

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790763

研究課題名（和文）ヒト悪性中皮腫の新予防・治療法のための基礎研究-AMPK 活性化の重要性

研究課題名（英文） The effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AMPK) on malignant mesothelioma cell growth and survival interval in an implant animal model of malignant mesothelioma

研究代表者

牛 凱軍 (NIU KAIJUN)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号：70447134

研究成果の概要（和文）：

*in vitro* 及び *in vivo*, AICAR の投与が細胞周期の抑制とアポトーシスの誘導により, 細胞の増殖とマウス皮下での成長の抑制効果を見出した. 細胞内のシグナルに関しては AICAR の投与が細胞の p53 タンパク質と phospho-p53 の発現量を増加し, phosphor-Akt と p70/phosphor-p70 の発現量を減らした. 更に, 胸腔モデルでは AICAR の投与が対照群に比べて, モデルマウスの生存期間を有意に延長した. これらの結果が AMPK の活性化及び AICAR が悪性中皮腫の重要な治療ターゲットであることを暗示した.

研究成果の概要（英文）：

*In vitro*, AICAR treatment significantly impaired the cell proliferation rate of malignant mesothelioma (MM) cell lines. *In vivo*, treatment with AICAR significantly decreased the growth rate of MM, which was accompanied by an increase in p53/phosphor-p53 levels, and down-regulated protein levels of phosphor-Akt and p70/phosphor-p70. Similar intracellular pathways are also observed *in vitro* experiment. These effects partly involved induction of growth arrest and apoptosis to MM cells. AICAR treatment activated AMPK. Finally, AICAR treatment also significantly extended survival interval in an implant animal model of MM. These findings suggested that AICAR or the induction of AMPK activity is an important tactic for developing therapeutic strategies against MM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症、ヒト悪性中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベストの曝露に強く関連し、恐ろしい癌の一つである。長い潜伏期(曝露の開始から、15-40年)(Thorax 1999;54:638-52)と短い平均生存期間(4-12ヶ月)(J Clin Oncol 2003;21:2636-44)から、「静かな時限爆弾」と呼ばれている。日本ではアスベストの輸入/消費量に密に関連し、悪性中皮腫による死亡が2010-2050年の間に急増し、2039年までに10万人程度の死亡が予測されている(村上武彦, 生学会要旨集2002:188)。また、この癌は手術、化学及び放射線などの治療に抵抗する(Chest 1999;116:504-20)ことから、新たな治療法の開発が急務である。

悪性中皮腫の形成には、AP-1(activator protein-1)とNF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B)(Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:3299-303; 2006;103: 10397-402)経路の活性化が主要なメカニズムである。NF- $\kappa$ Bは転写因子の一つであり、p53, Bcl2, サイクリンD1などのシグナルを介して、癌細胞アポトーシスの抵抗と細胞増殖の促進に関連する。AP-1も転写因子の一つであり、主にFos, Jun, ATF遺伝子群から構成される二量体であり、刺激に対する細胞のさまざまな反応を制御し、細胞の分化・増殖・アポトーシスに重要な役割を担っている。これらのメカニズムは中皮腫細胞がアスベストからの細胞毒性によるアポトーシスに抵抗し、癌化細胞へ形質転換の主要なメカニズムである。

一方、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)は、エネルギー代謝センサーとして機能し、その下流の種々のエフェクタをリン酸化することによって、解糖・脂肪酸酸化の促進と脂質合成、タンパク質合成の抑制を司る(Trends Pharmacol Sci 2005;26: 69-76)。エネルギー代謝自体は生命現象に不可欠なものなので、AMPKも細胞の成長、細胞周期に関与している。例えば、AMPKの活性化はp53/p21とTSC2(tuberous sclerosis 2)/mTOR(mammalian target of rapamycin)経路を経由し、細胞周期進行と細胞成長を抑制する(J Biol Chem 2005; 280:39582-93; Med Sci Sports Exerc 2006;38:1958-64)。また、細胞構造の崩壊とエネルギー代謝の変化は、悪性細胞の2つの特徴であることから、AMPKの癌への関与も予想されている。更に、腫瘍抑制遺伝子であるLKB1はAMPKの上流キナーゼとして機能していることから、AMPKの活性化が悪性中皮腫の形成メカニズムであるAP-1とNF- $\kappa$ B経路による細胞増殖とアポトーシス抵抗に拮抗し、悪性中皮腫治療のターゲットの一つであるという仮説が立てられている。これ

まで我々は6種類のヒト悪性中皮腫細胞(ATCC由来3種類<ドナー:白人>; 独立行政法人理化学研究所由来3種類<ドナー:日本人>)を用いて、AICAR(AMPKの活性化剤)AMPKの活性化による細胞増殖への影響及びその可能なメカニズムを検討した。ウェスタンブロッティング分析はAMPKの活性化剤であるAICARが悪性中皮腫細胞(ATCC, H2452)でAMPKを特異的に活性化したことを示した。AICARも用量依存にかつ時間的に細胞の増殖(ATCC, H2452)を抑制した。更にBrdUと7-AADによる細胞周期解析をFACSにより評価した。AICARの24時間培養の時点では、ほぼ完全にDNA合成を抑制したが、アポトーシスの誘導はなされていなかった。これらの結果はAMPKの活性化が悪性中皮腫の治療ターゲットである可能性を示唆している。そして、そのメカニズムの解明とin vivoの検討の重要性も提示している。

## 2. 研究の目的

ヒト由来の悪性中皮腫セルライン細胞とヒト悪性中皮腫モデルマウスを用いて、AMPKの活性化がどのようなシグナルで悪性中皮腫細胞の増殖を抑制するか、そして、in vivoの効果及びその可能なメカニズムなどを明らかにすることにより、悪性中皮腫の新たな予防・治療法の開発を目指すものである。

具体的に以下の内容を含めている。

①初年度には、in vitro AMPKの活性がどのようにこれらの分子に関与するか、そして、これらのシグナルをブロックすることによりAMPKの活性化による細胞周期の変化・増殖の変化にどんな影響を与えるかのを明らかにする。多変量解析の手法を用いて、各因子の寄与程度も評価する。

②これらのシグナルを確認するうえで、2年目からは、NOGと呼ばれる免疫不全マウスを用いて、胸腔にヒト悪性中皮腫細胞を注入し、ヒト悪性中皮腫モデルマウスを作製する(研究計画・方法参照)。その後、AICARをモデルマウスの腹部に注射し、約1ヶ月後の解剖により、コントロールマウスに比べて、どれぐらい癌の成長を抑制したか、癌組織の免疫染色などにより、AMPKの活性化状態のin vitroで検討したシグナルへの関与を確認する。

③また、死亡までの日数解析(生存分析)も行う予定である。

これらの実験により、in vivoでのAMPKの活性化による悪性中皮腫の成長、モデルマウスの生存、及びその可能なメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究はヒト悪性中皮腫セルライン細胞(ATCCから購入した3種類: H28, H2452, H2052; 独立行政法人理化学研究所から購入した3種

類: RCB0819, RCB2292, RCB2293)とヒト悪性中皮腫モデルマウスを用いて進めていく。

ヒト悪性中皮腫モデルマウスの作製:

我々は作成したプロトコルでヒト悪性中皮腫モデルマウスを作製する。6週齢のNOGマウス(免疫不全マウス, scidなどのマウスに比べて腫瘍の成長が顕著に良い; ヒト悪性中皮腫由来細胞株による腫瘍形成を確認した)を(財)実験動物中央研究所から購入する。ヒト悪性中皮腫細胞をPBSで $5 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ l 細胞濃度に懸濁させる。マウスに麻酔をかけた上で、右胸部の毛を剃り、70%アルコールで消毒し、皮膚を約1cmの長さで切って開け、肋骨が見えるように胸壁を暴露する。27号注射針を用いて100 $\mu$ l 細胞懸濁液を肋間に沿って胸腔の中に注入し、皮膚を縫合する。約1ヵ月後に癌の成長が肉眼的に確認できる。癌細胞もHE染色により確認できる。更に、腫瘍の凍結標本作製し、ヒアルトニダーゼ吸収試験を行い、悪性中皮腫の存在を確認する。モデルマウスの生存期間は約45日になる(Cancer Sci 2006;97:183-91)。

平成21年度は、以下に焦点を当て結論を出す。

① *in vitro* AICARによる細胞増殖の抑制におけるアポトーシスの関与の有無を明らかにする。

*in vitro* 6種類のヒト悪性中皮腫セルライン細胞を用いて、検討する。培養している細胞をトリプシン+EDTA用いて剥がす。 $5 \times 10^5$  細胞/mlまで調節し、10cm培養dishに細胞溶液を10ml撒く。24時間後に、AMPKの活性化剤であるAICARを0, 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 5濃度で添加する。48時間, 72時間後に、アネキシンV-FLUOS染色キットを用いて、細胞のアポトーシスの程度を比較する。更に、AMPK活性化の特異性を検証するために、AMPKの阻害剤であるCompound CをAICAR処理の30分前に投与することにより、検討する。

② AICARによる細胞増殖の抑制に関与する因子の解明。

上記と同じ条件で細胞を刺激した上で、12時間, 24時間, 48時間, 72時間後に、細胞を処理し、トータルRNAと蛋白質を抽出する。AMPKの活性化によるシグナルに関連する分子をmRNA(real-time PCR法)と蛋白質レベル(ウェスタンブロットリング法)で検出し、比較する。

関連因子が確認できたら、siRNA法を用いて、関連因子を一つずつ、またその組み合わせをブロックしたうえで、AICARの投与による細胞への影響の変化を検討することにより、どのようなシグナルが最も関連したのかを多変量統計解析の処理も含んで明ら

かにする。

平成22年度以後

① 上述したヒト悪性中皮腫モデルマウスを用いて、*in vivo*におけるAICARの投与による癌の成長、及びマウスの生存期間への影響を明らかにする。

モデルマウスを作製してから、5日~14日の間に、以下の投与で3グループを作成する。各グループに20匹ずつマウス(10匹: 癌の成長, 組織染色など; 10匹: 生存時間分析)を用意する。

グループ1(コントロール): AICAR投与グループと等量の蒸留水を注入する。

グループ2(低用量AICAR): 毎日滅菌したAICAR蒸留水溶液を10mg/kg体重の用量で腹膜内に注射する。

グループ3(高用量AICAR): 100mg/kg体重のAICAR溶液を腹膜内に注射する。

投与した後に、毎日観察し、28日目に過剰麻酔による安楽死をする上で、解剖し、腫瘍を切り離し、腫瘍の重さを計測したうえで、腫瘍組織を10%ホルマリンで固定、または液体窒素の中に保存する。生存時間分析のために、毎日観察をおこなって、死亡時の経過日数を記録し、最終的にlog-rank法を用いて、統計解析を行う。

② *in vivo* 関連因子の解明

平成21年度に得られたAICARによる細胞増殖の抑制因子を解明するために、保存した腫瘍組織を用いて、直接的に組織の免疫染色をおこない、またはトータルRNAと蛋白質などを抽出し、real-time PCR法とウェスタンブロットリング法などをおこなう。*in vivo*においては、これらの実験法も我々の以前の研究により確立されている

(Neoplasia 2008;10:932-9; Am J Pathol. 2007;171(4):1093-1103)。

4. 研究成果

*in vitro* (6種類のヒト悪性中皮腫細胞)及び*in vivo* (ヒト悪性中皮腫の皮下モデル)を用い、AMPK活性化剤であるAICARの投与が細胞の増殖とマウス皮下での成長の抑制効果を見出した。皮下モデルの組織免疫染色分析(ki67染色)に関しては対照群に比べ、AICAR投与が約40%の組織内の細胞の増殖を抑制したことが分かった。*in vitro*, Annexin Vによるアポトーシス検出の検討を行い、500 $\mu$ g/mlのAICARの投与が、48時間後に、対照群の細胞に比べ、約10%のアポトーシス細胞を増やしたことが分かった。更に、BrdUの細胞周期解析では500 $\mu$ g/mlのAICARの投与が、48時間後に、対照群の細胞に比べ、約15%のS期細胞を抑制したことが分かった。この2つの観察したことに 대해서는細胞内のシグナルである p53/phosphor-p53 及び Akt/phosphor-Akt, p70/phosphor-p70 を

Western blotting analysis を用い、検討した。結果は AICAR の投与が細胞の p53 タンパク質と phospho-p53 の発現量を増加し、phosphor-Akt と p70/phosphor-p70 の発現量を減らした。in vivo では皮下モデルのサンプルを用い、TANEL によるアポトーシス検出の検討を行ない、AICAR の投与が、対照群に比べ、TANEL 陽性細胞の割合が有意に増えることは観察された。シグナルに関しては in vitro と同じように p53/phosphor-p53 の増加と phosphor-Akt と p70/phosphor-p70 の発現量の減少が見られた。更に、もっと臨床に近いモデル(胸腔モデル)を作成し、AICAR はモデルマウスの生存率に対する影響を検討した結果、対照群の生存期間の中央値(範囲)は 20 日(15-22 日)であった。これに比べて、AICAR 投与群(1kg 体重あたり 100mg の AICAR を毎日投与)の生存期間の中央値(範囲)は 29 日(22-33 日)であった ( $P < 0.05$ )。以上の結果から、AICAR が p53 と mTOR シグナルを経由し、ヒト悪性中皮腫の in vivo での成長を抑制し、生存期間を延長した。

#### 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 1 件)

Kaijun Niu, Masanori Asada, Tatsuma Okazaki, Shinsuke Yamanda, Takae Ebihara, Hui Guo, Dongying Zhang, Ryoichi Nagatomi, Hiroyuki Arai, Masahiro Kohzuki, and Satoru Ebihara. Adiponectin pathway attenuates malignant mesothelioma cell growth. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011, in press (10.1165/rcmb.2011-00680C) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

生凱軍、海老原覚、浅田成紀、矢満田慎介、岡崎達馬、荒井啓行、永富良一 AMP 活性化プロテインキナーゼ活性化と悪性中皮腫 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、2010 年 04 月 24 日、京都・国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

牛 凱軍 (NIU KAIJUN)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号：70447134

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：