

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-65772

(P2018-65772A)

(43) 公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/5415 (2006.01)	A 6 1 K 31/5415	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 2 0 6
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 31/166 (2006.01)	A 6 1 K 31/166	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-206578 (P2016-206578)
 (22) 出願日 平成28年10月21日 (2016.10.21)

(71) 出願人 304020177
 国立大学法人山口大学
 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
 (72) 発明者 渋谷 周作
 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1 国立大学
 法人山口大学共同獣医学部内
 (72) 発明者 岩田 祐之
 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1 国立大学
 法人山口大学共同獣医学部内
 F ターム (参考) 4C084 AA17 NA14 ZB082 ZB212 ZB262
 ZC412
 4C086 AA01 AA02 BC82 DA26 MA01
 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB08
 ZB21 ZB26 ZC41

最終頁に続く

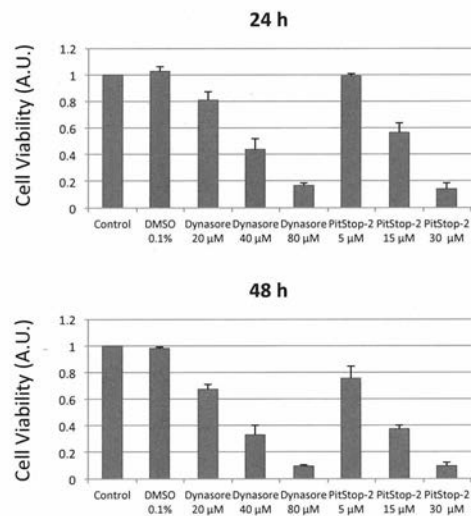
(54) 【発明の名称】 mTORC1 活性化抑制剤

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、mTORC1 活性化を抑制する剤や、mTORC1 活性化を抑制することによる細胞増殖抑制剤を提供することにある。

【解決手段】ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を有効成分とするmTORC1 活性化抑制剤を作製する。ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤が、ダイナソア、PitStop (登録商標) 2、又はクロルプロマジンであることが好ましい。

【選択図】図7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を有効成分とする m T O R C 1 活性化抑制剤。

【請求項 2】

ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤が、ダイナソア、P i t S t o p (登録商標) - 2、又はクロルプロマジンであることを特徴とする請求項 1 記載の m T O R C 1 活性化抑制剤。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の m T O R C 1 活性化抑制剤を含む細胞増殖抑制用組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を有効成分とする m T O R C 1 活性化抑制剤や、かかる m T O R C 1 活性化抑制剤を含む細胞増殖抑制用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

真核細胞は T O R (target of rapamycin: 哺乳類細胞では m T O R と呼ばれる) というタンパク質を持つ。T O R は酵母からヒトまで生物種を超えて広く保存されており、このことから、T O R が細胞の基本的機能に欠かすことの出来ない重要なタンパク質であることが示唆されている。事実、マウスで m T O R を欠損させると胚発生初期で発生停止に陥ることが知られている。

20

【0003】

m T O R は 2 つの異なる機能を持った複合体として存在し、それぞれ m T O R c o m p l e x 1 (m T O R C 1)、m T O R c o m p l e x 2 (m T O R C 2) と呼ばれる。m T O R C 1 と m T O R C 2 の違いは m T O R に結合する調節タンパク質の違いによる。m T O R C 2 の活性化メカニズムについては未だ不明な点が多いが、m T O R C 1 の活性化メカニズムは比較的良好に研究されている。

【0004】

m T O R C 1 は、細胞外液に含まれるアミノ酸等の栄養素及びインスリン等の成長因子が存在する時に細胞内で活性化されることが報告されている(非特許文献 1 参照)。活性化された m T O R C 1 は、様々なタンパク質をリン酸化することにより、細胞の生存や増殖を助けることが知られている。しかしながら、その活性化メカニズムが明らかになったのは最近のことである。最近の知見によると、m T O R C 1 の活性化は、リソソームと呼ばれる、膜小胞の形をした細胞内小器官で起こることが明らかとなった。リソソーム内腔と細胞質内にはアミノ酸センサータンパク質が存在し、それらのセンサータンパク質がアミノ酸を感知すると、m T O R C 1 をリソソーム膜上に移動させる。リソソーム膜上には R h e b と呼ばれる m T O R C 1 の活性化分子が局在するため、m T O R C 1 が活性化される、というメカニズムがこれまで明らかとなっている(非特許文献 2、3 参照)。しかし、アミノ酸は極性分子であり、それ自身は生体膜を通り抜けることが出来ない性質を持つため、細胞外液のアミノ酸がどのようにしてリソソーム内腔や細胞質内に効率よく到達できるのか、未だ明らかではない。こうしたなか、m T O R の活性に関与する L - グルタミン及び L - ロイシンの細胞内への取り込みに関しては、S L C 1 A 5 や S L C 7 A 5 / S L C 3 A 2 ヘテロダイマーがトランスポーターとして働くことが開示されている(非特許文献 4 参照)。

30

40

【0005】

m T O R 阻害剤としてはラパマイシン(R a p a m y c i n)が知られているが(非特許文献 5 参照)、ラパマイシンは F K B P 1 2 と呼ばれるタンパク質を介して m T O R 自体をターゲットとしており、長時間作用させると m T O R C 1 だけでなく m T O R C 2 に

50

も作用することが知られている。

【0006】

一方、細胞質と細胞外液の境目である細胞膜では、常時、エンドサイトーシスと呼ばれる現象が起こっている。エンドサイトーシスは、細胞膜の一部が細胞質側に陥没し、ついで、陥没した部分が細胞膜から切り離されることによって、小胞として細胞質側に落ち込むという現象である。このようにして出来た小胞は、内腔に細胞外液を含む。このような小胞はエンドソームと呼ばれる細胞内小器官とまず融合し、最終的にはリソソームと融合することが知られているため、エンドサイトーシスは細胞外液をリソソーム内腔に効率的に運ぶ手段として有力である。エンドサイトーシスとしては、いくつか知られているが、細胞外液に含まれるどの物質が上記のいずれのエンドサイトーシスによって細胞質内にとりこまれているかの詳細は明らかとなっていない。

10

【0007】

また、エンドサイトーシス阻害剤の用途として、腫瘍に対する免疫応答を増強させるための免疫療法剤（特許文献1参照）や、仮足形成阻害剤若しくは腫瘍の浸潤抑制剤（特許文献2参照）が開示されているが、エンドサイトーシス阻害剤とmTORC1の活性や、エンドサイトーシス阻害剤と細胞増殖との関係は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特表2015-536327号公報

20

【特許文献2】特開2009-57364号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Hara et al., 1998 J. Biol. Chem., 273:14484-14494

【非特許文献2】Sancak et al., 2008 Science, 320:1496-1501

【非特許文献3】Sancak et al., 2010 Cell, 141:290-303

【非特許文献4】Paul et al., 2009 Cell, 136:521-534

【非特許文献5】Sarbasov et al., Mol Cell. 2006 Apr 21;22(2):159-68

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0010】

本発明の課題は、mTORC1活性化を抑制する剤や、mTORC1活性化を抑制することによる細胞増殖抑制用組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

細胞はエンドサイトーシスにより細胞外液を常時取り込んでいるが、その中に含まれる栄養素がどのように細胞に影響を与えるのかは理解が進んでいない。本発明者らは、エンドサイトーシスによって細胞外液のアミノ酸がリソソーム内腔に効率的に運ばれ、このプロセスがmTORC1活性の維持に重要なのではないかと考え、研究を行った。その結果、ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害するとmTORC1の活性を抑制することや、ダイナミン依存性エンドサイトーシスにより取り込まれるアミノ酸がmTORC1の活性に関与することを見出し、さらに、ダイナミン依存性エンドサイトーシスによりmTORC1の活性を抑制することによって細胞増殖が抑制されることを見出し、本発明を完成した。

40

【0012】

すなわち、本発明は、以下に示すとおりのものである。

(1) ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を有効成分とするmTORC1活性化抑制剤。

(2) ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤が、ダイナソア、Pitstop（登録商標）-2又はクロルプロマジンであることを特徴とする上記(1)記載のmTORC

50

1 活性化抑制剤。

(3) 上記(1)又は(2)記載のmTORC1活性化抑制剤を含む細胞増殖抑制用組成物。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、mTORC1活性化を抑制することが可能となる。また、従来のmTOR阻害剤は、mTORC1及びmTORC2に共通のサブユニットであるmTORを標的にしていることから、mTORC1だけではなく、アポトーシス、グルコース代謝、NF-Bシグナル、脳神経系機能等に関与するAKTシグナルの上流に位置するmTORC2も阻害してしまうという問題があった。しかしながら、ダイナソア又はPitstop-2を有効成分とするmTORC1活性化抑制剤を用いれば、mTORC1を特異的に阻害することが可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】実施例1におけるウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である。

【図2】実施例2における免疫染色の結果を示す図である。

【図3】実施例3におけるウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である。

【図4】実施例4におけるウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である。

【図5】実施例5におけるウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である。

【図6】実施例6におけるウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である。

20

【図7】実施例7における細胞増殖抑制解析の結果を示す図である。

【図8】Dyasore又はPitstop-2がエンドサイトーシスによるアミノ酸取り込みを阻害し、mTORC1の上流を遮断することで、mTORC1活性を特異的に阻害することの説明図である。

【図9】エンドサイトーシスによる細胞内アミノ酸の取り込みとmTORC1活性化との関係についてまとめた図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を有効成分とするmTORC1活性化抑制剤であれば特に制限されず、ここで、ダイナミン依存性エンドサイトーシスとは、細胞膜の一部が細胞質側に陥没し、ついで、陥没した部分が細胞膜から切り離されることによって、小胞として細胞質側に落ち込むという現象を意味し、マクロピノサイトーシスは含まれない。かかるダイナミン依存性エンドサイトーシスによって、アミノ酸等を含む細胞外液がリソソーム内腔に運ばれる。

30

【0016】

ダイナミン依存性エンドサイトーシスとしては、カベオラ依存性エンドサイトーシス(Caveolar-mediated endocytosis)、クラスリン依存性エンドサイトーシス(Clatrin-mediated endocytosis)等のダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤を挙げることができ、クラスリン依存性エンドサイトーシスをより好適に挙げることができる。

40

【0017】

本発明におけるダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤としては、上記ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害する物質であれば特に制限されず、ダイノール(登録商標)34-2(Dynole 34-2: 2-Cyano-N-octyl-3-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]acrylamide)、ダイノール(登録商標)2-24(Dynole 2-24: N-[[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]methyl]decan-1-amine)、ダイナソア(Dyasore: 3-Hydroxynaphthalene-2-carboxylic acid(3,4-dihydroxybenzylidene)hydrazide)、ディンゴ(登録商標)4a(Dyngo 4a: 3-Hydroxy-N'-[(2,4,5-trihydroxyphenyl)methylidene]naphthalene-2-carbohydrazide)、Pitstop(登録商標)-1(2-(4-Aminobenzyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoli

50

ne-5-sulfonic acid sodium salt)、PitStop-1-25 (3-Sulfo-N-(benzyl)-1,8-naphthalimide potassium salt)、PitStop-2 (N-[5-(4-Bromobenzylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]naphthalene-1-sulfonamide)、フェノチアジン (phenothiazine)、プロマジン (Promazine)、クロルプロマジン (Chlorpromazine)、トリフルプロマジン (Trifluopromazine)、チオリダジン (Thioridazine)、トリフルオペラジン (Trifluoperazine)、ペルフェナジン (Perphenazine)、フルフェナジン (Fluphenazine)、プロクロルペラジン (Prochlorperazine)、メチル-シクロデキストリン (Methyl-cyclodextrin)、フィリピン (Filipin)、サイトカラシン (Cytochalasin)、又はラトランクリン (Latrunculin) を挙げることができ、ダイナソア (Dynasore)、PitStop-2 又はクロルプロマジンを好適に挙げることができ、ダイナソア (Dynasore) 又は PitStop-2 をより好適に挙げることができ、PitStop-2 をさらに好適に挙げることができる。

10

【0018】

上記エンドサイトーシス阻害剤は、市販品を用いることもでき、化学合成品を用いることもできる。なお、上記それぞれの PitStop は国際公開第 2013/010218 号パンフレットに記載の方法を参考に合成することが可能である。

【0019】

また、上記ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害する物質として、ダイナミンドミナントネガティブや、ダイナミンの発現を抑制する siRNA、アンチセンス RNA、miRNA、shRNA、リボザイム等を挙げることができる。ダイナミンドミナントネガティブとしては、ダイナミンを構成するアミノ酸の 1 つ、2 つ、又は 3 つ、好ましくは 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したものを挙げることができ、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 44 番目のリジンがアラニンに置換したものを好適に挙げることができる。なお、配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号 2 に示す。

20

【0020】

本発明の細胞増殖抑制用組成物としては、上記本発明の mTORC1 活性化抑制剤を含んでいればよく、さらに、抗がん剤や免疫賦活剤等を含んでいてもよい。

【0021】

本発明の mTORC1 活性化抑制剤及び細胞増殖抑制用組成物には、溶解剤、増量剤、賦形剤、担体等の薬学的に許容される添加剤と混合して注射剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤、貼付剤、軟膏剤、スプレー剤、溶液剤、徐放剤等の製剤とすることができる。溶解剤、増量剤、賦形剤又は担体等の薬学的に許容される添加剤の種類及び組成は投与経路や投与方法によって決めることができる。

30

【0022】

本発明の医薬の適当な投与経路としては特に限定されず、経口、直腸内、経粘膜、腸内、筋肉内、皮下、骨髄内、鞘内、直接心室内、静脈内、硝子体内、腹腔内、鼻腔内、又は眼内注射を含めてもよい。投与経路は、投与対象の年齢や病状、併用する他の薬剤などを考慮して適宜選択することができる。

40

【0023】

製剤中におけるエンドサイトーシス阻害剤の含量は製剤により種々異なるが通常 0.001 ~ 100 重量%、好ましくは 0.01 ~ 98 重量%である。例えば注射剤の場合には、通常 0.001 ~ 30 重量%、好ましくは 0.01 ~ 10 重量%の有効成分を含むようにすることがよい。経口剤の場合には、添加剤とともに錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル剤、錠剤、顆粒、散剤は一般に 0.1 ~ 100 重量%、好ましくは 1 ~ 98 重量%の有効成分を含む。投与量は、投与対象の年齢、体重、症状等により決定されるが、治療量は一般に、非経口投与で 0.001 ~ 10 mg/kg/日、経口投与で 0.01 ~ 100 mg/kg/日とすることができる。溶液で用いる場合は、1 nM ~ 1000 mM、好ましくは 1 nM ~ 1000 μM の濃

50

度で用いる。

【0024】

また、本発明のmTORC1活性化抑制剤及び細胞増殖抑制用組成物は、抗がん剤や免疫賦活剤等と併用して用いることもできる。

【0025】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、本発明の実施例においては、以下の抗体及び試薬を用いた。

【実施例1】

【0026】

(Dynasore及びPitstop-2によるmTORC1及びmTORC2の活性化抑制)

Dynasore及びPitstop-2を用いてmTORC1及びmTORC2の活性化抑制効果、ならびにmTORC1及びmTORC2の構成タンパク質であるmTOR、Raptor、Rictorの発現量を以下に示すウエスタンブロット解析により調べた。また、Dynasore及びPitstop-2の比較対象としてTorin 1及びアミノ酸不含培地を用いた。

【0027】

1. 細胞

293T(HEK293T)細胞(理研バイオリソースセンターより購入)は、10%ウシ胎児血清(Hyclone社製)及びストレプトマイシン/ペニシリン(和光純薬工業社製)を添加したDMEM培地(和光純薬工業社製)を用いて、5% CO₂濃度に保ったCO₂インキュベーターの中で維持した。

【0028】

2. ウエスタンブロットティング

293T細胞はコラーゲン(Cellmatrix type 1-C: 新田ゼラチン社製)でコートした12-wellプレート内に 2×10^5 cells/wellの細胞密度で播種した。培地は10% Nu-serum(Thermo Fisher Scientific社製)を含むRPMI 1640培地を用いた。ここで、ウシ胎児血清の代わりにNu-serumを用いた理由としては、Dynasoreを使用する際にNu-serumの使用が推奨されているからである(Kirchhausen et al., Methods Enzymol. 438:77-93. doi:10.1016/S0076-6879(07)38006-3.2008)。実際に、Dynasoreがウシ胎児血清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(McCluskey et al., Traffic Cph. Den. 14:1272-1289. doi:10.1111/tra.12119.2013)。播種した細胞をCO₂インキュベーター内で18-20時間培養した後、細胞の培地をDynasore、Pitstop-2(Abcam社製)、又はTorin 1(Tocris Bioscience社製)を含む10% Nu-serum(Thermo Fisher Scientific社製)添加RPMI 1640培地(和光純薬工業社製)、あるいは薬剤を含まないアミノ酸不含RPMI 1640培地に交換し、薬剤処理又はアミノ酸飢餓を開始した。薬剤処理又はアミノ酸飢餓を開始後、CO₂インキュベーター内で15分、1時間、4時間、又は24時間静置した。続いて、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を1回洗浄し、冷却したLysis buffer(20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、2.5mM Pyrophosphate、1mM -glycerophosphate、1mM Orthovanadate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail(cOmplete:Sigma-Aldrich社製))を加え、細胞を溶解した。細胞溶解液は14000rpm 4で10分間遠心し、可溶画分である上清をサンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むsample bufferと混合し、5分間煮沸した後、ウエスタンブロットティングによる解析時まで-20で保存した。ウエスタンブロットティングにおいては、サンプル中のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(

10

20

30

40

50

S D S - P A G E) により分子量ごとに分離後、P V D F 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 (2 % s k i m m i l k 及び 0 . 1 % T w e e n 2 0 を含んだトリス緩衝生理食塩水 (T B S)) を用いてブロッキングした後、目的のタンパク質に結合する 1 次抗体 (rabbit anti-phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (#9234)、rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) (#4060)、rabbit anti-Akt (#4691)、rabbit anti-Dynamin I/II (#2342)、rabbit anti-GAPDH (#5174P)、rabbit anti-mTOR (#2983)、rabbit anti-p70 S6 kinase (#2708)、rabbit anti-Raptor (#2280)、rabbit anti-Rictor (#2114) : Cell Signaling technology 社製)、及び h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e (H R P) 標識 2 次抗体 (goat anti-rabbit I g G (H+L)-HRP : Jackson Immunoresearch 社製) で処理し、発光基質 E z W e s t L u m i p l u s (Atto 社製) を加え、ケミルミネッセンスイメージャー (LAS3000 (Fujifilm 社製)) で検出した。なお、T o r i n 1 は m T O R C 1 及び m T O R C 2 の両方を阻害する薬剤である。

10

【 0 0 2 9 】

3 . 結果

ウエスタンブロットングの解析結果を図 1 に示す。D y n a s o r e と P i t S t o p - 2 はアミノ酸飢餓と同様に、m T O R C 1 活性を抑制するが、m T O R C 2 活性は抑制しておらず、D y n a s o r e と P i t S t o p - 2 は m T O R C 1 活性を特異的に抑制することが明らかとなった。T o r i n 1 等の従来の m T O R 阻害剤は、m T O R C 1 及び m T O R C 2 に共通のサブユニットである m T O R を標的にしていることから、m T O R C 1 だけではなく、アポトーシス、グルコース代謝、N F - κ B シグナル、脳神経系機能等に関与する A K T シグナルの上流に位置する m T O R C 2 も阻害してしまうという問題があった。上記のウエスタンブロットングの解析の結果、D y n a s o r e と P i t S t o p - 2 は m T O R C 1 活性を特異的に抑制することから、A K T シグナルに影響しないという点で従来の m T O R 阻害剤と比較して優れているといえる。また、m T O R C 1 及び m T O R C 2 の構成タンパク質である m T O R 、R a p t o r 、R i c t o r については、D y n a s o r e 及び P i t S t o p - 2 による発現量の顕著な変化は見られなかったことから、これらの発現量の減少が m T O R C 1 活性の減少の原因ではないことが明らかとなった。

20

【 0 0 3 0 】

なお、上記非特許文献 4 に記載のとおり、m T O R C 1 の活性に関与するアミノ酸の細胞内への取り込みはトランスポーターによって行われると考えられていたが、上記データにより、D y n a s o r e 又は P i t S t o p - 2 を用いれば、トランスポーターを制御することなく m T O R C 1 活性を抑制することが可能であることが明らかとなった。

30

【 実施例 2 】

【 0 0 3 1 】

(D y n a s o r e 処理による m T O R C 1 の局在の変化)

D y n a s o r e 処理により、m T O R C 1 の局在がどのようになるかを以下に示す免疫染色によって調べた。

【 0 0 3 2 】

40

1 . 免疫染色

コラーゲン (Cellmatrix Type I-C : HyClone 社製) でコートしたカバースリップの入った 6 - w e l l プレートを用意し、2 9 3 T 細胞を 3×10^5 c e l l s / w e l l で播種した。培地は 1 0 % N u - s e r u m を含む R P M I 1 6 4 0 培地を用いた。C O ₂ インキュベーター内で 1 8 - 2 0 時間培養後、細胞の培地を D y n a s o r e を含む 1 0 % N u - s e r u m 添加 R P M I 1 6 4 0 培地に交換し、薬剤処理を開始した。C O ₂ インキュベーター内で 1 時間の薬剤処理を行った後、細胞を P B S で 1 回洗浄し、4 % パラホルムアルデヒドを含む P B S を加え 2 0 分間室温で処理し、細胞を固定した。その後、0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0 を含む P B S に交換し 5 分間室温で処理することで膜透過処理を行い、0 . 0 2 % g e l a t i n を含む P B S に交換し 3 0 分間以

50

上室温で処理することでブロッキングを行った。免疫染色を目的タンパク質に対応する1次抗体 (mouse anti-Lamp1 (sc-20011): Santa Cruz Biotechnology社製、rabbit anti-mTOR (#2983): Cell Signaling technology社製)、及び蛍光標識2次抗体 (Goat anti-rabbit IgG (H+L)-Alexa、goat anti-mouse IgG (H+L)-Alexa 568 (Thermo Fisher Scientific社製)) を用いて行い、封入剤 (Prolong Gold with DAPI (Thermo Fisher Scientific社製)) を用いてスライドガラス上に封入後、共焦点蛍光レーザー顕微鏡LSM 710 (Zeiss社製) を用いて画像を取得した。

【0033】

2. 結果

免疫染色の結果を図2に示す。Dynasore処置なしの場合には、mTORC1はリソソーム (Lamp1) と共局在するのに対し、Dynasore (80 μ M) で1時間処理した細胞では、リソソーム (図中の矢印) と共局在しなくなった。したがって、Dynasoreは、mTORC1のリソソームへの局在化を阻害し、その結果mTORC1の活性化が抑制されることが明らかとなった。

【実施例3】

【0034】

(DynasoreのmTORC1の活性化抑制に対するシクロヘキシミドの影響)

Dynasore処理によるmTORC1活性阻害は、細胞内アミノ酸の枯渇が原因か否かを確認するため、Dynasore処理の際にシクロヘキシミド (CHX) を用いて実施例1と同様にmTORC1の活性化抑制を調べた。なお、シクロヘキシミド (CHX) はタンパク質合成阻害剤であり、シクロヘキシミドで処理すると、細胞内のアミノ酸がタンパク質合成に使われるのを阻害され、細胞内アミノ酸濃度が上昇し、その結果mTORC1活性が上昇することが知られている。

【0035】

1. ウェスタンブロッティング

Dynasore 80 μ Mと共にシクロヘキシミド 10 μ g/ml (和光純薬工業社製) を加えた以外は実施例1と同様の方法で行った。

【0036】

2. 結果

ウェスタンブロッティングの結果を図3に示す。シクロヘキシミド処理により、Dynasore処理で認められるリン酸化S6Kの減少が打ち消された。このことから、Dynasore処理によるmTORC1活性阻害は、細胞内アミノ酸の枯渇が原因であることが示唆された。

【実施例4】

【0037】

(ChlorpromazineによるmTORC1の活性化抑制)

Chlorpromazineを用いてmTORC1の活性化抑制効果を以下に示すウェスタンブロット解析により調べた。なお、Chlorpromazineはダイナミンを阻害することが知られている (Daniel et al., Traffic 16: 635-654. doi:10.1111/tra.12272.2015)。

1. ウェスタンブロッティング

293T細胞の代わりにRaw264細胞 (マウスマクロファージ様細胞) を用い、コーゲンコートを行わない12-wellプレートに 3×10^5 cells/wellの細胞密度で播種し、培地は10% ウシ胎児血清 (Hyclone社製) を含むDMEM培地 (和光純薬工業社製) を用いた以外は実施例1と同様に行った。薬剤はChlorpromazine (和光純薬工業社製) を用いた。

【0038】

2. 結果

ウェスタンブロッティングの結果を図4に示す。Dynasore、PitStop-2と同様に、Chlorpromazineが顕著にmTORC1活性を阻害することが

明らかとなった。

【実施例 5】

【0039】

(様々な細胞株での mTORC1 の活性化抑制)

実施例 1 では 293T 細胞を用いたが、さらに他の細胞での mTORC1 の活性化抑制効果を調べた。

1. ウェスタンブロッティング

293T 細胞の代わりに Raji 細胞 (ヒト B 細胞パーキットリンパ腫)、Jurkat (ヒト急性 T 細胞白血病)、K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病)、U937 細胞 (ヒト組織球性リンパ腫) を用いた以外は実施例 1 と同様に行った。

10

2. 結果

ウェスタンブロッティングの結果を図 5 に示す。293T 細胞だけでなく、Raji 細胞、Jurkat、K562 細胞、U937 細胞等の様々な血球系がん細胞株においても、Dynasore が顕著に mTORC1 活性を阻害することが明らかとなった。

【実施例 6】

【0040】

(ダイナミドミナントネガティブ (Dynamidin-DN) による mTORC1 の活性化抑制)

1. Dynamidin-2 K44A 発現細胞の作製

293T 細胞に Dynamidin-2 のドミナントネガティブ型 (K44A) を一過性に遺伝子導入し、24 時間後に細胞サンプルを回収した。具体的には、Dr. Sandra Schmid からの分与を受けた pcDNA3.1/HA-Dynamidin-2 K44A 又は pcDNA3.1(-) (Thermo Fisher Scientific 社製) を、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて 293T 細胞にトランスフェクションした。導入した、HA-Dynamidin-2 K44A をコードする塩基配列を配列番号 1 に示す。次に、CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置し、実施例 1 と同様の方法で細胞サンプルを回収し、ウェスタンブロッティング解析を行った。

20

【0041】

(結果)

結果を図 6 に示す。Dynasore の標的分子であるダイナミンをドミナントネガティブ型ダイナミンの過剰発現で阻害したところ、Dynasore を用いた場合と同様に mTORC1 活性化抑制が起こった。したがって、ドミナントネガティブ型ダイナミンを用いても mTORC1 活性化を抑制することや、Dynasore による mTORC1 阻害が、薬剤の副作用ではなく、Dynamidin 阻害を通じたものであることが示された。

30

【実施例 7】

【0042】

(細胞増殖抑制)

mTORC1 は細胞増殖において主要な役割を担う分子であることから、エンドサイトーシス阻害剤は mTORC1 特異的抑制を通して細胞増殖抑制剤として機能すると考えられる。そこで Dynasore 及び Pitstop-2 で処理した場合に細胞増殖を抑制するかどうかを、以下に示す生細胞数アッセイによって調べた。

40

【0043】

Cell counting kit-8 (同仁化学社製) を用いて、製品説明書に従い生細胞数を測定した。まず、293T 細胞を 96-well プレートに 5×10^3 cells/well の密度で播種した。培地は 10% Nu-serum を含む RPMI 1640 培地を使用した。CO₂ インキュベーター内で 18-20 時間培養後、細胞の培地を Dynasore 又は Pitstop-2 含む 10% - serum 添加 RPMI 1640 培地に交換し、薬剤処理を開始した。各薬剤処理は 2 well ずつ行った (duplicate アッセイ)。24 時間若しくは 48 時間 CO₂ インキュベーター内で薬剤処理した後、10 μ l の Cell counting kit-8 試薬を各ウェルに加え、CO

50

2 インキュベーター内で2時間静置して発色させたあと、450nm波長の吸光度をiMark plate reader (Bio-Rad) で測定した。コントロールとして、細胞を含まずに培地と試薬のみを含むウェルを作製し、それぞれのサンプル測定値からコントロール測定値を引いた値を生細胞数の指標とした。

【0044】

結果を図7に示す。Dynasore又はPitstop-2のいずれも濃度依存的に細胞増殖を抑制することが確認された。

【0045】

[上記結果のまとめ]

本発明によって、図8に示すように、Dynasore又はPitstop-2がダイナミン依存性エンドサイトーシスによるアミノ酸取り込みを阻害し、mTORC1の上流を遮断することで、mTORC1活性を特異的に(mTORC2活性に影響を与えずに)阻害し、細胞増殖を抑制するというメカニズムが明らかとなった。また、クロルプロマジンもダイナミン依存性エンドサイトーシスによるアミノ酸取り込みを阻害し、mTORC1活性を阻害することが明らかとなった。Dynasore、Pitstop-2、又はクロルプロマジンは細胞増殖に必要なシグナル分子であるmTORC1を、その上流である「細胞内への栄養取り込み」という根本のプロセスから阻害するため、強力な細胞増殖抑制剤として働き、特に、がん細胞のように栄養要求性の高い細胞種に選択的に作用する可能性がある。

【0046】

ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤がmTORC1を阻害するメカニズムとして、本発明者らは、ダイナミン依存性エンドサイトーシスによるアミノ酸取り込みが阻害されたためだという仮説を立てた。その仮説を支持するように、アミノ酸存在下で起こることが知られているmTORのリソソーム局在が、Dynasore及びPitstop-2処理により解消された。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで細胞を処理すると、Dynasore及びPitstop-2によるmTORC1活性の減少が打ち消された。これらの結果から、Dynasore及びPitstop-2のmTORC1抑制効果は、細胞内アミノ酸の枯渇によるものだと示唆された。

【0047】

また、これまでの知見及び本発明による結果に基づき、ダイナミン依存性エンドサイトーシスによる細胞内アミノ酸の取り込みとmTORC1活性化との関係についてまとめると以下のように考えられる。ダイナミン依存性エンドサイトーシスによる細胞内アミノ酸の取り込みとmTORC1活性化との関係の概念図を図9に示す。まず、ダイナミン依存性エンドサイトーシスにより細胞外のアミノ酸が効率よくリソソーム内に運ばれる。リソソーム膜上のV-ATPaseはその内腔部分にアミノ酸センサーを持つことが報告されており(Zoncu et al. 2011, Science, 334, 678-683)、リソソーム内のアミノ酸濃度が上昇すると、V-ATPaseがRagulatorと呼ばれる複合体を活性型に変換し、ついで活性型RagulatorはmTORC1をリソソーム上に繋ぎ止める。リソソーム上にはmTORC1活性化分子であるRhebが存在するため、mTORC1はリソソーム上において活性化される。なお、成長因子はAKTと呼ばれるタンパク質(図中では省略)の活性化を介して、Rhebを活性化させる。ただし、成長因子の存在下でRhebが活性化していたとしても、アミノ酸が無い状態ではmTORC1は活性化されないため、アミノ酸はmTORC1活性化の必要条件であると言える。換言すれば、Dynasore、Pitstop-2又はクロルプロマジン等のエンドサイトーシス阻害剤によってアミノ酸の取り込みを抑制することでmTORC1活性化が抑制される。

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明は、細胞増殖抑制剤や、mTORC1を標的とした抗がん剤、免疫抑制剤として産業上利用可能である。

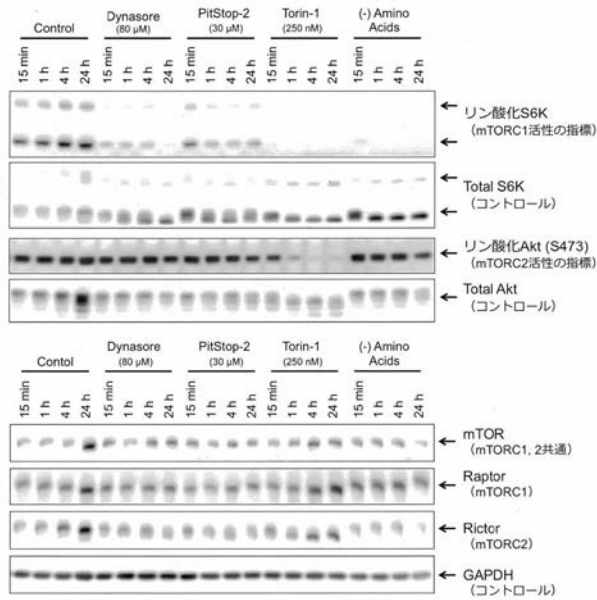
10

20

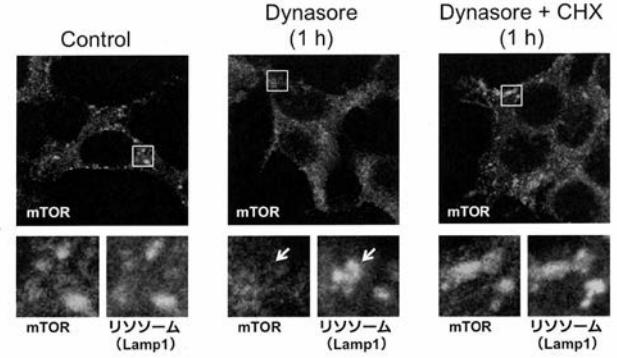
30

40

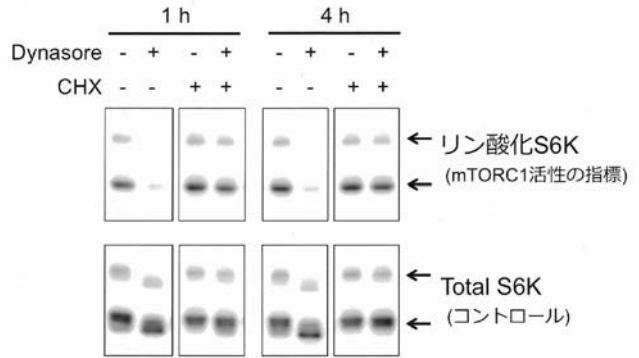
【 図 1 】



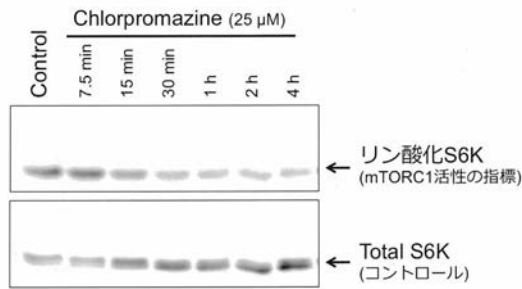
【 図 2 】



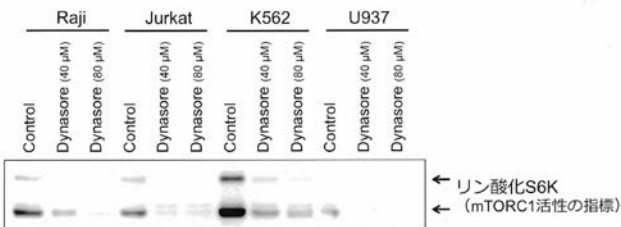
【 図 3 】



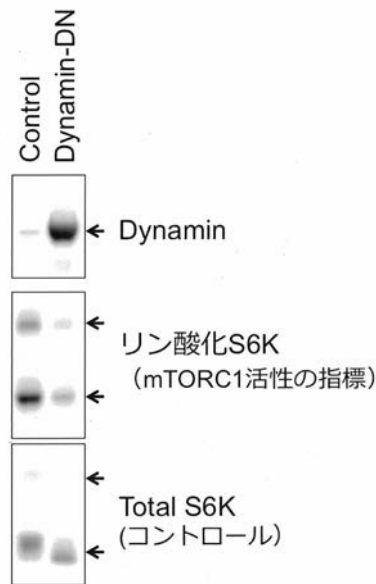
【 図 4 】



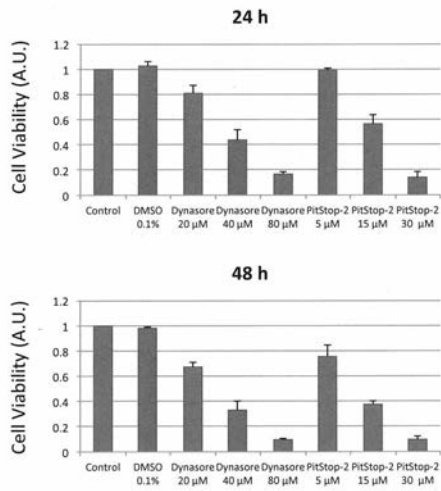
【 図 5 】



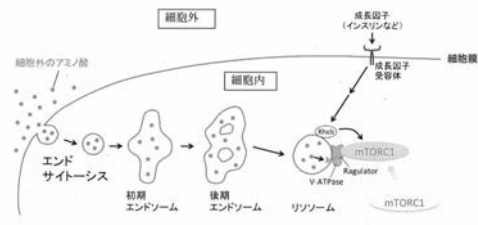
【 図 6 】



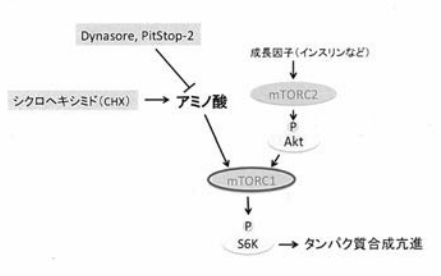
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2018065772000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 K 31/426	(2006.01)	A 6 1 K	31/426		
		A 6 1 P	43/00	1 1 1	

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 HA08 KA04 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB08
ZB21 ZB26 ZC41