

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870600

研究課題名(和文) がん微小環境ストレス応答における悪性形質獲得機序の解明

研究課題名(英文) Acquisition mechanisms of malignant phenotypes on cancer cells under the microenvironmental stress.

研究代表者

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10550551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は低酸素、低栄養という微小環境に適応し生存している。過酷な微小環境は、更なる悪性形質獲得に貢献していると考えられている。本研究において、エネルギー恒常性に関わるLKB1/AMPKは、グルコース飢餓により活性化することが明らかとなった。活性化したLKB1/AMPKは、オートファジーを駆動しNrf2を誘導することや、ストレス制御に関与する事を明らかにした。さらに、グルコース濃度の低下に依存し遊走能や浸潤能は亢進し、その形質はLKB1、AMPKのノックダウンにより抑制した。すなわち、低栄養環境により活性化したLKB1/AMPKは環境適応と同時にがんの進展に関わる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant tumors are exposed to microenvironments that are characterized by low levels of nutrients because the tumors tend to outgrow the existing vasculature. Therefore, cancer cells must adapt and escape these severe microenvironments to favorable growth conditions. In the current study, we found that LKB1/AMPK signaling pathway, a master regulator of metabolic homeostasis, is activated by glucose deprivation. Activation of LKB1/AMPK induces a transcription factor Nrf2 in the nucleus, and LKB1/AMPK-mediated Nrf2 expression is involved in the regulation of oxidative stress under glucose starved conditions. We also observed that cancer cell migration and invasion ability were enhanced due to the reduction in glucose concentration in culture medium and was completely diminished by knockdown of LKB1 or AMPK. These results suggested that the activation of LKB1/AMPK is not only contributed to adaptation to severe microenvironment but also promotes cancer progression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 低栄養 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性新生物は死因の第一位であり、死亡率や罹患率の減少と最終的ながん克服を目標とするためには、より一層の努力と対策が急務である。これまでの基礎研究の集積によりがん本態の解明は進んだ一方で、その複雑さゆえがん克服の困難さを改めて浮き彫りにした。驚くべきことに、がん細胞は遺伝子変異や複雑なシグナル伝達異常が認められるものの、「解糖系経路の亢進」は、がん細胞特有かつ共通の代謝機構(Warburg 効果)である。つまり、がん細胞特異的な代謝機構を調節する分子が、有効な治療標的となる可能性を秘めている。

(2) がん組織は過剰な細胞増殖と解糖系の亢進により、慢性的に低栄養状態になっており、主たる栄養源であるグルコース濃度の低下した過酷な環境下で生存している。さらに、過酷な微小環境は更なる悪性形質獲得に貢献していることが考えられている。本研究で取り上げる AMPK (AMP-activated protein kinase)は、細胞内が低栄養などによりエネルギー欠乏状態に陥ると、AMP:ATP 比でエネルギーバランス変化を感知し、LKB1 によるリン酸化を受け活性型となり細胞の恒常性を維持している。AMPK は酸化ストレス制御においても重要な役割を果たしているが、AMPK がどのようなメカニズムを介して酸化ストレスを軽減させているのか、栄養飢餓が惹起する酸化ストレスの抑制に関与しているのかは不明である。一方で、Nrf2 は、酸化ストレスに応じて活性化し、抗酸化や解毒酵素をはじめとする生体防御系遺伝子群の発現を調節するマスターレギュレーターとして知られている。すなわち、がん細胞が低栄養状態にあるとき AMPK がエネルギー欠乏とそれに伴う酸化ストレスを感知し、LKB1/AMPK-Nrf2 経路が応答することで、がん細胞の生存を支えている可能性が示唆される。しかしながら、低栄養下で LKB1/AMPK が Nrf2 を制御するメ

カニズムは報告がない。近年、Keap1, Nrf2 の変異による Nrf2 の恒常的活性化が核酸の新規合成経路であるペントースリン酸経路の主要酵素やグルタミン代謝に関与する酵素を直接制御し、Nrf2 が細胞増殖能を活性化させることが明らかとなった (Mitsuishi et al. 2012, Cancer Cell)。しかしながら、多くのがん組織において Keap1, Nrf2 の変異は伴っていないことから、がん細胞の進展にそれらの体細胞変異は必須ではなく、低栄養というがん微小環境こそが Nrf2 の活性化要因であることが強く示唆される。

(3) がん細胞は、早い増殖能を維持するため代謝要求性が極めて高い。高度な代謝要求性を満たすため、がん細胞は細胞質構成成分を分解し活用する機構であるオートファジーにより、生存を支えている。LKB1/AMPK はオートファジーの制御分子であるが、LKB1/AMPK 依存的なオートファジーと Nrf2 の活性化機構の関連は全く分かっていない(図 1)。

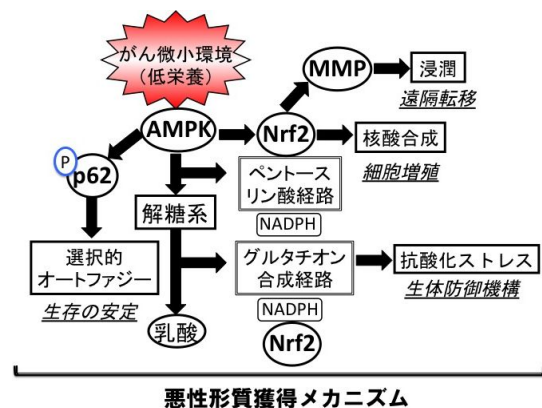


図 1 がん微小環境によるがん細胞の悪性形質獲得機序の概略図

2. 研究の目的

本研究は、がん微小環境ストレスにより獲得する高い進展能力、生体防御機構、生存戦略の分子メカニズムは AMPK-Nrf2 経路を軸とした、共通分子により制御されている根拠の提示を最終目的とした。本研究を通して、栄養飢餓により活性化する LKB1/AMPK が「オートファジー」を活性化することで Nrf2 を誘導

し、LKB1/AMPK-Nrf2 が「酸化ストレスの抑制」、「エネルギー代謝経路の活性化」、「浸潤能の促進」に関与することを示す（図 1）。

3. 研究の方法

本研究は、解毒、代謝を担う肝がん細胞株を中心に、飢餓環境に耐性を示す膵がん細胞株や LKB1 欠失細胞株などを用いて種々の検討を行った。

4. 研究成果

(1) LKB1/AMPK シグナルを介したオートファジーと Nrf2 の誘導

HepG2 細胞株をグルコース飢餓条件で培養したところ、オートファゴソームマーカーの LC3 の増加およびオートファジーの選択的分解基質である p62 の発現減少が認められたことから、グルコース飢餓はオートファジーを活性化することが示唆された（図 2A）。オートファジーの活性化に伴い、Nrf2 の核内蓄積量の著しい増加と、Nrf2 の標的遺伝子であり酸化ストレス応答に関わる HO-1、NQO1 の誘導が認められた。また、Nrf2 の抑制性因子である Keap1 の発現は、グルコース飢餓により減少することが分かった。Keap1 はオートファジーの標的となることが報告されているため、Keap1 はオートファジーにより分解され減少したものと推察された。グルコース飢餓におけるオートファジーの活性化と Nrf2 誘導を中心とした酸化ストレス応答は、LKB1 ならびに AMPK のノックダウンや活性酸素種 (ROS) 除去剤である N-acetyl-cystein (NAC) 添加により減弱したことから、Nrf2 の誘導に LKB1/AMPK シグナル伝達の活性化が関与することが明らかとなった。LKB1/AMPK はオートファジーの制御分子であることは知られているため、全アミノ酸を欠乏させた培地で培養したところ、LKB1 および AMPK のノックダウン細胞株においてもコントロール同様に LC3 の増加および p62 の減少が認められた（図

2B）。すなわち、LKB1/AMPK を介したオートファジーの活性化機序は、グルコース飢餓環境に対して特異的であることが示唆された。

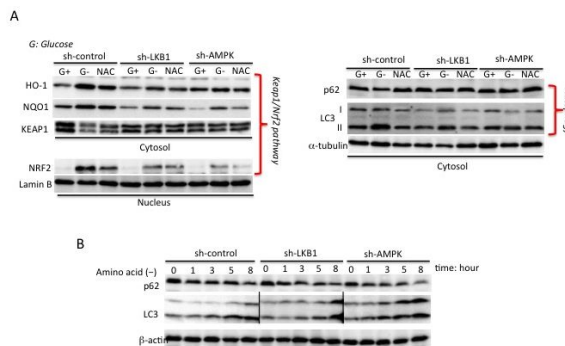


図 2 LKB1/AMPK シグナルを介したオートファジーと Nrf2 の誘導

(2) LKB1/AMPK を介した酸化ストレス制御の検討

グルコース飢餓は LKB1/AMPK を活性化し、Nrf2 を誘導したことから、LKB1/AMPK が酸化ストレスを制御していることが予想されたため、LKB1/AMPK シグナルと ROS 量 (H_2O_2) の関係を検討した（図 3A）。グルコース飢餓により、細胞内 ROS の増加を認めた。LKB1, AMPK のノックダウン株において、コントロールと比較し著しい ROS 量の亢進を認めたことから、LKB1/AMPK は酸化ストレス制御に関わる事が明らかとなった。また、LKB1/AMPK ノックダウンは、酸化ストレス制御能が減弱するため、グルコース飢餓によりアポトーシスマーカーである切断された PARP の著しい増加を認めた（図 3B）。

LKB1/AMPK は、飢餓環境下において細胞内 ATP 量を保持することで、エネルギー恒常性に寄与する分子である。本研究において、ROS 除去剤である NAC の処理により LKB1/AMPK の活性化が減弱したことから、NAC が ATP を補完する可能性が考えられた。しかしながら、グルコース飢餓により低下した ATP 量は、NAC 添加により変化しなかったことから（図 3C）、ROS が LKB1/AMPK シグナル活性化の起点になる一方で、LKB1/AMPK は ROS が過剰量になら

ないよう適切に管理している役割を担っている分子であると考えた。

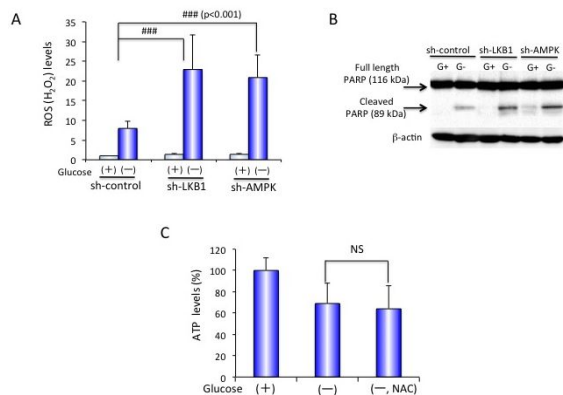


図 3 LKB1/AMPK による酸化ストレス制御

(3) グルコース飢餓によるがん細胞の遊走能と浸潤能の検討

腫瘍内微小環境を構成する低栄養状態は、がんの悪性を促進させる要因であると考えられている。培養液中のグルコース濃度を 25, 5.5, 1 mM に調整し、スクラッチアッセイによる細胞遊走能の検討を行った(図 4A)。興味深いことに、グルコース濃度の低下に伴って、細胞の創傷部位の修復亢進が認められたことから、細胞遊走能は低栄養条件、特にグルコース濃度の低下を感知し活性化することが明らかとなった。次に、グルコース濃度と浸潤能の変化について検討を行った。マトリゲルを用いた浸潤能アッセイを行ったところ、遊走能と同様にグルコース濃度の低下により浸潤能は明らかに亢進した(図 4B)。遊走能および浸潤能の亢進は、LKB1, AMPK の抑制により減弱した。

遊走能や、マトリゲルに含まれる細胞外マトリックス(IV型コラーゲンやラミニンなど)の分解に関与する分子にMMP-9が知られている。MMP-9は血管新生やがん細胞の増殖など様々な局面でがん細胞の悪性形質を支える役割を担うため、栄養飢餓環境に適応しつつ細胞移動を成立させる分子として理にかなっている。事実、MMP-9の転写活性をルシフェラーゼアッセイで検討したところ、グルコ

ース飢餓はMMP-9の転写を活性化することが明らかとなった(図 4C)。一方、LKB1, AMPKのノックダウンにより、その転写活性化は抑制された。

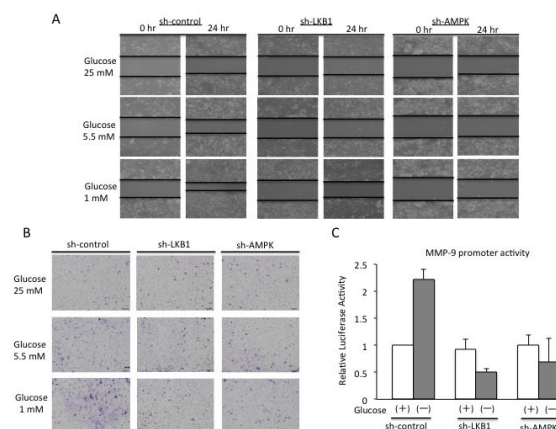


図 4 グルコース飢餓によるがん細胞の遊走能と浸潤能の亢進

今後、本研究によって得られた結果をもとに、がん微小環境特異的なLKB1/AMPK-Nrf2活性化に焦点を当てた研究を進めていくことで、新たな浸潤、転移抑制機序の解明と発がん予防ならびに治療法の展開が期待される。

<引用文献>

Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al., Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. 22, 2012, 66-79, Cancer Cell.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

小林典子、田中守、遠藤整、渡辺哲・ラット NASH モデルにおいて酪酸菌の投与が腸内細菌叢に与える影響。消化と吸収、査読有、37 巻、92-96, 2015.

Kawaguchi AT, Endo H, Aikawa H, Yamano M, Kawaguchi Y, Haida M, Watanabe T. Effects of liposome-encapsulated

hemoglobin on learning ability in tokai high-avoider rat after total brain ischemia and reperfusion. Artificial Organs, 査読有、Vol.38, 2014,667-674. DOI:10.1111/aor.12352.

〔学会発表〕(計7件)

遠藤整、大和田賢、根津貴洋、志田侑華里、立道昌幸 . Metabolic stress promotes cancer cell invasion and migration by activating LKB1/AMPK-dependent mechanisms. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6-8日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

遠藤整、大和田賢、根津貴洋、志田侑華里、立道昌幸 . 飢餓環境における酸化ストレス応答はがん細胞の悪性形質に関与する. 第69回日本酸化ストレス学会、2016年8月30-31日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Endo H, Nezu T, Sida Y, Tatemichi M. LKB1/AMPK regulates MMP-9 expression to adapt against glucose-starvation stress. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Endo H, Nezu T, Sida Y, Tatemichi M. LKB1/AMPK regulates autophagy-mediated MMP-9 expression to promote cancer cell development during microenvironmental stress. 10th World Congress for Microcirculation 2015年9月25-27日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

遠藤整、根津貴洋、立道昌幸 . 低栄養環境適応機構を介したがん細胞の進展機序の解明. 第3回がんと代謝研究会、2015年7月16-17日、石川県立音楽堂交流ホール(石川県・金沢市)

遠藤整、根津貴洋、渡辺哲、立道昌幸 .

がん細胞の低栄養環境適応と進展メカニズムの解明 . 第14回分子予防環境医学研究会、2015年2月13-14日、大阪市立大学(大阪府・大阪市)

小林典子、田中守、遠藤整、渡辺哲 . ラット NASH モデルにおける酪酸菌投与が腸内細菌叢に与える影響 . 第45回日本消化吸収学会総会、2014年11月22日、京王プラザホテル(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東海大学医学部基盤診療学系 衛生学公衆衛生学

<http://health.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10550551