

学 位 論 文 題 名

膵癌細胞における
AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割

学位論文内容の要旨

【背景】腫瘍が生体内で増殖しその腫瘍径が大きくなると、腫瘍への血液供給が腫瘍の需要に追いつかなくなる。結果として腫瘍の一部は低酸素・低栄養環境に曝される。Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)を介した癌細胞の低酸素適応応答に関しては多くの研究がなされており、低酸素環境が腫瘍の増殖、進展、悪性化と深く関わっていることが明らかとなった。一方、低酸素適応応答のみならず低栄養適応応答も生体内の腫瘍においては必須であると考えられるが、癌細胞の低栄養適応応答に関する検討は少ない。また、現在までに HIF-1 により制御される遺伝子は 50 種類以上報告されているが、低酸素・低栄養環境にある生体内の腫瘍においてこれらの全ての遺伝子が重要であるかは明らかにされていない。

【方法と結果】膵癌細胞 3 株 (MiaPaCa2, BxPC3, PCI43) を正常酸素・正常グルコース、正常酸素・低グルコース、低酸素・正常グルコース、低酸素・低グルコースの 4 条件の下で培養し遺伝子発現の変化を real-time PCR を用いて詳細に検討すると、低酸素・低グルコースで発現亢進するものはアドレノメジュリン, VEGF, Glut1, Glut3, hexokinase2 の 5 遺伝子のみであった。これらの遺伝子の発現はグルコース濃度下げることで濃度依存的に発現が亢進した。また、低酸素による遺伝子誘導は培養開始 6 時間後に既に認められたのに対し、低グルコースに対する反応は培養開始 12 時間以降に認められた。低グルコースが HIF-1 の蛋白量に与える影響をウェスタンブロットにより確認したが、低酸素・低グルコース下では HIF-1 の蛋白量はむしろ減少していた。また、HIF-1 の転写活性を hypoxia-response element を含むレポーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイにより検討したが、低グルコースにすることで HIF-1 の転写活性は低下した。それゆえ、低グルコースに対する膵癌細胞の反応には HIF-1 以外の因子が関与しているものと考えられ、本研究では AMP-activated protein kinase (AMPK)に着目した。AMPK の阻害剤である Compound C で膵癌細胞を処理すると膵癌細胞の低酸素・低グルコースに対する反応が有意に抑制された。AMPK の catalytic subunit である AMPK α に対する siRNA を作製し阻害実験を行ったが、Compound C を用いた実験と同様に膵癌細胞の低酸素・低グルコースに対する遺伝子誘導が有意に抑制された。VEGF のプロモーター領域をクローニングし VEGF の転写状態をルシフェラーゼアッセイにより検討すると、低酸素・低グルコース下でのルシフェラーゼ活性が最大であり、低酸素・低グルコースによる膵癌細胞の遺伝子誘導には AMPK を介した何らかの転写レベルでの関与が示唆された。生体内の腫瘍においても

AMPK が実際に活性化されているかを SCID マウスの皮下に腫瘍細胞株 (MiaPaCa2) を移植し、リン酸化 AMPK α の免疫染色により確認した。低酸素領域のマーカーであるピモニダゾールも同時に使用したが、ピモニダゾールは壊死組織周囲や血管から離れた場所において強く発現しており腫瘍への血液供給の少ない領域を正確に反映していた。リン酸化 AMPK α も低酸素・低栄養環境にあると考えられるピモニダゾール発現領域にほぼ一致して強く発現していた。

【考察】生体内の腫瘍環境は低酸素のみならず低栄養環境にもあり、低酸素・低栄養環境下で発現亢進してくる遺伝子が腫瘍の生存、増殖にとって重要な遺伝子であると考えられる。今回の研究では一部の低酸素誘導遺伝子のみが低酸素・低グルコース環境で発現亢進することを初めて見出した。こうした低酸素・低グルコース環境下で発現亢進してくる遺伝子産物は腫瘍の生存、増殖にとってより重要で必須な働きをしていると考えられる。今回の検討では既知の低酸素誘導遺伝子の中で低酸素・低グルコースにより発現亢進するのはアドレノメジュリン、VEGF、Glut1、Glut3、hexokinase2 の 5 遺伝子であった。血管新生因子 (VEGF、アドレノメジュリン)、糖輸送体 (Glut1、Glut3)、解糖系酵素 (hexokinase 2) であるこれらの遺伝子が低酸素・低グルコースにより亢進することは低酸素・低栄養環境下にある癌細胞にとって非常に合理的である。

低酸素・低グルコース環境が遺伝子発現を亢進させるメカニズムは現時点では明らかとなっていない。今回の検討で示したように低酸素・低グルコースによる遺伝子誘導は HIF-1 を介さない経路によっても制御されている可能性が高く、本研究ではその制御因子の候補として AMPK に着目した。AMPK は AMP/ATP 比により活性化される酵素であり、細胞内のエネルギーセンサーとして働いている。今回の検討では AMPK は低酸素・低グルコース下でその活性が最大であり、阻害剤や siRNA を用いて AMPK の活性を阻害することで低酸素・低グルコース下における遺伝子誘導が抑制された。これらの結果は AMPK を介した経路が癌細胞の低酸素・低グルコースによる遺伝子誘導機構において HIF-1 経路と同様に重要な役割を担っている可能性を示している。また、AMPK を阻害することで VEGF のみならず低酸素・低グルコース誘導遺伝子であるアドレノメジュリン、Glut1、Glut3、hexokinase 2 の低酸素・低グルコースによる遺伝子発現亢進も阻害された。本研究は AMPK を含む経路を介した低酸素・低グルコース適応応答には多くの重要な遺伝子が含まれていることを示唆している。一方で AMPK の下流には何らかの転写に関わる因子の存在が推測されるが、その同定には至っていない。AMPK を介した低酸素・低グルコース適応応答機構に関しては今後更なる検討が必要であると考えられる。

本研究では *in vitro* の実験に加えて、実際の生体内の腫瘍においても AMPK が活性化されていることを動物実験により確認した。また、AMPK が欠失した腫瘍細胞を用いて AMPK が生体内の腫瘍増殖に必要であることも報告されている。これらは生体内の腫瘍においても AMPK が重要な役割を担っていることを示唆しており、癌治療の標的としての AMPK の可能性も考えられる。しかし、逆に腫瘍抑制因子である LKB1 が AMPK を活性化することや、同じく腫瘍抑制因子である TSC2 が AMPK により活性化されることが報告されており、AMPK を癌治療の標的とするには更なる検討が必要と思われる。

【結語】今回の検討により AMPK が低酸素・低栄養誘導遺伝子の制御因子である可能性が示唆された。低酸素・低栄養誘導遺伝子の制御機構は癌治療の標的となる可能性もあり、今後更なるメカニズムの解析が待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

膵癌細胞における

AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割

本研究では生体内の腫瘍が低酸素・低栄養環境にあることに着目し、低酸素・低栄養環境が癌細胞に与える影響に関して主に膵癌細胞株を用いて検討した。癌細胞株を低酸素・低グルコース環境下で培養すると Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) により制御される遺伝子(低酸素誘導遺伝子)の一部のみが更に発現亢進し、これらの遺伝子が生体内の腫瘍において重要である可能性が示唆された。低酸素による遺伝子誘導と低グルコースによる遺伝子誘導は経時的変化が異なり、また、低グルコース環境下では HIF-1 の蛋白発現量及び転写活性がむしろ低下することから低酸素・低グルコースによる遺伝子誘導は HIF-1 以外の因子も関与していると考えられた。本研究では AMP-activated protein kinase (AMPK) を含む経路が癌細胞の低酸素・低グルコースによる遺伝子発現を制御していることを見出した。AMPK を阻害剤や siRNA により阻害すると癌細胞の低酸素・低グルコースによる遺伝子誘導が有意に抑制された。更に生体内の腫瘍においても AMPK が活性化されていることが免疫染色により確認され、低酸素・低栄養適応応答が生体内の腫瘍においても重要であることが示唆された。

口頭発表に際し、副査の畠山教授より低酸素・低グルコースにより誘導される遺伝子で膵癌に特異的な遺伝子はあったか、AMPK のリン酸化酵素は同定されているかに関して質問があった。これに対し申請者は今回の検討では膵癌に特異的な遺伝子は無かったが低グルコースに対する遺伝子発現亢進は膵癌細胞株で著しかったこと、また、AMPK のリン酸化酵素として LKB1 が近年報告されたが、LKB1 は腫瘍抑制因子であり LKB1 のみでは低酸素・低栄養適応応答は説明がつかず今後の検討課題であると回答した。次いで副査の守内教授より生体内の腫瘍ではアミノ酸も低下しているがアミノ酸の低下も AMPK の活性に影響を与えるか、AMPK α 1 と α 2 の機能の違いに関して質問があった。これに対して申請者はアミノ酸の低下が AMPK を活性化することは既に報告されているが、生体内の腫瘍で血液供給が低下するとアミノ酸よりもまずグルコ

ースが低下すること、また、低酸素環境では嫌気性代謝が主となりグルコースの重要性が高くなることから本研究では低グルコース環境を用いたこと、AMPK α 1 と α 2 の違いに関しては細胞内の局在が異なる点、酵素活性の違い等が既に報告されているが低酸素・低栄養適応応答における AMPK α 1 と α 2 の機能の違いに関しては今後の検討課題であると回答した。守内教授からは AMPK が DNA microarray では同定できなかったことに関して網羅的な遺伝子解析の限界であろうと御意見も頂いた。主査の浅香教授から生体内の腫瘍において低栄養環境が低酸素環境と同程度に重要であるのか、AMPK を標的とした治療が臨床応用できる可能性も含めて今後の肺癌治療の展望に関する質問があった。これに対し申請者は生体内の腫瘍で血液供給が低下すると低酸素環境のみならず必然的に低栄養環境にもなり、グルコース濃度に関しては実際の生体内の腫瘍で低下していることが報告されていること、しかし HIF-1 を中心とした低酸素適応応答に比べると低栄養適応応答に関しては未知な点が多くその重要性に関しては今後更なる解析が必要であると回答した。AMPK を癌治療の標的にできるかに関しては AMPK が腫瘍増殖に必須であるとの報告がある一方で AMPK の活性化剤である AICAR に抗腫瘍効果があるとの報告もあり、癌細胞における AMPK の機能に関しては現時点では controversial である点、また、AMPK はユビキタスな酵素で正常細胞においても細胞のエネルギーセンサーとして重要な役割を担っていることから副作用の面で AMPK を直接の標的とすることは困難であろうと回答した。また、低酸素・低栄養による遺伝子発現亢進は正常細胞株である 293 細胞では認められず、低酸素・低栄養適応応答が癌細胞に特異的で癌治療の標的となる可能性はあるが、癌細胞にはその他の多くのストレス経路も関与しており単一の経路を標的とした治療には限界もあるであろうと回答した。

本研究は生体内の腫瘍において低酸素適応応答と同様に低栄養適応応答が重要であり、HIF-1 経路とともに AMPK を含む経路が低酸素・低栄養適応応答を制御していることを明らかとした。本研究を足掛かりとして癌細胞の低酸素・低栄養適応応答の解析が進み癌治療へ応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。