝のみ抑制し、増殖は抑制しなかった。

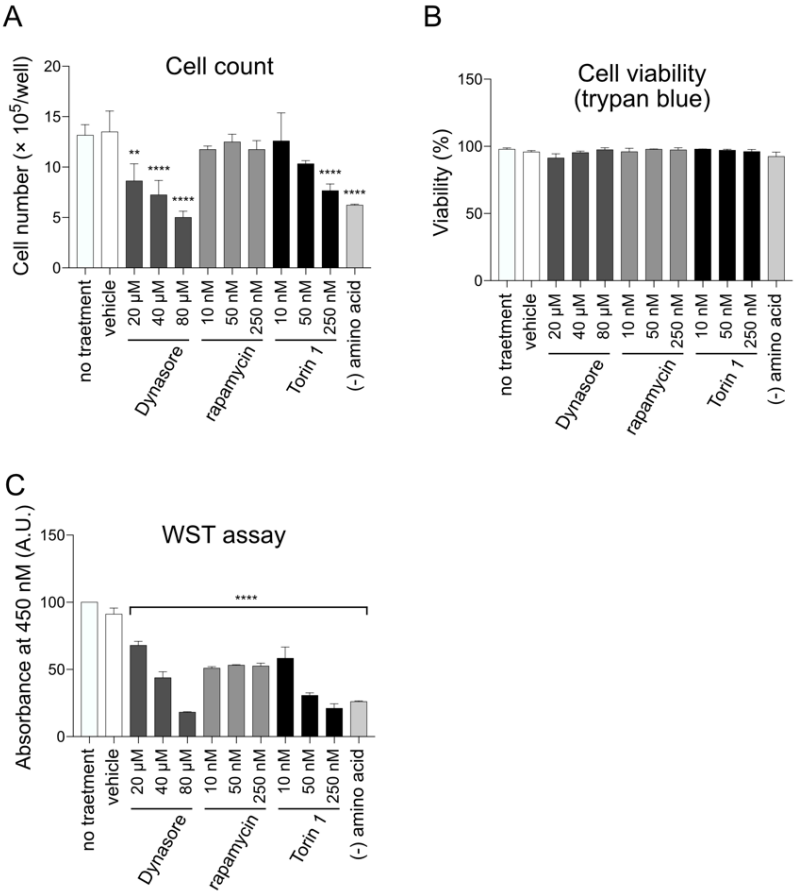


図 2. ダイナソアは細胞の代謝と増殖を抑制する

3 回の独立した実験の平均±標準偏差を示す。

A) 293T 細胞を 0.1% DMSO（vehicle）、ダイナソア、ラパマイシン、Torin 1、アミノ酸不含培地で 24 時間処理した後、トリパンブルーで染色されなかった生細胞数を測定した。コントロール群（vehicle）と比較して、**** : $p < 0.0001$。

B) 293T 細胞を（A）と同様に処理し、トリパンブルーで染色されなかった生細胞の、全細胞数における割合を生細胞率として算出した。

C) 293T 細胞を（A）と同様に処理し、細胞の代謝活性を WST アッセイにより測定した。コントロール群（vehicle）と比較して、** : $p < 0.01$、**** : $p < 0.0001$。

3. エンドサイトーシス阻害剤はアミノ酸飢餓と同様にS期における細胞周期停滞を誘導する

ダイナソア、アミノ酸飢餓、Torin 1が細胞増殖を抑制することが判明したため（図2A）、次に、フローサイトメトリーを用いて細胞周期をより詳細に調べた。その結果、24時間のアミノ酸飢餓を行った細胞においては、S期の細胞が増加し、G2/M期の細胞が減少していた（図3）。アミノ酸飢餓と同様に、ダイナソアで24時間処理した細胞においても、薬剤濃度依存的にS期の増加とG2/M期の減少が認められた（図3）。250 nMのTorin 1で処理した細胞においてもS期の増加が認められたが、10 nMおよび50 nMのTorin 1ではS期の増加は認められなかった。したがって、細胞数測定で細胞増殖抑制が認められたすべての条件（アミノ酸飢餓、20～80 μMダイナソア、250 nM Torin 1）（図2A）において、S期の増加が認められた（図3）。対照的に、ラパマイシンはS期の増加は認められなかった（図3）。

これらの結果より、ダイナソア、アミノ酸飢餓、Torin 1で認められた細胞増殖の抑制は、S期での停滞が原因である可能性が考えられた。mTORC1は細胞周期制御因子の発現の調節だけでなく、DNAの生合成を促進することが知られている［8］。強力なmTORC1抑制の結果、S期におけるDNA複製に必要なDNA分子が十分に供給されなくなり、S期での停滞が起こったのかも知れない。

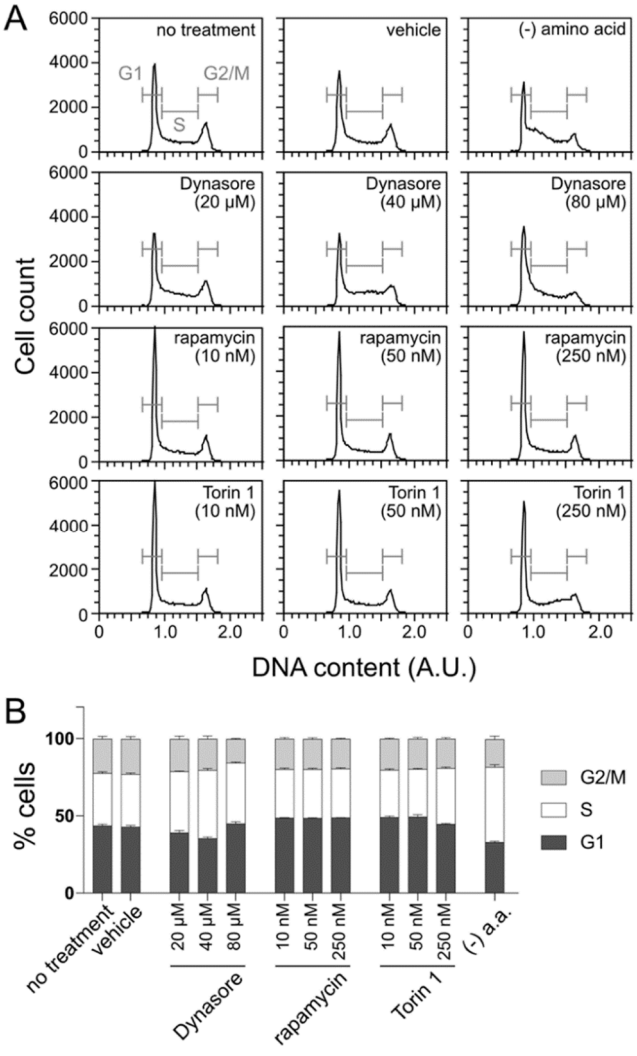


図3. ダイナソアはS期における細胞周期停滞を誘導する

293T細胞を0.1% DMSO（vehicle）、ダイナソア、ラパマイシン、Torin 1、アミノ酸不含培地で24時間処理した後、固定し、ヨウ化プロピジウムで核を染色した。

A) 染色した細胞をフローサイトメトリーで解析した。3回の独立した実験の代表例を示す。

B) 細胞周期プロファイルをG1、S、G2/M期に分けて定量した。3回の独立した実験の平均±標準偏差を示す。

4. まとめ

阻害剤を用いたダイナミン依存的エンドサイトーシスの阻害は、mTORC1 を強力に抑制することが明らかとなった。これは、アミノ酸のエンドサイトーシスを阻害することにより細胞にアミノ酸飢餓を引き起こした結果であると推測される［2］。さらに、エンドサイトーシス阻害剤、アミノ酸飢餓、Torin 1 など強力に mTORC1 を抑制する条件においては、細胞周期の S 期における停滞が引き起こされることが明らかとなった。

薬剤を用いた mTORC1 の抑制は、がんや老化の進行を抑制する手段として検討されている。しかし、mTORC1 自体をターゲットとした阻害剤は、mTORC1 阻害の結果としてオートファジーを誘導してしまう。誘導されたオートファジーはタンパク質を含む細胞質成分の分解による栄養素生成という代償性の反応を引き起こす［9］。さらに、mTORC1 の阻害はエンドサイトーシスを誘導することが知られており、その結果として代償性の細胞外の栄養素の取り込みを誘導してしまう［4］。エンドサイトーシス阻害剤はこれらの代償性のオートファジーおよびエンドサイトーシス誘導を伴わないため［2］、強力な栄養取り込み阻害剤として機能すると考えられる。また、哺乳類においては、血中のアミノ酸濃度は厳密に制御されており、空腹時においても安定している。このことから、人為的なアミノ酸摂取抑制によりアミノ酸飢餓状態を作り出すのは難しい。この点において、エンドサイトーシス阻害剤によるアミノ酸の取り込み抑制は、細胞レベルにおけるアミノ酸飢餓誘導剤として過栄養を原因とする疾病に対して有効な手段となり得るかも知れない。

共同研究者・謝辞

山口大学共同獣医学部獣医衛生学研究室の岩田祐之教授をはじめとし、研究に協力してくださった研究室のメンバーに御礼申し上げます。

文　献

1) Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017 Mar 9;168(6):960–76. PMID: 28283069 DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.004
2) Shibutani S, Okazaki H, Iwata H. Dynamin-dependent amino acid endocytosis activates mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). J Biol Chem. 2017 Nov 3;292(44):18052–61. PMID: 28808055 DOI: 10.1074/jbc.M117.776443
3) Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. J Clin Invest. 2013 Mar;123(3):980–9. PMID: 23454761 DOI: 10.1172/JCI64099
4) Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, Grabocka E, Nofal M, Drebin JA, Thompson CB, Rabinowitz JD, Metallo CM, Heiden MGV, Bar-Sagi D. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. Nature. 2013 May 30;497(7451):633–7. PMID: 23665962 DOI: 10.1038/nature12138
5) Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. Meth Enzymol. 2008;438:77–93. PMID: 18413242 DOI: 10.1016/S0076-6879(07)38006-3
6) Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, Gray NS, Turk BE, Yaffe MB, Sabatini DM. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. Science. 2013 Jul 26;341(6144):1236566. PMID: 23888043 DOI: 10.1126/science.1236566
7) Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. J Biol Chem. 2009 Mar 20;284(12):8023–32. PMID: 19150980 DOI: 10.1074/jbc.M900301200
8) Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. Curr Opin Cell Biol. 2017 Apr 12;45:72–82. PMID: 28411448 DOI: 10.1016/j.ceb.2017.02.012

9) Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell. 2011 Nov 11;147(4):728–41. PMID: 22078875 DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026