

氏名	石村 恵美
(ふりがな)	(いしむら めぐみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Augmented <i>O</i> -GlcNAcylation of AMP-activated kinase promotes the proliferation of LoVo cells, a colon cancer cell line (大腸癌細胞株 LoVo 細胞において AMPK の <i>O</i> -GlcNAc 修飾は腫瘍増殖を促進させる)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 田 中 慶 太 朗 教授 富 永 和 作

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

近年、糖尿病と癌罹患リスクとの関連が注目されている。コホートスタディやメタアナライシスにて、糖尿病は大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、子宮内膜癌、乳癌等の発症リスク増加に関連していることが示されている。

O-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-linked *N*-acetylglucosamine: *O*-GlcNAc) は細胞活動に必須の糖鎖であり、種々のタンパク質のセリン/スレオニン 残基に付加されており、その量は *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) 及び *O*-GlcNAc 離脱酵素 (OGA) によって制御されている。高血糖は細胞内蛋白質の *O*-GlcNAc 修飾を亢進させ、悪性腫瘍や神経変性疾患の増悪に影響を及ぼすことから、*O*-GlcNAc 修飾は乳癌、大腸癌、肺癌の増殖に重要な因子であるという報告が認められる。しかし、その詳細は明らかではない。

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞のエネルギー恒常性の最上位の調節因子として重要な役割を担っているが、腫瘍細胞においてその活性化は増殖抑制効果を示すと考えられており、治療ターゲットとして有望視されている。今回我々は、樹立化ヒト大腸癌細胞株 LoVo 細胞を用い、O-GlcNAc 修飾と細胞増殖の関連について AMPK の関与を中心に検討した。

《方法》

【In vitro】 LoVo 細胞を用いて、その増殖における各種薬剤、OGA 阻害薬 (Thiamet G : TMG)、AMPK 阻害薬 (BML-275) , AMPK 活性化薬 (AICAR) の影響を Cell counting kit 8 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) により測定した。タンパク質 O-GlcNAc 修飾、AMPK リン酸化等のタンパク質発現解析は Western blotting 法により検討した。

【In vivo】 Balb/c-nu/nu (ヌードマウス) の LoVo 細胞皮下移植モデルにおける O-GlcNAc 修飾の影響を検討するため、TMG 腹腔内投与群、PBS 投与群の腫瘍サイズを経時的に測定し、比較検討した。腫瘍組織におけるタンパク質の発現解析は Western blotting 法により行った。

《結果》

LoVo 細胞を O-GlcNAc 修飾の増加をもたらす TMG 存在下で細胞を培養したところ、足場依存性、及び非依存性増殖が共に亢進した。AMPK の O-GlcNAc 修飾は TMG 濃度依存的に増加し、AMPK のリン酸化も抑制された。LoVo 細胞に Ogt 遺伝子を導入し、O-GlcNAc 修飾を亢進した場合も同様の結果が得られた。

BML-275 或いは siAMPK による発現抑制により AMPK 活性を阻害すると、LoVo 細胞の増殖は亢進した。その際、mammalian target of rapamycin (mTOR) および ribosomal S6 kinase (S6K) のリン酸化は亢進し、mTOR 経路が活性化していることが判明した。一方、TMG による LoVo 細胞増殖促進作用は siAMPK 処理により有意に低下したことから、O-GlcNAc 修飾による増殖促進作用は AMPK を介していることが示唆された。AMPK

活性の抑制が、*O*-GlcNAc 修飾による増殖促進に必須であることは、AICAR により AMPK 活性を亢進させることで TMG による *O*-GlcNAc 修飾亢進による増殖促進作用が消失したことにより支持された。

TMG あるいは PBS を腹腔内投与したヌードマウスの背部に LoVo 細胞を皮下移植した。LoVo 細胞はどちらのマウスにおいても腫瘍を形成したが、TMG 処理ヌードマウスにおいて有意な腫瘍増大が確認された。TMG 腹腔内投与したマウスで形成された腫瘍では AMPK の *O*-GlcNAc 修飾が有意に亢進していた。一方で、AMPK のリン酸化は低下しており、mTOR および S6K のリン酸化が有意に亢進していた。

《考察》

LoVo 細胞において、*O*-GlcNAc 修飾を亢進させると AMPK の活性は抑制され、細胞増殖は亢進した。同時に、AMPK の *O*-GlcNAc 修飾の亢進も確認された。AMPK 阻害剤ならびに AMPK 発現抑制による処理は、用量依存的に LoVo 細胞の増殖を促進した。対照 LoVo 細胞における mTOR 活性は TMG 処理で加速されたが、AMPK サイレンシング細胞における活性は変化しなかった。TMG 処理による mTOR シグナル伝達経路の活性化は AMPK の *O*-GlcNAc 修飾によるものであると考えられた。一方、特異的 AMPK 活性化薬 AICAR による処理は、LoVo 細胞の *O*-GlcNAc 修飾依存性増殖を抑制した。*O*-GlcNAc 修飾は何千もの細胞内タンパク質に起こり、細胞増殖にとって重要な多くのシグナル伝達経路に影響を及ぼすが、本実験の結果より、AMPK が *O*-GlcNAc 修飾により媒介される LoVo 細胞増殖のエフェクターの 1 つであると考えられた。

In vivo において、*O*-GlcNAc 修飾の亢進が大腸癌増殖に影響を及ぼすかどうかを調べるために、TMG 処理したヌードマウスの皮下に LoVo 細胞を移植した。TMG 処置ヌードマウスに移植した LoVo 細胞は、対照ヌードマウスと比較して有意に大きな腫瘍結節を形成した。腫瘍内での AMPK の *O*-GlcNAc 修飾及び mTOR 経路の活性化もともに増加した。

以上の in vitro および in vivo の両系において、*O*-GlcNAc 付加の増加は大腸癌細胞の AMPK 経路の不活性化を介して細胞増殖を促し、腫瘍増大に繋がることが示唆された。糖

尿病患者で観察される O-GlcNAc 修飾の増加は、大腸癌の増殖に一部関連する可能性が示唆された。

《結論》

これまで癌細胞において AMPK の O-GlcNAc 修飾は確認されていなかったが、本研究では、O-GlcNAc 修飾が AMPK 活性化を介して LoVo 細胞の増殖を促進することが判明した。今回の結果は、II 型糖尿病患者において高血糖環境が大腸癌発症のリスクファクターとなる一つの要因として AMPK の O-GlcNAc 修飾が関与している可能性を示唆し、O-GlcNAc 修飾の制御が、今後の大腸癌治療のターゲットの 1 つとして新たに展開するものと期待される。

(様式 甲6)

論文審査結果の要旨

糖尿病患者では様々な癌の発生リスクの増加が報告されている。タンパク質のセリン/スレオニン残基への *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 修飾は、糖尿病患者において上昇していることが報告されており、病態との関連が強く示唆されている。また *O*-GlcNAc 修飾は大腸癌を含め、多くの癌で増加していることが報告されているが、その関連については未だ解明されていない。一方で、AMP 活性化キナーゼ (AMPK) は腫瘍増殖の抑制において重要な役割を果たすと考えられている。

申請者は、高血糖環境下では、AMPK が *O*-GlcNAc 修飾される、*O*-GlcNAc 化 AMPK が大腸癌の増大に関与する、という2つの仮説を立て、糖尿病と大腸癌との関連性についてその分子機構を明らかにすることを目的とした。

In vitro でヒト大腸癌細胞株 LoVo 細胞は、化学物質及び遺伝子操作による *O*-GlcNAc 修飾の亢進により細胞増殖が亢進した。また、AMPK の *O*-GlcNAc 修飾は AMPK を標的としたものであり、その結果が AMPK リン酸化減少と AMPK と拮抗関係にある癌関連分子 mTOR のシグナル伝達経路の活性化に繋がった。さらに、*O*-GlcNAc 修飾による腫瘍増殖の亢進は、AMPK の化学的および遺伝子的阻害の両方によって阻害された。また、ヌードマウスへの LoVo 細胞移植モデルにおいては、化学物質による *O*-GlcNAc 修飾の亢進により、腫瘍結節は増大し、腫瘍内の AMPK の *O*-GlcNAc 修飾亢進、AMPK のリン酸化減少、mTOR 経路の活性化をもたらした。

以上の結果から、糖尿病患者の大腸癌をはじめとする癌リスクの上昇が、*O*-GlcNAc 修飾による AMPK 不活性化と mTOR 経路の活性化に起因する可能性が示唆された。本研究成果は、これらの分子が大腸癌の新たな治療標的となる可能性を示している。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条第1項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cancer Science

2017 doi: 10.1111/cas.13412 <オンライン掲載>