

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09012

研究課題名(和文) AMPK活性化とGSK3阻害によるワールブルグ効果抑制を介した肝癌制御の基礎検討

研究課題名(英文) Anti-tumor effect against hepatoma cells by suppressing the Warburg effect by AMPK activation and GSK3 inhibition

研究代表者

中尾 一彦 (NAKAO, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00264218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞は通常状態において、すでに解糖系優位の代謝状態にあり、低酸素条件下ならびに高血糖・高インスリン培養条件下では、HIF-1の誘導に一致して、さらに解糖系優位な代謝状態にシフトすることが確認された。この時に、AMPKのキナーゼ活性が時間依存性に抑制されることが明らかとなった。さらに、AMPK活性化薬剤であるメトホルミンの添加により、解糖系優位にシフトした代謝状態が通常培養条件下に戻る傾向にあることも観察された。低酸素条件下ならびに高血糖・高インスリン培養条件下で誘導される上皮間葉移行関連遺伝子発現もメトホルミンの添加により抑制される傾向にあることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Hepatoma cells are already in a metabolic state predominantly related to glycolysis in the normal state. Under hypoxic conditions as well as hyperglycemia / hyperglycemia / hyperinsulin culture conditions, it was further metabolized to a glycolytic dominant state in agreement with the induction of HIF-1. At this time, it became clear that the kinase activity of AMPK is suppressed in a time-dependent manner. In addition, it was observed that the addition of metformin, an AMPK activating agent, returned the metabolic state shifted predominantly to the glycolysis system under normal culture conditions. It was confirmed that expression of epithelial mesenchymal transition-related genes induced under hypoxic conditions and under hyperglycemia / hyperglycemia culture conditions was also suppressed by the addition of metformin.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝癌細胞 ワールブルグ効果 AMPK GSK3

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は好氣的条件下でもミトコンドリアによる酸化的リン酸化を行わず、嫌氣的解糖系によって ATP を産生している。これをワールブルグ効果と呼ぶ。嫌氣的解糖系は ATP の産生効率は低いものの、生体分子の合成材料となる核酸、アミノ酸、脂肪酸、NADPH の供給に繋がることから、分裂増殖を繰り返す癌細胞には有利に働く。ワールブルグ効果により、癌細胞は正常細胞に比べ、大量のグルコースを取り込み消費している。この性質を利用して癌を検出するのが PET-CT である。

AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は細胞内エネルギーである ATP の枯渇を感知し活性化し、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化を亢進させ、効率的な ATP 産生 (異化) を促進する。その一方で、嫌氣的解糖系を阻害し、脂肪・タンパク合成 (同化) を抑制し ATP の消費を抑える。このように、AMPK は癌細胞の代謝系に対し相反的に作用することから、肝癌を含む多くの癌細胞で AMPK の活性は抑制されている。言い換えれば、AMPK は癌抑制作用を持ち、その作用は、嫌氣的解糖系 (ワールブルグ効果) の抑制、p53 の活性化、脂肪酸とコレステロール合成阻害、タンパク合成を促進する mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の活性阻害を介することが明らかとなっている。2014 年、AMPK は同化作用の主なシグナル系である PI3K-AKT 経路を阻害することで Foxo3a を活性化し、乳癌、前立腺癌細胞の上皮間葉移行 (EMT) (浸潤・運動能亢進) を抑制することが報告された。

細胞の代謝が異化から同化に転換する際に AMPK が不活化される詳細な機序は、これまで不明であった。しかし、2014 年、glycogen synthase kinase 3 (GSK3) が AMPK の活性を阻害することが報告され、GSK3 は、AMPK のサブユニットの Thr479 をリン酸化することで AMPK の活性に必須である Thr172

の脱リン酸化を促進し AMPK を不活化すること、インスリン/PI3K-AKT 経路によるサブユニット Ser485 のリン酸化が GSK3 による Thr479 のリン酸化を促進すること、GSK3 を阻害すると細胞の ATP が豊富な状態でも AMPK が恒常的に活性化されることが明らかになった。すなわち、インスリンの同化作用により AMPK が不活性化される際に、GSK3 が重要な働きをすることが示されたのである。この報告は、GSK3 が癌細胞のワールブルグ効果を誘導・維持しているという仮説を支持するものであり、GSK3 は AMPK の活性を阻害することで、その抗腫瘍作用を抑制し、癌に対して促進的に働くと考えられる。

肝癌は腫瘍血管に富む hyper vascular な癌であり栄養動脈の塞栓が肝癌治療に用いられることから、元来、酸素要求度の高い好氣的条件を好む癌と考えられている。一方で、腫瘍の増大に伴い、癌の脱分化が進み (生物学的悪性度が増し) 腫瘍の増殖速度は増し、脈管浸潤や遠隔転移をきたし最終的には宿主を死に至らしめる。この脱分化の過程に肝癌細胞の上皮間葉移行 (EMT) が関連していることが知られている。AMPK と肝癌に関する研究として、AMPK の Thr172 リン酸化が低下している肝癌は、リン酸化が維持されている肝癌より予後が悪いこと、AMPK を活性化する試薬が肝癌細胞の増殖を抑制すること等が報告されている。

しかし、好氣的条件を好む肝癌に於いても、他の癌と同じく嫌氣的解糖系が亢進しているのか? 異化、同化を制御する AMPK と GSK3 の関係は、肝癌細胞でどのようになっているのか? グルコース、インスリン、増殖因子、低酸素、低栄養などの微小環境の変化が肝癌細胞のエネルギー代謝に与える影響とその際の AMPK、GSK3 の挙動は? 肝癌細胞の上皮間葉移行と AMPK、GSK3 の関連は? AMPK の活性化、GSK3 活性の阻害が肝癌の増殖や浸潤・運動能に与える影響は? など肝癌にお

ける AMPK、GSK3 の機能について Tumor biology の観点から明らかにすべき点は多く残されており、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

癌細胞は好氣的条件下でも嫌氣的解糖系によりエネルギーを得ている（ワールブルグ効果）。嫌氣的解糖系を抑制し酸化的リン酸化を促進する AMPK は癌細胞で不活化されており、GSK3 がその不活化に関わっている。本研究は、肝癌細胞の代謝を標的とした新たな肝癌治療戦略の開発を目的としている。まず、好氣的条件を好む肝癌細胞の代謝状態を明らかにするために、様々な条件下で培養した肝癌細胞を用い、肝細胞のエネルギー代謝であるミトコンドリア呼吸系と解糖系のバランス、ワールブルグ効果の程度を、細胞外フラックスアナライザーXF を用いて解析を行った。メタボロノーム解析と AMPK、GSK3 活性の解析を行う。次に、AMPK の活性化ならびに GSK3 活性の阻害による肝癌細胞の代謝状態の変化を解析し、肝癌細胞に対する抗腫瘍効果（増殖抑制、細胞死誘導）と上皮間葉移行抑制効果の有無について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝癌細胞におけるワールブルグ効果と AMPK と GSK3 の関連を明らかにする。

正常肝細胞、各種肝癌細胞を通常条件で培養し、肝細胞のエネルギー代謝であるミトコンドリア呼吸系と解糖系のバランス、ワールブルグ効果の程度を、細胞外フラックスアナライザーXF を用いて解析を行う。また、他の癌細胞でも同等の解析を行い、肝癌細胞との比較検討を行う。

正常肝細胞、各種肝癌細胞における AMPK の mRNA 量をリアルタイム PCR で定量する。次に AMPK 蛋白発現を western blot で確認後、

Thr172 リン酸化（活性型）検出抗体、Thr479 リン酸化（不活性型）検出抗体を用いて western blot を行い活性型 / 不活性型の比率を求める。AMPK のキナーゼ活性について測定キットを用いて調べる。

同様に正常肝細胞、各種肝癌細胞における GSK3 の発現量をリアルタイム PCR、western blot で検討後、Ser9 リン酸化（不活性型）検出抗体、Thr216 リン酸化（活性型）検出抗体を用いて western blot を行い活性型 / 不活性型の比率を検討する。次に AMPK と GSK3 の会合状態を免疫沈降により検討する。

(2) 肝癌細胞における微小環境の変化による AMPK と GSK3 の挙動を明らかにする。肝癌細胞をインスリン、肝細胞増殖因子 (HGF)、低グルコース、低酸素、低栄養（分枝鎖アミノ酸欠乏状態）など、様々な培養条件（微小環境の変化）で培養し、メタボロノーム解析、AMPK、GSK3 の活性化状態を検討し、微小環境変化による代謝状態ならびに AMPK、GSK3 活性の変化について検討する。肝癌細胞に上皮間葉移行 (EMT) を誘導し、EMT に伴う AMPK、GSK3 の活性変化を明らかにする。

(3) AMPK 活性化、GSK3 阻害による肝癌に対する抗腫瘍効果を明らかにする。

AMPK 活性化、GSK3 阻害が代謝、シグナル経路、microRNA 発現に与える影響を検討する。AMPK 活性化薬剤（メトフォルミン、AICAR、OSU-53）、GSK3 阻害剤（LiCl）、AMPK 恒常的活性化、shRNA による GSK3 のノックダウンなどによる肝癌細胞のエネルギー状態の変化（ワールブルグ効果の抑制）を細胞外フラックスアナライザーXF を用いて確認する。

AMPK 活性化、GSK3 阻害、単独ないし同時処理による肝癌細胞の増殖抑制効果、アポトーシス誘導などの抗腫瘍効果を検討する。さらに AMPK 活性化、GSK3 阻害、単独ないし同時処理によって、肝癌細胞の EMT を抑制することができるか、逆に上 EMT によって

間葉系細胞の性質を獲得した肝癌細胞に上皮系細胞の性質を戻す MET を誘導することができるかを検討する。

4 . 研究成果

通常培養条件下、微小環境変化（低酸素、高血糖・高インスリン、肝細胞増殖因子存在、分枝鎖アミノ酸欠乏状態等）条件下における、肝細胞のエネルギー代謝であるミトコンドリア呼吸系と解糖系のバランス、ワールブルグ効果の程度を、細胞外フラックスアナライザーXF を用いて解析を行った。その結果、肝癌細胞は通常状態において、すでに解糖系優位の代謝状態にあり、低酸素条件下ならびに高血糖・高インスリン培養条件下では、HIF-1 の誘導に一致して、さらに解糖系優位な代謝状態にシフトすることが確認された。また、この時に、AMPK のキナーゼ活性が時間依存性に抑制されることが明らかとなった。さらに、AMPK 活性化薬剤であるメトホルミンの添加により、解糖系優位にシフトした代謝状態が通常培養条件下に戻る傾向にあることも観察された。低酸素条件下ならびに高血糖・高インスリン培養条件下で誘導される上皮間葉移行関連遺伝子発現もメトホルミンの添加により抑制される傾向にあることが確認された。一方、肝細胞増殖因子添加、分枝鎖アミノ酸欠乏状態では肝癌細胞の代謝状態の変化は軽微なものにとどまった。GSK3 活性に関しては、低酸素条件下ならびに高血糖・高インスリン培養条件下で AMPK 活性と相反し、活性が増強される傾向にあることが観察されたが、その程度は弱かった。GSK3 阻害剤添加による代謝解析では、予想に反しミトコンドリア呼吸系は抑制方向に向かうことが示され肝癌細胞における GSK3 作用が他の癌細胞と異なることが示唆された。前述のメトホルミンによる代謝変化も軽度にとどまるため、現在、細胞のエネルギー状態

を変化させず AMPK を活性化できる adenosine アナログである AICAR (5-aminimidazole -4-carboxamide ribonucleoside) を用いた検討を実施中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

中尾 一彦 (NAKAO, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授

研究者番号：00264218

(2)研究分担者

玉田 陽子 (TAMADA, Yoko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70393460

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし