

論文内容の要旨

論文提出者氏名 青野 裕一

論文題目

Sulindac sulfone inhibits the mTORC1 pathway in colon cancer cells
by directly targeting voltage-dependent anion channel 1 and 2

スリンダクスルホン(以下 SSo)は、NSAIDs の一つであるスリンダク(販売名: クリノリル)のヒト体内における代謝体の一つである。しかしながら、NSAIDs の作用点であるシクロオキシゲナーゼ(COX)への阻害能を有していない。それにもかかわらず、大腸がんの前がん病変である大腸ポリープの形成を抑制することがヒト臨床試験の結果から明らかとなり、大腸がん予防効果を有することが示された。このことから、SSo の直接結合タンパク質を同定することは、NSAIDs の大腸がん予防に寄与する新たな標的分子候補および作用機序の発見に繋がると推察し検証を行った。

まず初めに、異なる遺伝子変異を持った 3 種類の大腸がん細胞(HT-29、DLD-1、SW480)に対して SSo を処理し、増殖と細胞周期への影響を WST-8 assay および FACS 解析により検証した。その結果、SSo は 3 種類の大腸がん細胞すべてに対して増殖抑制作用を示し、G1 期での細胞周期停止を誘導することが確認された。次に、SSo によって挙動変化を示す細胞内シグナルを western blotting を用いて探索した結果、G1-S 期の進行において重要な役割を果たすタンパク質である cyclin D1 の減少が見られた。さらに cyclin D1 のタンパク質の翻訳制御に関わる mTORC1 の基質である 4E-BP1 と p70S6K のリン酸化状態が减弱していたことから、mTORC1 経路の抑制も確認された。

以上の結果を踏まえ、SSo が示す増殖抑制作用を発揮する上で要となる責任分子の特定のため、当研究室が有するケミカルバイオロジーの技術を用いて以下の実験を行った。ナノ磁性ビーズを用いて SSo 固定化ビーズを作製し、大腸がん細胞の溶解液と混合することで SSo 結合タンパク質の精製を行った。この精製サンプルに対して MALDI-TOF MS を用いたプロテオミクス解析を行ったところ、7 つの SSo 結合タンパク質(Mitofilin、Tubulin β -chain、VDAC1、VDAC2、ANT2、NIPSNAP1、Derlin-1)の同定に成功した。それぞれのタンパク質に関する関連文献を調査した結果、ミトコンドリアの外膜タンパク質である VDAC の発現もしくは機能を阻害することで、mTORC1 経路が抑制されたという既報が確認されたことから、本研究では VDAC1 と VDAC2 に着目し、さらなる解析を続けた。

次に、焦点を当てた VDAC1 と VDAC2 が実際に SSo に直接結合しているのかを確認するため、それぞれの組み換えタンパク質と SSo 固定化ビーズを用いた結合反応実験を行った。その結果、SSo がどちらの VDAC に対しても、個別に直接結合していることが明らかとなった。以上より、SSo は細胞内において VDAC に直接作用し、その結果として、VDAC の発現もしくは機能が阻害され、mTORC1 経路の抑制に至っていると仮説をたてた。

この仮説を検証するため、大腸がん細胞 HT-29 における VDAC1 と VDAC2 の発現を RNAi 法によって抑制し、増殖・細胞周期・mTORC1 経路に対する影響を SSo 処理実験と同様の手法で検証した。その結果、VDAC1 と VDAC2 の発現を同時に抑制することで、HT-29 細胞の増殖抑制が認められた。同様の条件で解析を続けたところ、G1 期停止の誘導、cyclin D1 の減少、mTORC1 経路の抑制が確認された。SSo を処理した際の大腸がん細胞で起こる現象と VDAC1 と VDAC2 の両タンパク質を枯渇させた際の現象が一致した。一方、3 種類の大腸がん細胞において、SSo の処理によって VDAC1 と VDAC2 の発現量の増減は認められなかったことから、SSo が VDAC1 と VDAC2 のそれぞれに直接結合し、その機能を阻害することで大腸がん細胞内の mTORC1 経路を抑制し、下流の cyclin D1 の発現を低下させることで G1 期停止を誘導している可能性が考えられた。

最後に、SSo による VDAC の機能阻害を検証するため、ADP/ATP ratio assay を用いて検証した。VDAC1 および VDAC2 は、細胞質とミトコンドリアの間で ADP や ATP の流出入を担っているチャネルタンパク質である。そのため、VDAC の機能が阻害された場合、細胞質内の ATP 量が減少し ADP/ATP の比が上昇する。この現象が SSo 処理によって引き起こされるのか否かを検証した結果、SSo の処理後、短時間で細胞内 ATP 量が減少し、ADP/ATP 比が上昇することが確認された。よって、SSo は VDAC の機能を阻害している可能性が示唆された。

本研究の成果として、大腸がん予防効果が期待される SSo の新規分子標的候補となる、7 つの結合タンパク質を同定することに成功した。さらには、その内のミトコンドリアタンパク質である VDAC1 と VDAC2 が SSo と直接結合し、機能的に阻害されることで、SSo が大腸がん細胞に対して示す増殖抑制作用の一端を担っている可能性を示唆する結果が得られた。その他の 5 つのタンパク質についても SSo の作用を担っている可能性を秘めており、更なる解析が進むことで、新たな創薬シーズの創出に貢献し得ると考えられる。