

がん細胞の栄養飢餓適応反応の
シグナル伝達解析

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻修士課程
久保田 秀行

目次

第 I 章	序論	1
第 II 章	材料・方法	5
第 III 章	結果	11
第 IV 章	考察	16
第 V 章	要旨	21
謝辞		22
図表・解説		23
参考文献		39

I : 序論

一般的に、がん細胞は正常細胞と異なり無秩序な増殖能を持つために既存の組織構築を破壊して行く。その為に細胞の生存に必須な血管網も構造的・機能的に不十分となり、血管から離れた細胞に対して十分な血流が行き届かなくなると考えられている。それに対する適応反応として血管新生によりがん組織内に微小血管を構築することが肝臓がんを始めとする多くのがんで知られている。最近注目されている腫瘍血管新生を標的とした治療法は正にこの様ながん組織の特徴に注目した治療法である(1)。一方、ヒトのがんでは血管内に造影剤を注入して血管を造影すると、腫瘍のほとんどに血流がないように見えるものがあり、その典型例が膵臓がんである。また、このがん組織内における酸素濃度を米国の研究者が酸素電極を直接がん組織に刺入し実測している。その結果、膵臓の健常な組織では 30-90 mmHg であるのに対し、がんの部分では数 mmHg 以下で、ほとんど検出されないところもあり、膵臓がんでは正常組織と比べ酸素濃度が極度に低くなっていることが明らかにされている(2)。一般に哺乳動物細胞は、嫌気的狀態では酸化的リン酸化による効率の良い ATP 合成が出来ないのを補うため、グルコースを嫌氣的にピルビン酸まで分解し、これを乳酸に変える嫌氣的解糖で ATP 合成を行うとされる。がん細胞も例外でなく、特にがん細胞の場合は好氣的条件でも解糖系が使われることが既に 90 年前に Otto Warburg により明らかにされている(3)。このことを前提とすると、膵臓がん組織は極度の低酸素であるため嫌氣的解糖によりエネルギーを得ていることになる。さらに、多くの細胞では低酸素に応答し転写因子 HIF-1 α の安定化が起こり HIF-1 β と二量体を形成することで活性化され、HIF-1 応答遺伝子の転写を活性化する(4)。HIF-1 応答遺伝子には解糖系の酵素群とともに、血管内皮増殖因子 VEGF や赤血球の産生を促進するエリスロポイエチンなどがある。つまり、解糖で生き延び、血管新生や赤血球増加により酸素運搬効率を上げ、低酸素を改善するという適応反応が起こる。このモデルは、一見何の矛盾もないようであるが決定的な欠陥がある。組織の低酸素状態は膵臓がん組織への血流の不足によりもたらされたものである。血流の極度に少ないがん組織にい

かにしてグルコースが十分に供給されるのであろうか？この矛盾を説明するためには、嫌氣的解糖でエネルギーを得るという最初の仮定を破棄せざるを得ない。従来知られている嫌気条件下での哺乳動物細胞のエネルギー代謝では説明が困難であり、特別な代謝が隠されていると考えた。また、このような組織ではエネルギーの消費を最低限にし、ぎりぎりのところで生存と増殖のバランスをとっているのではないか。その場合には、単にエネルギー代謝だけではなく細胞の生存や増殖、諸機能すべてにわたる調節が大きく変化している可能性が高く、これががんの悪性形質と深く関わっている可能性が高いと考え栄養飢餓耐性という考え方が提案された(5)(6)。

我々の研究室ではその適応機構としての低酸素・低栄養状態に対する耐性能(以下、飢餓耐性と呼ぶ)を獲得しているというモデルをたて、さらに、この飢餓環境ががん特異的なものであることを考慮すると、飢餓耐性解除が膵臓ガンの新たな治療の標的にもなりうるのではないかという仮説の下で、現在までにグルコース飢餓選択的に殺細胞効果を持つ薬剤としてキガマイシンを始めとするものがいくつか得られており(7)(8)(9)(10)、この治療モデルの有効性も *in vitro* のみならず、皮下腫瘍モデルマウスを用いた検討でも明らかになっている。ただし、これらの薬剤の飢餓耐性解除における作用機序は未知の部分が多く課題も残っている。

飢餓耐性能に寄与する主な因子として、AKT、ARK5 と AMPK- α の3つが現在までに明らかにされている(11)(12)(13)。後者二つは共に AMPK (AMP-activated protein kinase) と呼ばれる分子群に分類されている。AMPK は、触媒ドメインを有する α サブユニットおよび調節サブユニットである β 、 γ から成るヘテロ三量体のキナーゼであり、栄養飢餓、低酸素、熱ショック、さらには虚血などの代謝ストレスによる細胞内の AMP の濃度上昇により活性化される分子として知られている(14)。AMPK の標的としてはコレステロール合成に関わる HMG-CoA reductase、脂肪酸合成に関与する Acetyl-CoA carboxylase、タンパク合成に関わる mTOR(mammalian target of rapamycin)を制御する TSC1/2(tuberous sclerosis complex)複合体など多岐にわたることが明らかとなっている(Fig.1)。なお、AMPK の活性化には上流に位置する AMPKK からのシグナルが必須であり、また AMP が調節サブユニット γ に結合することで

AMPK 全体の構造を変化させ上流の AMPKK との相互作用を容易にするという機構により AMPK の活性は制御されていると考えられている (15)。

AMPK ファミリーの多くをリン酸化し活性制御する AMPKK として LKB1 がある (16)。この分子はその欠損により遺伝性腫瘍症候群 (Peutz-Jeghers syndrome) が発症することが知られているがん抑制遺伝子であり STRAD、MO25 といった分子とヘテロ三量体を形成することで初めて機能を発揮することが知られている (17)。また、AMPKK としてはその他に CaMKK が知られており、AMPK の生理的機能が多岐に渡ることを示唆していると考えられる (18) (Fig.1)。

ARK5 は他の AMPK と異なり Akt のリン酸化モチーフを持っており、Akt からのシグナルによって初めて活性化される分子である (13)。Akt は細胞内シグナル伝達系において細胞の生存シグナルの制御を中心的に司るキナーゼであり、その活性は一般的に細胞膜上にあるレセプター型チロシンキナーゼから PI3K、PDK-1 を経るシグナルにより制御されていることが知られている (19)。我々の研究室では、グルコース飢餓耐性の強い細胞株では Akt の発現量が多く、弱い細胞株では発現量が少ないという傾向を見出しており、さらに Akt antisense を導入した膵臓ガン細胞株 Panc1 では耐性が解除されることも発見した (11)。また、AMPK- α サブユニットの antisense を膵臓ガン細胞株 Panc1 および AsPC-1 に導入することによりグルコース飢餓耐性が解除されることを見出した。つまり、栄養飢餓耐性は Akt、AMPK の2つが重要な役割をしており、ARK5 は Akt の下流分子としてそのシグナルを下流に伝えると同時に、AMPK の一種としても栄養飢餓耐性にとって重要な役割を果たしている、いわばこれら2つの経路の接点となりうる分子であると考えられた (13) (Fig.2)。

さらに、その後の研究により ARK5 が従来の AMPK とは全く異なる作用機序で飢餓耐性に寄与していることが示唆された。従来の AMPK はコレステロールや脂肪酸合成といった ATP 消費経路を抑制し、脂肪酸酸化や糖分解といった ATP 合成経路を促進してエネルギー不足を補うことが知られている (20) (21)。ところが、ARK5 を過剰発現した Panc1 において ARK5 の機

能抑制を行うと、IGF-1により誘導される mTOR のリン酸化が抑制されたことより、ARK5 は Akt の下流で mTOR を活性化することが明らかとなった (22)。このことは mTOR がタンパク合成を促進する分子であることを考慮すると、ARK5 が従来の AMPK とは異なり ATP を積極的に消費することで栄養飢餓状態に応答していると考えられた。なお、AMPK は TSC1/2 を介して mTOR を抑制していることが知られている (Fig.3)。つまり、Akt と AMPK は mTOR を介して ATP の消費経路であるタンパク合成のバランスを取っており、Akt から mTOR へのシグナルを仲介する分子として ARK5 が存在しているのではないかと考えられた (Fig.3)。ARK5 と AMPK α が栄養飢餓状態においてタンパク合成のバランスをとっているというモデルは、AMPK α の機能抑制による飢餓耐性解除が ATP 欠乏下における ATP 消費経路を抑制できなくなることに起因するという考えにもつながる可能性を秘めていて大変興味深い (Fig.1)。

そこで、本研究では ARK5 と AMPK- α を同時に抑制することで栄養飢餓状態におけるタンパク合成のバランスを保った状態での飢餓耐性を解析することにより、飢餓耐性におけるタンパク合成経路の抑制の重要性について検証し、さらには AMPK α の栄養飢餓耐性への作用機序について理解を深めることを目的とした。

また、我々の研究室では栄養飢餓により Akt のリン酸化レベルが一過的に上昇することを以前より見出している。Akt が細胞内のシグナル伝達系として細胞生存の中心的な役割を担っていることを考えると、さらに栄養飢餓選択的に細胞毒性を示す薬剤の多くがこの Akt のリン酸化の上昇を抑制していることを考慮するとこのリン酸化が飢餓耐性に関与している可能性が十分にある。そこで、本研究では栄養飢餓による Akt のリン酸化の上昇の要因について解析していき、その知見を基に飢餓耐性解除の標的分子を検討していくことも目的とした。

II : 材料と方法

1. 培養細胞及び培養条件 試薬、抗体

本研究では、膵がん細胞株 PANC1、乳がん細胞株 MCF7、大腸がん細胞株 DLD1, SW480、肺がん細胞株 A549、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa、ヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293T の計 7 細胞株を用いた。7つの細胞株は ATCC(American Type Culture Collection)から購入した。各細胞は 1×MEM non-essential amino acid solution(Sigma), 1×Antibiotic antimycotic solution (Sigma), 10% Fetal bovine serum(Cell Culture Technologies, Cansera international Ink., Canada), 3.7g/L sodium hydrogen carbonate, 25mmol/L HEPES-KOH (pH 7.4)を Dulbecco's modified Eagle's medium(Sigma)に加え調整した培地で培養した。培地は 3 日ごとに交換し、コンフルエンス前に trypsin 処理により継代した。インキュベーター内は常に 37℃、CO₂ 濃度 5%、大気 95%、湿度 100%に保った。

各細胞をグルコース飢餓処理する際は、1×MEM non-essential amino acid solution, 1×antibiotic antimycotic solution, 4mmol/L L-glutamine(Sigma), 1mmol/L pyruvic Acid ·Na, 25mmol/L HEPES-KOH(pH 7.4), 10% fetal bovine serum を DMEM-base(Sigma)に加え調整した培地で培養し、血清はセルロース膜により PBS(8g/L NaCl, 1.15g/L Na₂HPO₄, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄)で 7 2 時間透析した後、試験紙 (ライフスティック ; マイルス・三共株式会社)によりブドウ糖の除去を確認した後使用した。インキュベーター内は常に 37℃、CO₂ 濃度 5%、大気 95%、湿度 100%に保った。

2. 試薬

Compound C は(Calbiochem)から購入した。DMSO に 2mmol/L の濃度でストック溶液を作製し、20µmol/L の最終濃度で使用した。LY294002 は(Calbiochem)から購入した。DMSO

に 50mmol/L の濃度でストック溶液を作成し、10 μ mol/L の最終濃度で使用した。Rapamycin は(Calbiochem)から購入した。milliQ に 100 μ mol/L の濃度でストック溶液を作成し、50nmol/L の最終濃度で使用した。

3. Survival Assay

細胞株 7 種全てにおいて DMEM 培地を用いて 2×10^5 個の細胞を 6-well プレートに撒き、37 $^{\circ}$ C、95%空気、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、個々の細胞は PBS で一度洗い、培地を新しい DMEM、グルコース欠乏培地各々のインキュベーション時間経過後、個々の細胞を再び PBS で一度洗い、200 μ l のトリプシンで処理した。その後 300 μ l の培地で懸濁し、1500rpm で 3 分間遠心分離し、上清廃棄後 300 μ l の培地で懸濁した。懸濁液を 50 μ l 採取し、50 μ l の Trypan Blue stain 0.4%(Gibco)により染色した後、血球計算盤上で生細胞、死細胞をカウントした。生細胞数を生細胞数と死細胞数の和に対する割合を生存率とし、グラフにプロットした。

また、薬剤による細胞毒性の濃度依存性を検討する際には、DMEM 培地を用いて 96well plate に 5×10^3 cells/well で細胞を撒き、37 $^{\circ}$ C、95%空気、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、個々の細胞は PBS で一度洗い、培地を新しい DMEM、またはグルコース欠乏培地に変え、薬剤を各濃度で加えた。各々のインキュベーション時間経過後、再び PBS で洗い、10% WST-8(Cell Counting Kit-8、Dojindo)入り DMEM を 100 μ l ずつ各 well に添加した。1 時間培養し、460nm で吸光度を測定した。

4. RT-PCR

各細胞からの Total RNA の調整は ISOGEN(Wako,Tokyo)を用いた。1st cDNA の合成に AMV transcriptase(Takara Bio Co,Ltd.)を用い、0.5 μ g の total RNA を含む 10 μ l の反応液で逆転写反応を行った。ARK5 および LKB1 の mRNA の検出では、Random 9mer を用い

た。30℃ 10分インキュベートした後、55℃ 30分、99℃ 5分、5℃ 5分の反応を1サイクルで行うことで逆転写反応を行い、これを cDNA サンプルとした。全ての PCR 反応は LA PCR Kit(Takara) を用いて行った。ARK5 mRNA の検出は、ARK5F:GAGTCCACTCTATGCATC、ARK5R:ATGTCCTCAATAGTGGCC のプライマーセットを用い、翻訳領域(+2022~+2279)を増幅することで発現確認を行った。LKB1mRNA の検出は LKB1F:ACCCTCAAAATC TCCGACCTG、LKB1R:GACCCGTGGTGATGTTGTAGA のプライマーセットを用い、翻訳領域(+1681~+1869)を増幅することで発現確認を行った。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の発現を GAPDHF:GAGTCAACGGATTTGGTCGT、GAPDHR:GACAAGCTTCCCGTTCTCAG のプライマーセットで確認した。全ての PCR の反応条件は 94℃ 2分に変性させた後、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 1分の反応を 30 サイクルで行った。

5. タンパク質抽出

ウェスタンブロット解析のため、各条件下で培養細胞から抽出液を作成した。Sample buffer:10%SDS、100mM Tris-HCl(pH7.4)、10mM Na₃VO₄を 1.5ml エッペンドルフチューブ内で混合した。シャーレ内のメディアウムを吸い取り、培養時メディアウムの半分量 PBS で2回洗った後、Sample buffer を 80μl 添加し、セルスクレーパーで細胞を集めた。酵素を失活させるため、100℃、3分間インキュベーションした後、-80℃で保存した。使用時室温で溶かし、超音波細胞破碎機(ASTRASON)で 10 秒程度超音波処理したものを 25℃、15000rpm、10 分間遠心を行い、その上清をサンプルとして使用した。1mg/ml BSA を標準とし、BCA Protein Assay Kit(Pierce)を用いて各サンプルのタンパク質濃度を定量した。

6. SDS-PAGE 法

サンプルに SDS gel loading buffer(50mM Tris-HCl(pH6.8)、2%SDS、10%glycerol、

100mM DTT、0.1% bromophenol blue)を加え、100℃、3 分間反応を行った。SDS-PAGE バッファー(15g/L Tris、94g/L glycine、0.5% SDS)を適量満たした泳動装置に6%、10%、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルをセットした後、サンプルをタンパク質濃度が一定になるように添加した。マーカー(BIO-RAD、DualColor)は5 μ l 添加した。電気泳動は、ゲル1枚当たり定電圧80Vで約1時間行った。

7. ウェスタンブロット法

泳動後のゲルをゲル板からはずし、Transfer buffer(3g/L Tris、14.4g/L glycine、5% MeOH)、あるいは高分子量用 Transfer buffer(10mM CAPS(pH11)、10% MeOH)中で30分振とうさせた。Immobilon-P トランスファーメンブレン(MILLIPORE)は親水化のため MeOH 中で1分間、Transfer buffer 中で30分間振とうした。セミドライプロット装置(ATTO 社製)を用い、陰極側にゲル、陽極側にメンブレンを置き、Transfer buffer で湿らせたろ紙で挟むようにし、1.3 mA/cm²で80分間、転写を行った。転写後、ブロッキング液(5% skim milk、in TBST(0.05M Tris HCl(pH7.5)、9g/L NaCl、0.1% Tween20))に浸し、室温で1時間(あるいは4℃で over night) 振とうした。一次抗体として抗 Akt Antibody、抗 Phospho-Akt(Ser473)Antibody、抗 TSC2 Antibody、抗 Phospho-TSC2(Thr1462)Antibody、抗 mTOR Antibody、抗 Phospho-mTOR(Ser2448) Antibody、抗 S6K1 Antibody、抗 Phospho-S6K1(Thr389) Antibody、抗 4EBP1 Antibody、抗 Phospho-4EBP1(Thr37/46) Antibody、抗 AMPK α Antibody、抗 Phospho-AMPK α (Thr172) Antibody、抗 FKHL1 Antibody、抗 Phospho-FKHL1(Thr32) Antibody、抗 ARK5 Antibody、抗 Actin Antibody をブロッキング液で各々1000倍希釈して用いた。抗体との反応は室温で1時間、あるいは4℃で over night 振とうしながら行った。抗体は Actin が SantaCruz 社製、その他は Cell Signaling 社製。TBST で10分間 \times 3回振とうした。二次抗体として anti rabbit IgG HRP(Cell Signaling)をブロッキング液で2000倍希釈し室温で1時間振とうしながら反応させた。

TBST で 10 分間×3 回振とうした後、メンブレンに ECL-western blotting detector(Amershem Bioscience)あるいは ECL-western blotting detector plus(Amershem Bioscience) を 0.125ml/cm² で添加し、1 分間あるいは 5 分間反応させ、ECL-Hyperfilm(Amershem Biosciences)とともに現像カセットにセットした後、30 秒~30 分間露光した後現像し、解析を行った。

8. siRNA トランスフェクション

Panc1 細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells/well で DMEM を用いて撒き、37°C、95%空気、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、1.5ml エッペンドルフチューブ内で 1.25μM siRNA、12% HiPerFect Transfection Reagent(QIAGEN)となるように血清を含まない DMEM 中で混合し、室温で 7 分間反応させる。その後、形成したリポソームを siRNA の最終濃度が 5nM となるように細胞の培養液に滴下し、37°C、95%空気、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、PBS で一回洗った後、DMEM 培地あるいはグルコース欠乏培地で培養した。

【使用機器】

吸光度計 : SPECTRA MAX 190	(日本モレキュラーデバイス)
倒立顕微鏡 : ニコン倒立型顕微鏡	(Nikon)
ヒートブロック : Dry Thermo Unit DTU-1B	(TAITEC)
遠心機 : HighSpeedRefrigeratedMicroCentrifuge MX-160	(TOMY)
超音波細胞破壊機 : ULTRASONIC PROCESSOR XL	(ASTRASON)
電気泳動装置 : CM-2003	(シーマバイオテック株式会社)
セミドライプロットティング装置 : ELECTROPHORESIS	(ATTO)
現像機 : X-RAY FILM PROCESSOR TCX-101	(Konica)

Ⅲ：実験結果

I：細胞株における LKB1、ARK5 および AMPK- α の発現および飢餓耐性との関連

細胞株における LKB1、ARK5 および AMPK- α の発現パターンを調べるため、RT-PCR およびウェスタンブロットングを行った。通常培地中で培養した細胞から RNA を抽出し、cDNA を作製し PCR を行った結果、Panc1, MCF7, SW480, DLD1, HEK293T の 5 つの細胞株で LKB1 mRNA の恒常的発現が認められた(Fig.4A)。また、Panc1, SW480, DLD1 の 3 つの細胞株で ARK5 mRNA の恒常的発現が認められ、さらに Panc1, SW480 の 2 つの細胞株で ARK5 タンパクの恒常的発現が認められた。なお、AMPK- α タンパクの発現は 7 つの細胞株すべてで同程度に認められた。次に、LKB1 のグルコース飢餓環境下におけるシグナル伝達への寄与を解析するために、それぞれの細胞株においてグルコース飢餓に晒してからのシグナル伝達を解析した。すると、LKB1 の発現パターンとグルコース飢餓による AMPK- α のリン酸化のパターンに相関があることが確認された(Fig.4B)。しかし、Akt に関してはリン酸化が上昇するもの、定常状態でリン酸化レベルの高いものと細胞株によって違いが認められたものの、LKB1 の発現パターンと Akt のリン酸化パターンには相関が見られなかった。さらに、ARK5 および LKB1 の発現とグルコース飢餓耐性との関連を検討するため、各処理時間における細胞株の生存率をトリパンブルー染色により求めた。その結果、Panc1, SW480, DLD1, HEK293T が 48 時間以降も高い生存率を示し、極めて強いグルコース飢餓耐性が認められた(Fig.4C)。次いで MCF7, HeLa が 48 時間で 50%程度の生存率を示し、顕著なグルコース飢餓耐性が認められなかった。A549 に関しては 48 時間までに顕著な細胞死を示し、グルコース飢餓耐性が認められなかった。これらのことより、通常培地時の ARK5 の発現パターンとグルコース飢餓耐性の相関は見られなかった。一方、LKB1 の発現パターンとグルコース飢餓耐性能の相関が見られ、LKB1 の遺伝子発現がグルコース飢餓耐性能に関与している可能性が示唆された。しかし、LKB1 の発現パターンとグルコース飢餓耐性能

は完全に一致するわけではなかった。

II : Panc1 細胞での AMPK とグルコース飢餓適応反応との関連

II - 1 : LKB1 の遺伝子発現抑制によるグルコース飢餓適応反応への影響

数種の細胞における発現及びリン酸化の程度を比較したのでは、他の多くの因子が異なるための影響を無視できない。そこで飢餓耐性を示す Panc1 細胞を用いて解析をすることとした。LKB1 の発現パターンとグルコース飢餓耐性能との間に相関があることが示唆されたので LKB1 に対する RNAi による遺伝子発現抑制を Panc1 細胞において行うことによって、LKB1 のグルコース飢餓耐性へ寄与について解析した。まず、LKB1 の siRNA 2 種類で遺伝子発現抑制ができるかどうかを検討した。すると、いずれの siRNA も高いレベルで遺伝子発現抑制能があり、かつ non-silencing siRNA(NS)では発現抑制が起きていないことよりこの発現抑制が LKB1 選択的に起こっていることが確認できた(Fig.5A)。そこでこの内の#5 の siRNA を用いて検討を行ったところ、LKB1 の発現抑制をしたものは、通常培地中でも多少の細胞死が見られたもののグルコース飢餓選択的に細胞死が見られ(Fig.5B)、LKB1 がグルコース飢餓耐性に寄与することが示唆された。また、LKB1 が AMPK の上流であることを考えると AMPK α が飢餓耐性に関わるという以前の結果とよく一致する。

II - 2 : AMPK の阻害剤によるグルコース飢餓耐性への影響

LKB1 の遺伝子発現抑制によりグルコース飢餓耐性が部分的に解除できることがわかったので、AMPK ファミリー全体の阻害剤である CompoundC(CC)により同様にグルコース飢餓耐性が解除できるかどうかについて検討した。すると、CC を添加することによりグルコース飢餓耐性を

解除することが確認でき、AMPKファミリーがグルコース飢餓耐性に関与することが明らかとなった(Fig.5C)。また、細胞毒性にグルコース飢餓選択性があることが確認された。なお、このことは Cell counting Kit-8 を用いた解析によっても確認できる(Fig.5D)。このことより、LKB1はAMPKファミリーの活性化を通じてグルコース飢餓耐性に関与すると考えられた。

III : グルコース飢餓耐性における mTOR 経路の役割

グルコース飢餓耐性に関与する因子の1つとしてAMPKが知られているが、AMPKのグルコース飢餓耐性への寄与のメカニズムについてはほとんど解明されていない。そこで、タンパク合成において重要な役割を果たすmTOR経路をAMPKが抑制することがグルコース飢餓耐性において重要であるという仮説を立てその検証を行った(Fig.7)。そこで、膵がん細胞株 Panc1 においてPI3K経路の阻害剤であるLY294002およびAMPKの阻害剤であるCompoundCをそれぞれ単独で添加した場合、および両方を同時に添加した場合における細胞死の割合を解析した。もし、AMPK α によるグルコース飢餓耐性の作用機序がmTOR経路の抑制を介したものであるとすると、Aktのみを阻害した場合はAktによるmTORの活性化シグナルが伝わらないことよりAMPKによるグルコース飢餓耐性能が増強され、AktとAMPKを同時に抑制した場合にその耐性能が解除されることにより顕著に飢餓耐性が解除されることが予想された。また、この仮説はエネルギー不足の栄養飢餓状態でのみ成り立つと考えられるので、顕著な細胞死はグルコース飢餓選択的であると考えられた。しかし、実際にはグルコース飢餓環境下で24時間経過後において、LY294002とCompoundCを両方添加した場合には60%程度の細胞死が見られたことより顕著な細胞死が確認されたが、通常培地中でも40%程度の細胞死が見られその毒性にグルコース飢餓選択性は認められなかった。(Fig.8)。よって、AMPK α によるグルコース飢餓耐性への寄与においてmTOR経路の抑制が重要な役割を果たしていないことが示唆された。

IV : グルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化の要因の解析

グルコース飢餓環境下でのシグナル伝達の解析を TSC2/mTOR 経路に関して行ったところ、Panc1、MCF7 2 種類の細胞株において、グルコース飢餓ストレスにより S6K1 の顕著な不活性化が見られた(Fig.8A)。S6K1 は TSC2/mTOR の下流に位置する分子であるが、IRS-1 を介して PI3K/Akt 経路にネガティブ・フィードバック機構を持つことが近年明らかにされた [24] (Fig.3)。このことより、グルコース飢餓において S6K1 の不活性化が起こることにより IRS-1 を介したネガティブ・フィードバックが解除されることが、グルコース飢餓による Akt のリン酸化の上昇の要因であると考えられた。

そこで、S6K1 の上流因子である mTOR の活性を rapamycin により阻害をし、S6K1 の活性を抑制した状態でグルコース飢餓環境下でのシグナル伝達の解析を行った。もし、S6K1 の不活性化がグルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化の上昇に寄与するのならば、S6K1 の抑制により Akt が持続的に活性化され、その後グルコース飢餓に晒しても Akt のリン酸化が変化しないことが予想された。まず、rapamycin により S6K1 の活性が抑制されているのが確認できた (Fig.8B)。また、rapamycin 添加により一過的な Akt のリン酸化の上昇するという、S6K1 の活性が持続して抑制されていることを考慮すると矛盾する結果を得た (Fig.8B)。なお、rapamycin を前処理することで S6K1 のリン酸化が顕著に減少することが認められたため、rapamycin で前処理した上でグルコース飢餓環境下に晒すことにより、グルコース飢餓による短時間の S6K1 の不活性化がグルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化の上昇に寄与するかどうかについて解析した。その結果、rapamycin 処理によりグルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化の程度が小さくなることより、IRS-1 を介した S6K1 のネガティブフィードバックの解除がグルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化の上昇に部分的に寄与することが示唆された。

V : 膵がん細胞株 Panc1 におけるグルコース飢餓適応反応の新規経路

膵がん細胞株 Panc1 においてグルコース飢餓適応反応の解析を TSC2/mTOR 経路を中心に行った。すると、グルコース飢餓環境下においてから 6 時間後をピークに Akt のリン酸化の上昇がみられ、24 時間後には定常状態まで戻ることが明らかとなった(Fig.9)。また、Akt のリン酸化の上昇に応じて下流の TSC2、mTOR、S6K1 のリン酸化が誘導されることが確認できた。このことは TSC2/mTOR 経路においてこれまで提唱されてきたモデルと一致するものであった(Fig.4)。しかし、その中で従来のモデルとは矛盾する現象も見られた。それは、グルコース飢餓環境下においてから 30 分後において mTOR のリン酸化が上昇するにも関わらずその下流の S6K1 のリン酸化が顕著に減少するというものであった(Fig.9)。というのも、従来のモデルでは栄養飢餓状態における AMPK による S6K1 の不活化が mTOR を介して行われることを考えると、グルコース飢餓による mTOR 非依存的な S6K1 の脱リン酸化は従来のシグナル伝達のモデルでは説明がつかないからであった。このことを裏付けるために、Panc1 細胞において LKB1 の遺伝子発現抑制をした状態でのグルコース飢餓環境下でのシグナル伝達を解析した。その結果、LKB1 の発現抑制によりグルコース飢餓による AMPK のリン酸化の上昇が見られなくなったが、依然として S6K1 の不活化を受けることがわかった(Fig.10)。よってグルコース飢餓によるこの S6K1 の脱リン酸化が mTOR 非依存的であることが明らかとなり、グルコース飢餓環境下における新規のシグナル伝達の経路の存在が示唆された(Fig.11)。さらに AMPK の活性化と mTOR のリン酸化にも、少なくともこの細胞では関連がないことがわかった。

IV : 考察

今回の研究はグルコース飢餓耐性に関与する因子群の統合的理解を目的としたものであり、本研究を通じてグルコース飢餓耐性に関与する因子群の作用機構について理解を深めることが出来た。また、従来のシグナル伝達経路では説明のつかない新規経路の存在を示唆するデータを得ることが出来た。

グルコース飢餓耐性に関与する因子群の解析において、従来の知見では Akt、ARK5、AMPK α がグルコース飢餓耐性に関与する因子として知られていた [11] [12] [13]。AMPK α は飢餓状態において TSC2 を介して mTOR の活性を抑制し、タンパク合成を抑制することが知られている [23]。それに対し、ARK5 は IGF-1 による mTOR への活性化シグナルを媒介する遺伝子として知られており [22]、栄養飢餓状態において Akt からシグナルを受け mTOR へ活性化シグナルを送る働きをされると考えられている。また、アミノ酸飢餓下では mTOR を介したタンパク合成シグナルストップすることが知られており、そのことにより栄養飢餓環境下でのエネルギーバランスをとっていると考えられている [25]。つまり、AMPK α は mTOR を介してタンパク合成という ATP 消費経路の抑制することにより栄養飢餓状態におけるエネルギーバランスを取っており、このエネルギーバランスの破綻が AMPK α の機能抑制による飢餓耐性解除の要因であるという可能性が考えられた。この仮説が正しいとすれば、AMPK α と同時に ARK5 の機能抑制をした場合には、エネルギー欠乏状態における ARK5 から mTOR への過剰なタンパク合成シグナルが伝わらないために顕著な飢餓耐性解除が見られないことが予想された。そこで、AMPK ファミリー全てをリン酸化する AMPKK として知られる LKB1 の発現抑制時および AMPK のインヒビターである CompoundC の添加時におけるグルコース飢餓耐性能の解析を試みた。すると、いずれの場合においてもグルコース飢餓耐性が顕著に解除されることが確認された。よって、Panc1 細胞においては mTOR を介したタンパク合成のバランスの破綻が AMPK α の機能抑制によるグルコース飢餓耐性の解除の要因であるという当初の仮説は誤りであること

が示唆された。なお、LKB1 とグルコース飢餓耐性との関連では、肺癌細胞株においても LKB1 の発現の有無がグルコース飢餓耐性と相関があるという報告が近年されている [26]。このことは、グルコース飢餓耐性において AMPK が重要な役割を果たすということを裏付けるものであると考えられる。グルコース飢餓耐性における AMPK の作用機構に関連するものとしては、AMPK がグルコース飢餓環境下において脂肪酸酸化を通じてグルコース飢餓耐性に寄与するという報告がある [27]。また、AMPK が peroxisome-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) の活性化を通じてミトコンドリアの代謝系を活性化することによりエネルギー不足に備えるという報告もある [28]。その他にもグルコース代謝とアポトーシスが関連するという報告も近年いくつかなされている [29] [30] [31]。グルコース飢餓環境下においては解糖系および TCA サイクルが十分には回らなくなることにより細胞内の ATP が不足した状態になるが、おそらくこのエネルギー不足の状態を耐え抜くために AMPK が様々な経路を通じてエネルギーバランスを取ることがグルコース飢餓耐性には必要なのであろうと考えられる。

Akt においては、グルコース飢餓ストレスによるリン酸化の上昇は S6K1 の IRS-1 を介したネガティブ・フィードバックが寄与することが示唆された。なお、rapamycin による S6K1 による Akt のリン酸化の上昇が一過的であったことに関連することとして、rapamycin による mTOR の阻害が従来は mTORC1(mammalian target of rapamycin complex1) 選択的であると考えられているが、細胞によっては mTORC2(mammalian target of rapamycin complex2) の阻害もするという仮説がある [32]。もし、Panc1 細胞も rapamycin により mTORC2 の阻害が起こるとすると、mTORC2 が Akt のキナーゼであることよりつじつまがあう (Fig.12)。もしこの仮説が正しいとすると、今回の研究で得られた rapamycin の前処理によるグルコース飢餓に誘導される Akt のリン酸化の減少が、mTORC2 の阻害によるものである可能性が考えられた。そのため、グルコース飢餓による S6K1 の不活性化が Akt のリン酸化の上昇に寄与するかどうかの解析を行うには、S6K1 の遺伝子発現抑制下において同様の検討を行う必要があると考えられる。また、Akt の阻害剤である LY294002 によりグルコース欠乏培地において顕著な細胞死が認められたこ

とより、Akt がグルコース飢餓耐性に寄与することが確認できた。しかし、LY294002 はグルコース飢餓により誘導される Akt の活性化だけでなく、定常状態における低レベルの Akt の活性化も抑制することを確認しており、グルコース飢餓により誘導される Akt の活性化が飢餓耐性に必要であるかどうかについては今回の研究では明らかにすることができなかった。しかし、以前の研究において Akt の dominant negative form でグルコース飢餓耐性が阻害されることが示されており[13]、グルコース飢餓により誘導される Akt のリン酸化がグルコース飢餓耐性にとって必要であることを示唆している。ただし、活性型の Akt を導入することによりグルコース飢餓への感受性が増大するという報告もある[33]。Akt は細胞死関連遺伝子の抑制や細胞のグルコース取り込み能を上昇させることによりグルコース飢餓耐性を増強させる反面、エネルギー欠乏下では、エネルギーの産生と生存のためのエネルギー消費のバランスがきわめて微妙に維持される必要がある。積極的に ATP を消費するために過剰な活性化は細胞死をも誘導するという側面も持つのだろうと推測される。

また、Akt と AMPK の機能を同時に抑制した場合には、グルコース飢餓環境下で 24 時間経過後において顕著な細胞死が確認できたが、グルコース飢餓選択性が認められなかった。AMPK によるグルコース飢餓耐性への寄与が mTOR を介したタンパク合成の抑制に起因するものであるとすると、Akt のみを阻害した場合は Akt による mTOR への活性化シグナルが伝わらないため AMPK によるグルコース飢餓耐性能が増強され、Akt と AMPK を同時に抑制した場合にはその耐性能が顕著に解除されることにより顕著なグルコース飢餓選択的な細胞死がみられることが予想された。よって、AMPK のグルコース飢餓耐性が mTOR を介したタンパク合成の抑制によるものではないことが示唆された。しかし、LY294002 には高濃度では非特異的な毒性 (PI3K の阻害以外による毒性) も知られている。今後様々な濃度の薬剤を添加した場合における解析を行う必要があると考えられる。また、Akt と AMPK を同時に抑制した場合には、それぞれ単独に機能抑制した場合と比べより強いグルコース飢餓耐性解除効果を示すことが明らかとなった。しかし、今回の研究では阻害剤の併用により相加効果が見られるかどうかについては確認できな

かった。なお、相加効果が認められるとすれば、Akt と AMPK が共通の経路を通じてグルコース飢餓耐性に寄与することを示唆するものとなり大変興味深い。今後、より低濃度の阻害剤による検討を行うことにより明らかになるものと思われる。

グルコース飢餓適応反応における TSC2/mTOR 経路のシグナル伝達についても知見を深めることができた。それは、S6K1 が上流の mTOR 非依存的に短時間で顕著な不活化を受けるというものであり、この現象が IRS-1 を介したネガティブ・フィードバックを通じてグルコース飢餓による Akt のリン酸化の上昇に寄与することが明らかとなった。また、グルコース飢餓環境下でも 4EBP1 経由のタンパク合成経路が活性化されているというデータを得ることができた(Fig.9A)。このことは、栄養飢餓状態においては AMPK の活性化を通じて ATP を消費する経路を抑制することが知られているが、すでに報告されているような AMPK による TSC2 の活性化による Rheb の不活化を通じた mTOR の不活化によるタンパク合成の抑制という単純な解釈が成り立たないことをよく示している。つまり今回の研究で、mTOR 非依存的 S6K の制御を仮定しない限り説明がつかないことが明らかになった。

以上、今回の研究により栄養飢餓耐性に関与する経路が独立した形で複数存在する可能性が示された。また、S6K1 がグルコース飢餓ストレスにより mTOR 非依存的に不活性化を受けることが明らかとなった。栄養飢餓環境下では ATP 合成経路を促進し、ATP 消費経路を抑制するという機構により制御されていると従来は考えられていたが、それは個々の経路によってオン/オフが制御されるという非常に複雑な作用機構が働いているのではないかと推測される。これらの問題を明らかにするためには、グルコース飢餓や、アミノ酸の飢餓、及び酸素の欠乏をどのように細胞が検知しているのか、つまりセンサーの同定が最も重要であると考えられる。

Akt、AMPK を始めとする栄養飢餓耐性に関与する因子群においてより詳細な作用機構が解析されることとなれば、栄養飢餓選択的な細胞毒性を示す抗ガン剤の標的因子を同定する上で非常に有用な情報になると考えられる。その解析において、これらの因子のシグナル伝達の解析が必要であることはもちろんであるが、我々の研究室の持つスクリーニング方法によって得られた栄

養飢餓選択的な毒性を持つ薬剤の作用機構の解明というアプローチも非常に重要になると考えられる。今後、こうした解析が進むことで微小環境に基づいたガン特異的に作用する抗ガン剤の創出へと結びつくことが期待される。

V : Summary

As tumors grow, most of tumors are considered to fit in the environment of insufficient nutrient and oxygen supplies by forming new blood vessels in tumors. Nevertheless, actual human tumors, such as pancreatic cancers, don't have enough blood supply, partly because of insufficient angiogenesis and partly because of their extremely distorted histological architecture and as a result, they are subjected to chronic poverty of nutrient and oxygen. We therefore hypothesized that tolerance to nutrient deprivation as well as angiogenesis may be critical in some malignancies, including pancreatic cancers, and actually drew the data to support the idea. In this study, I consider a possibility that the factors which are known to relate with the tolerance to nutrient starvation, such as Akt, AMPK α , and ARK5, play a role in the tolerance mainly by controlling mTOR, which is thought to be in a downstream factor of Akt, ARK5, and AMPK α and is also known to control various adaptive responses under nutrient starvation. If this hypothesis is correct, it is predicted that when both of ARK5, which activates mTOR, and AMPK α , which inactivates mTOR, are inhibited, the tolerance of nutrient starvation is hardly diminished. But, when both of these are repressed, the tolerance of nutrient is markedly diminished. So, it becomes clear that these factors make a contributions in the tolerance in a mTOR independent manner. It also becomes apparent that the phosphorylation of Akt in glucose starvation is partly because of the rapid inactivation of S6K1 by glucose starvation, leading to release from negative feedback. Furthermore, this inactivation occurs in a mTOR independent manner. The existence of this pathway implies that protein synthesis pathways are regulated separately under glucose starvation.

謝辞

本研究を行うにあたり、立案、実施、発表に関し終始熱き御指導を頂いた国立がんセンター臨床開発センター江角浩安先生に厚く御礼申し上げます。

細部にわたり実験の御指導を頂いた同研究所がん治療開発部、土原一哉先生に心から感謝致します。

また、同研究所がん治療開発部の皆様には実験上様々な助言を頂き深く感謝いたします。

Fig.1

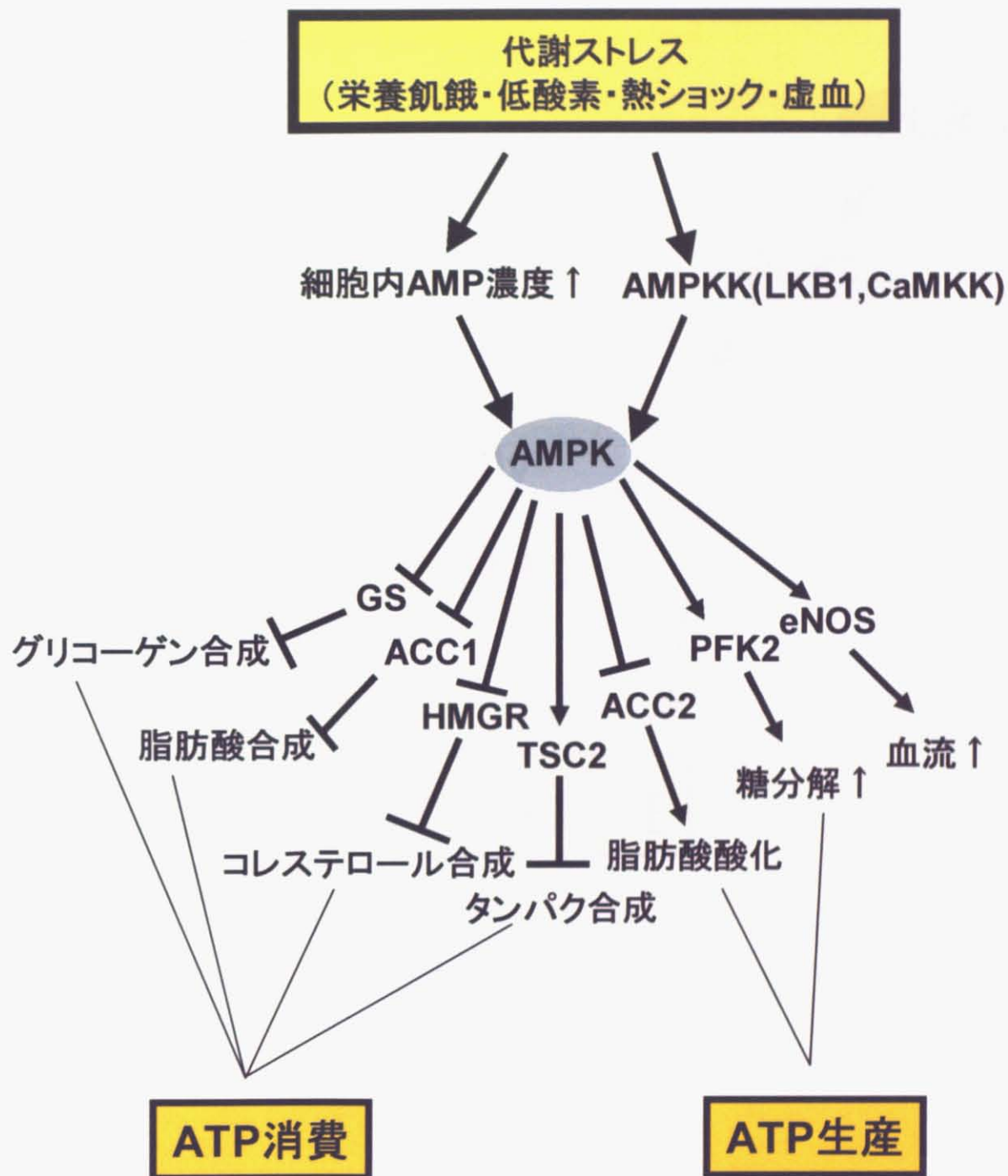


Fig.2

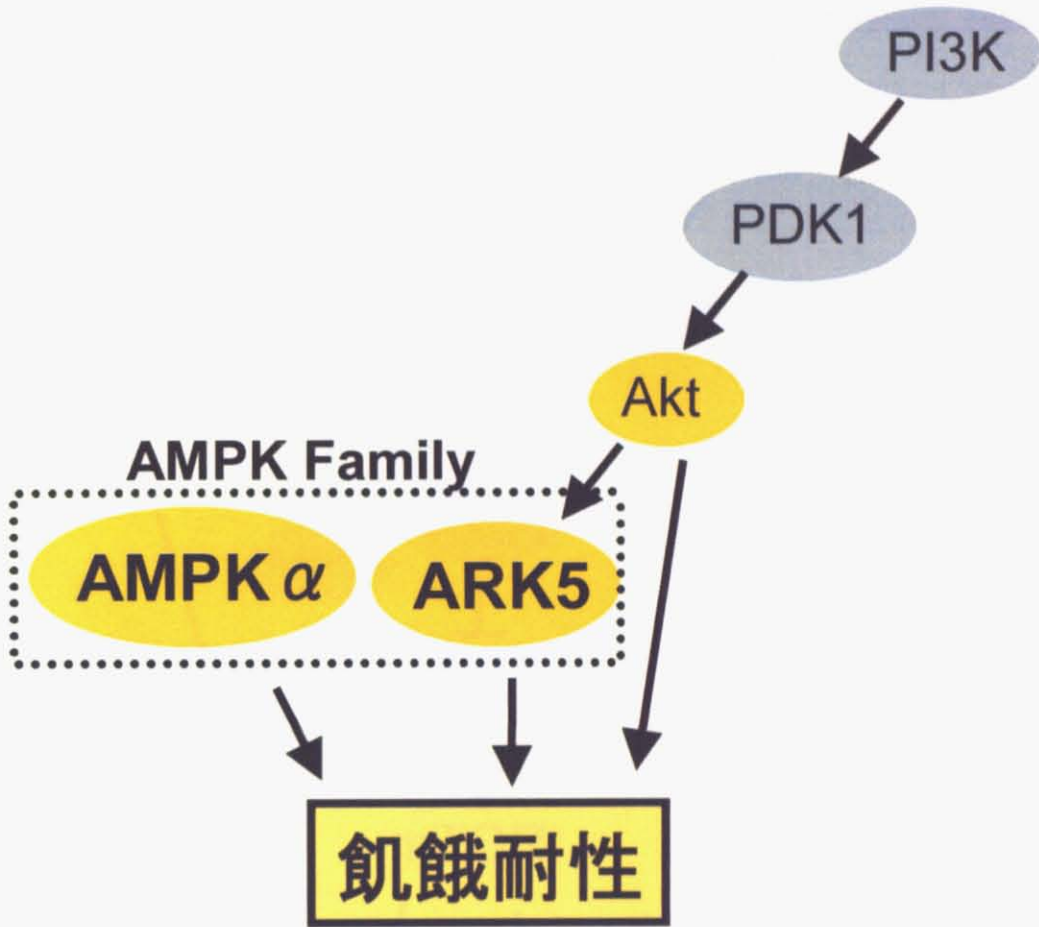


Fig.3

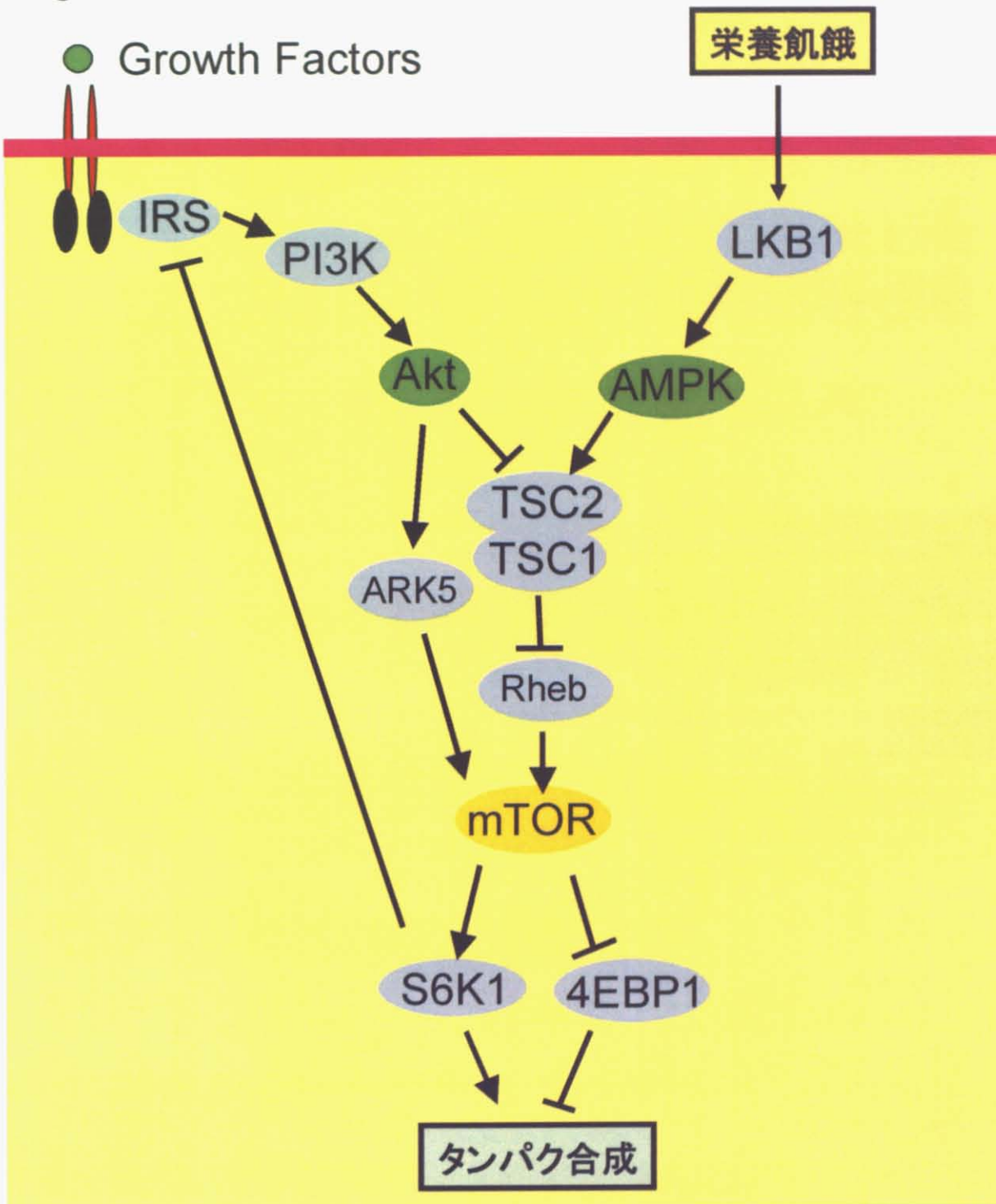


Fig.4

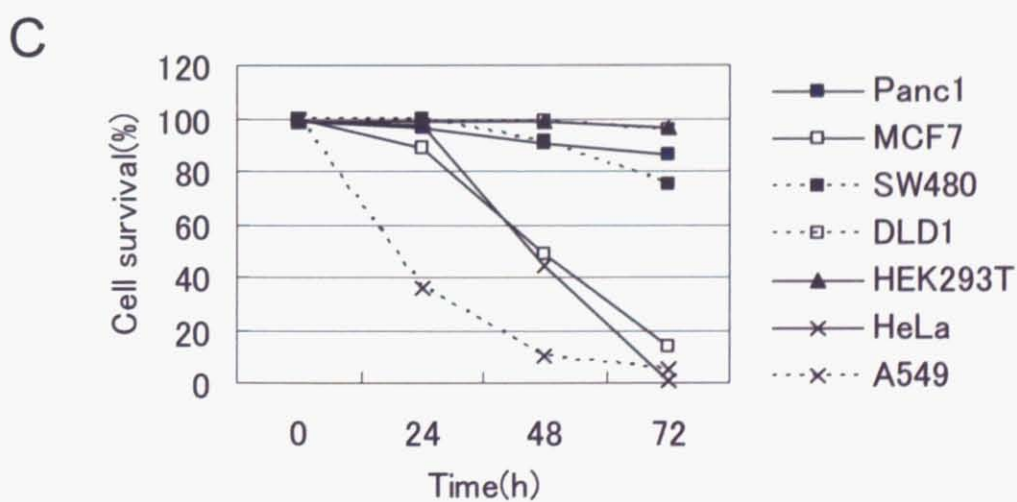
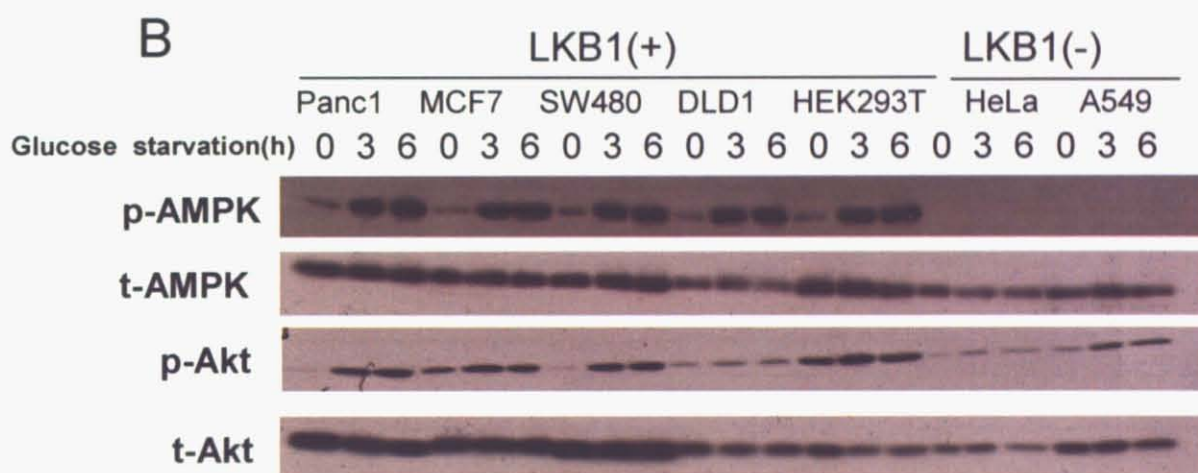
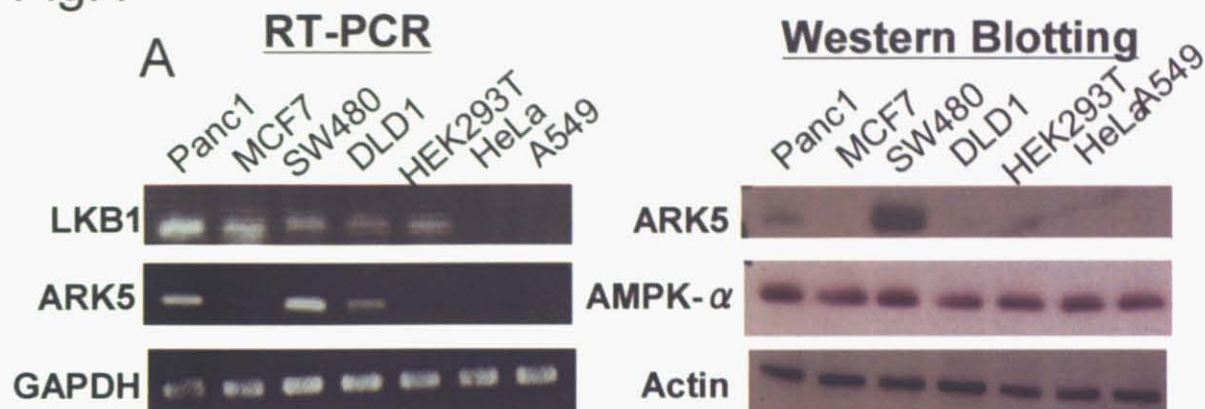
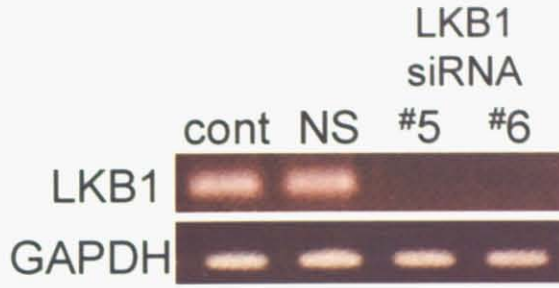
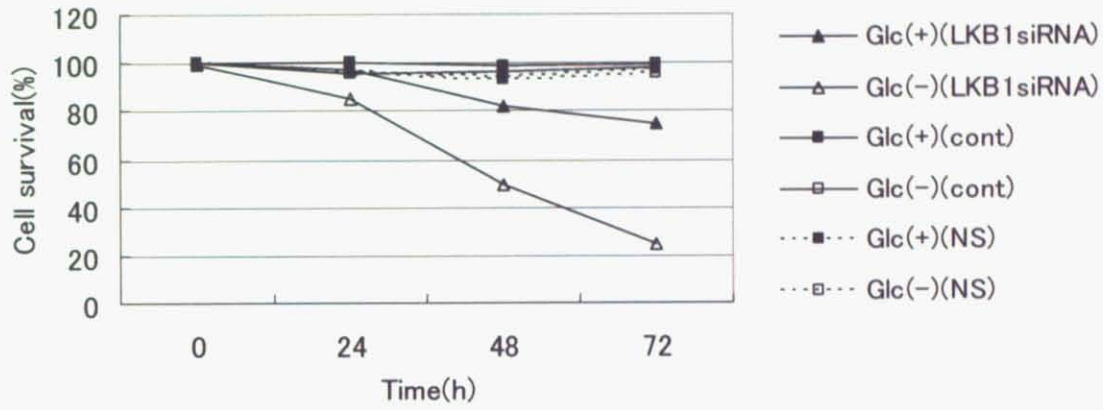


Fig.5

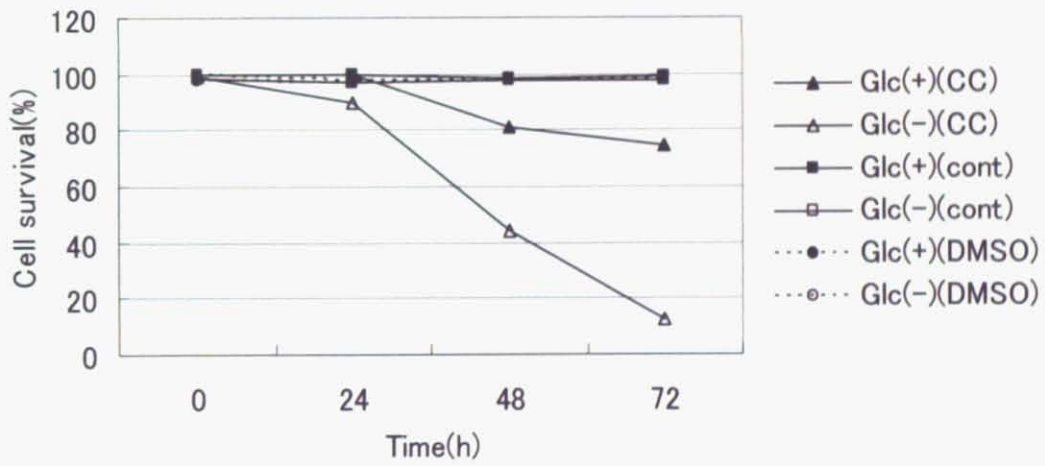
A



B



C



D

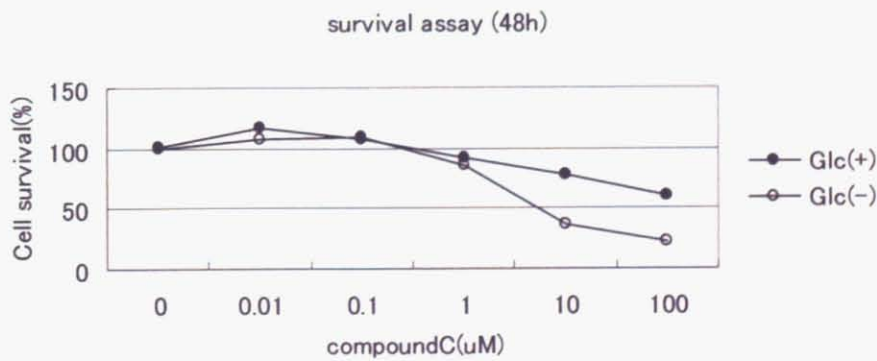


Fig.6

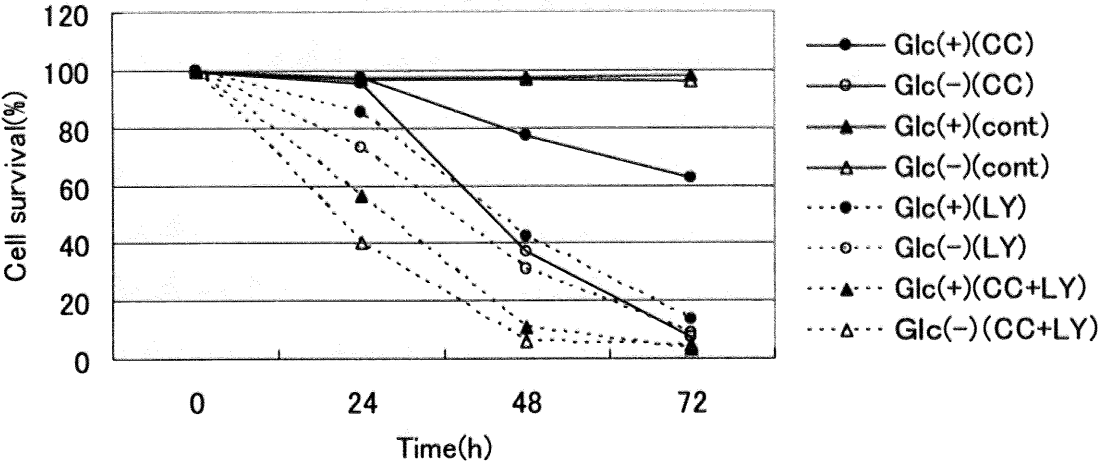


Fig.7

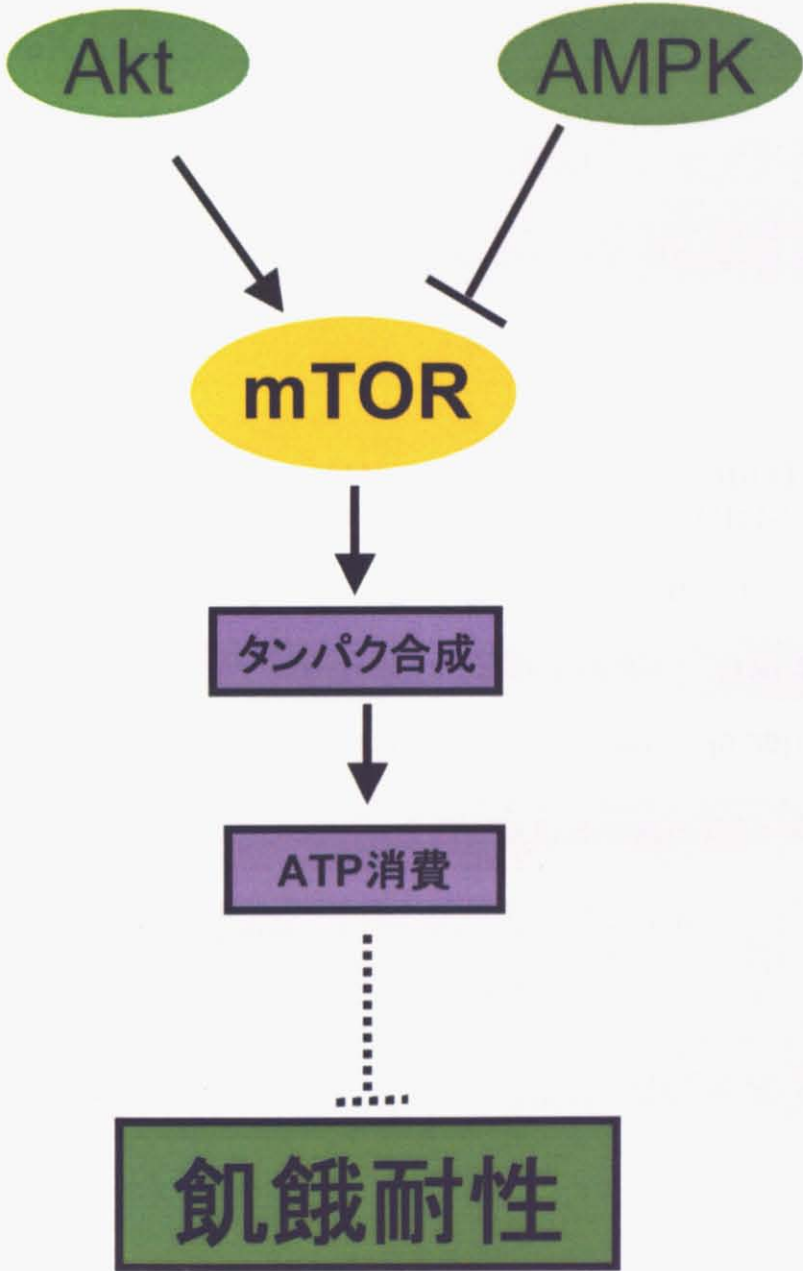
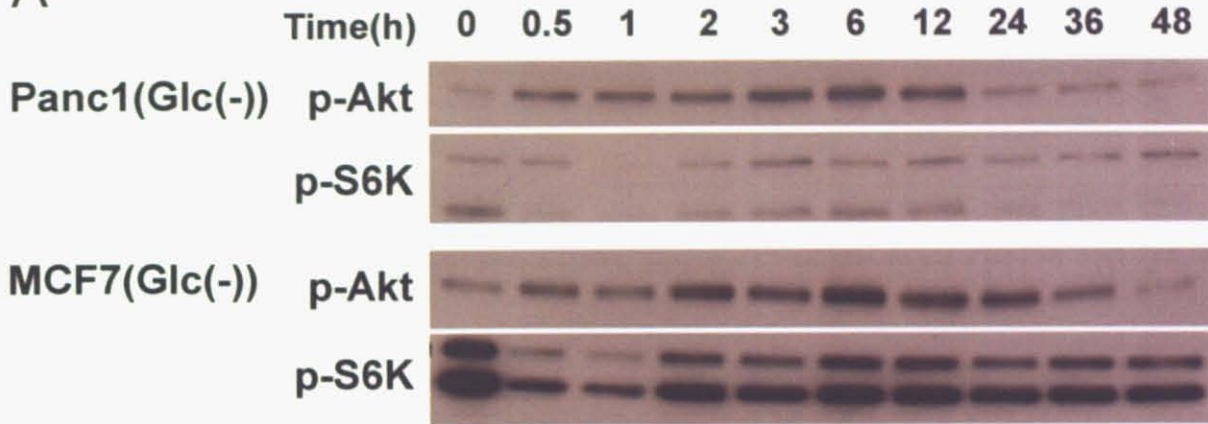


Fig.8

A



B

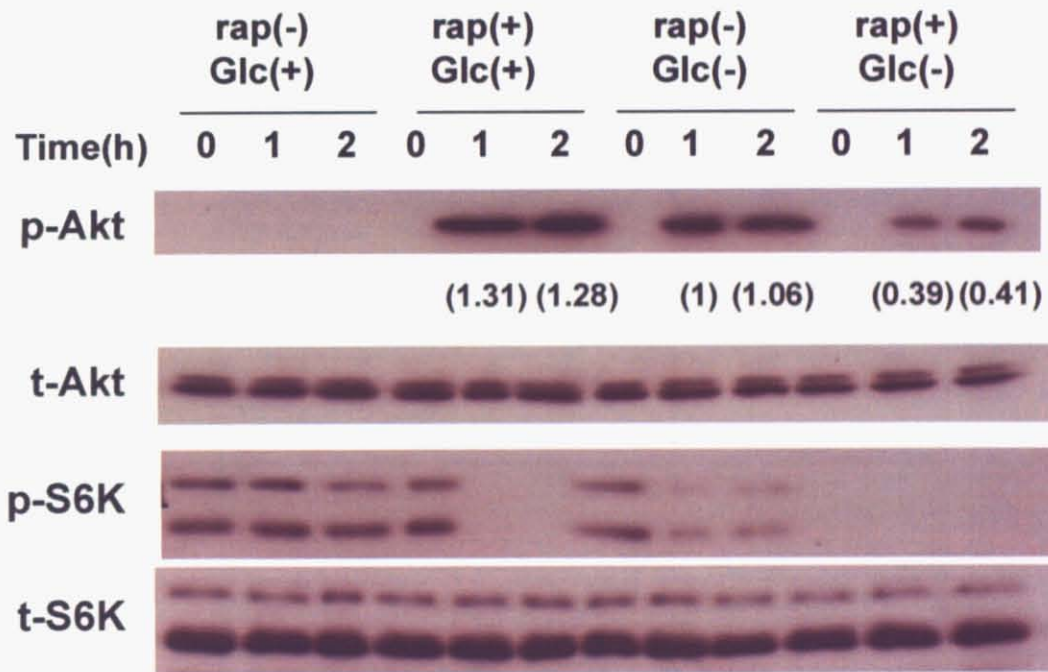
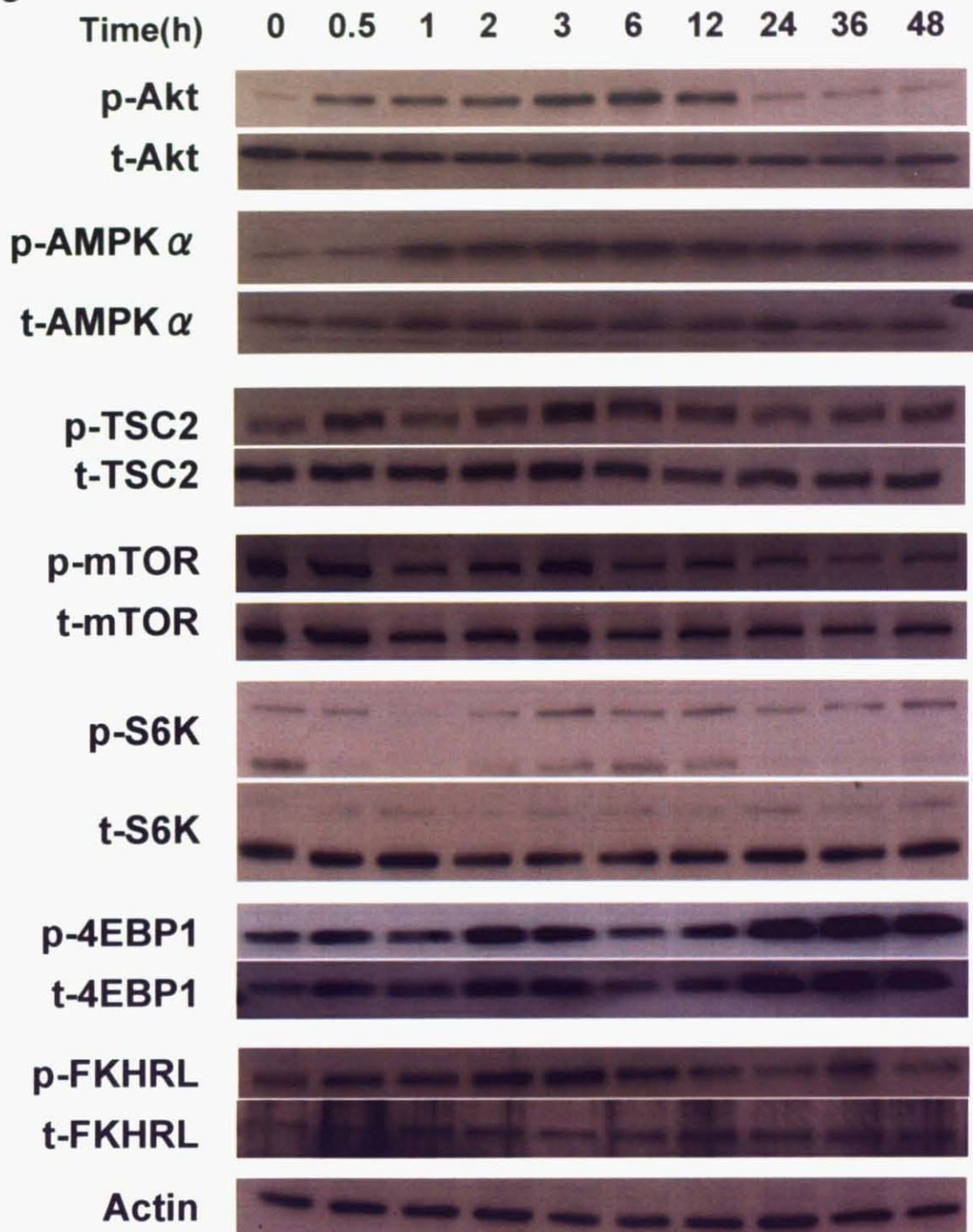
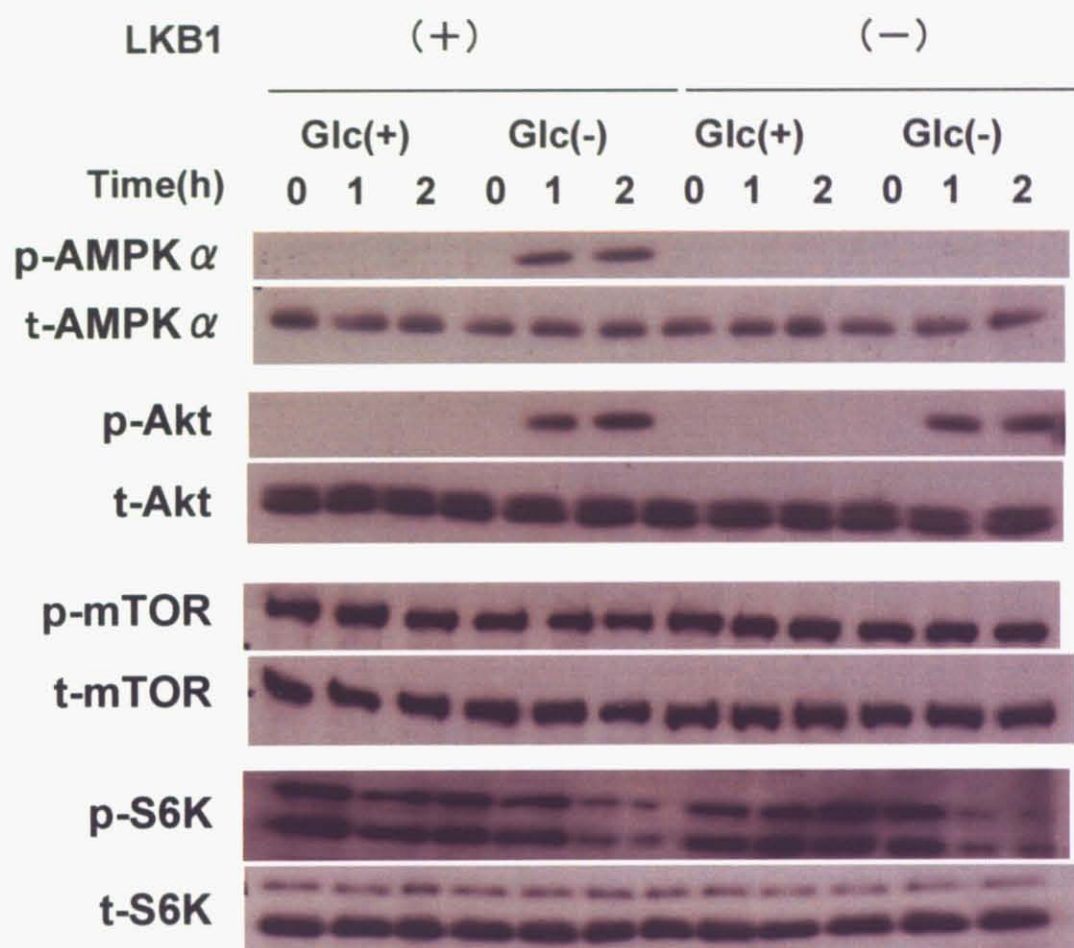


Fig.9



Cell:Panc1

Fig.10



Cell:Panc1

Fig.11

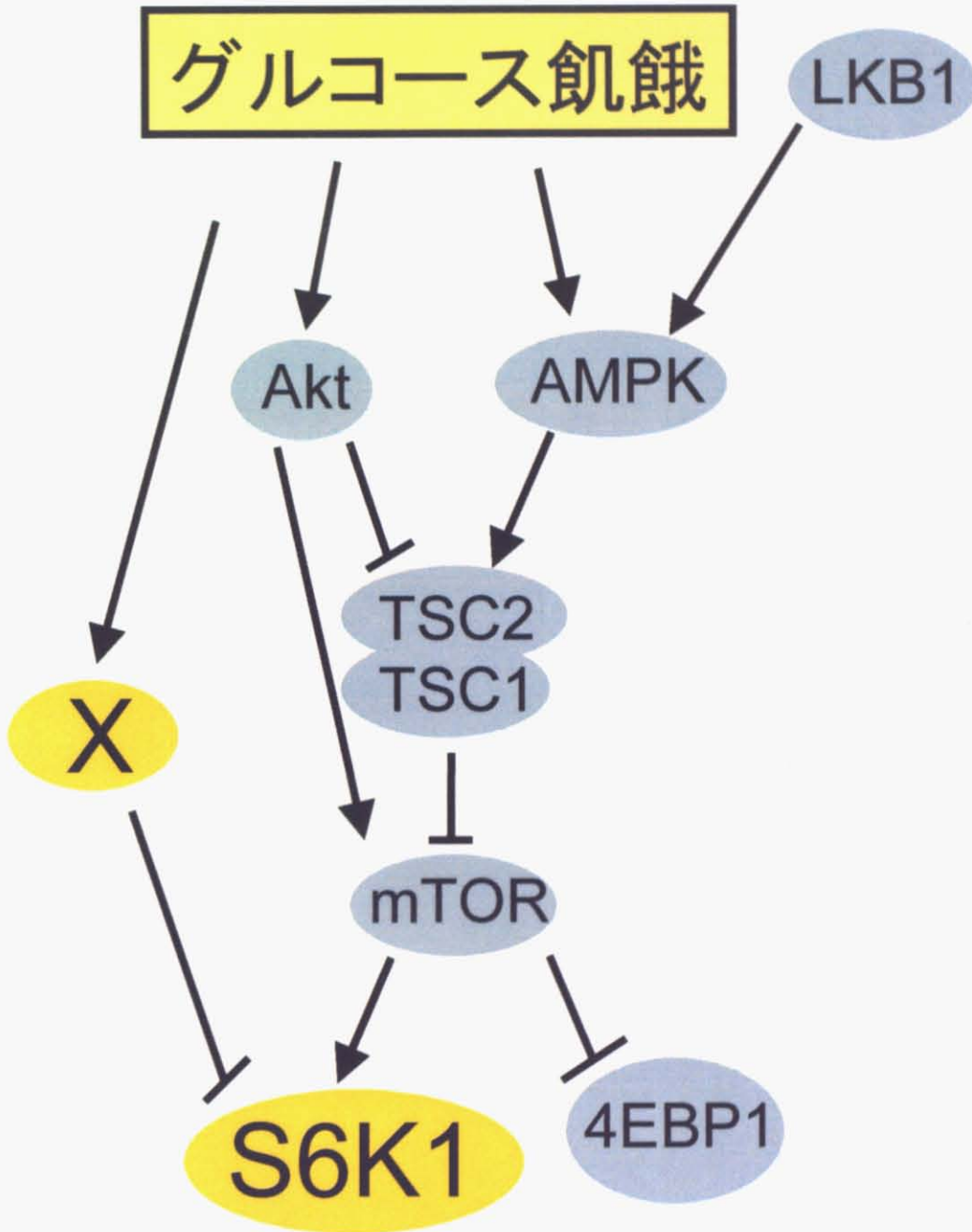
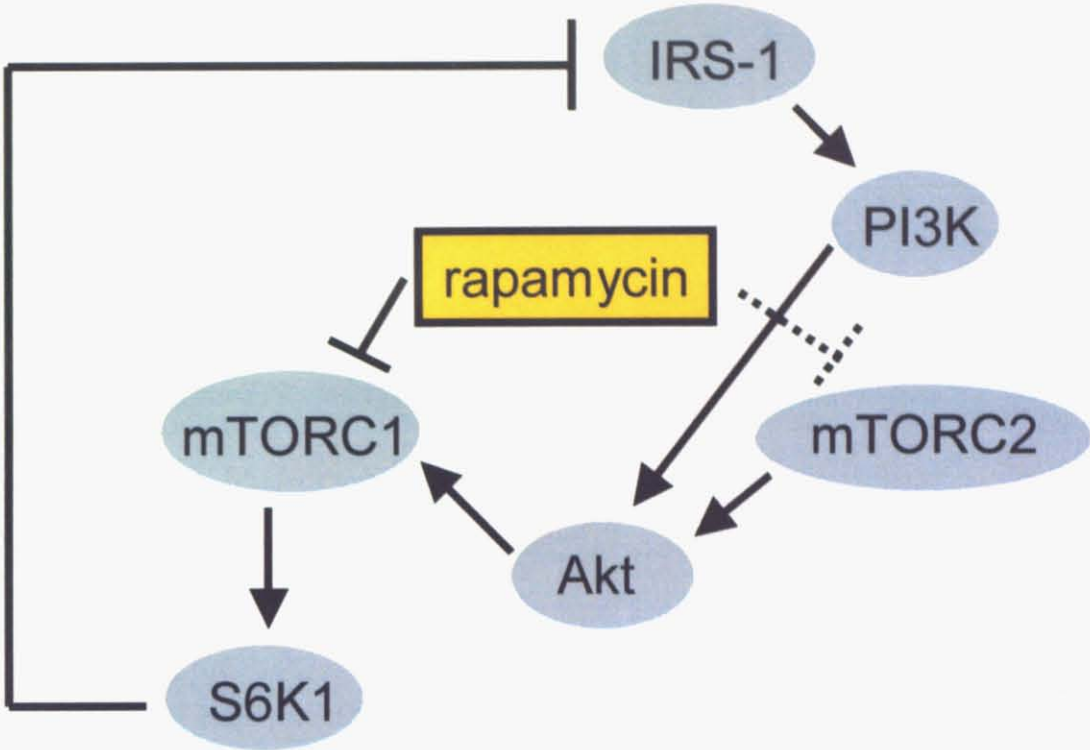


Fig.12



図の解説

Fig.1 AMPK の関与するシグナル伝達経路

代謝ストレスによる AMPK の活性化及びその標的分子を示した。これら以外にも多くの分子が報告されている。ACC: Acetyl-CoA carboxylase(ACC1,ACC2), GS:glycogen synthase, HMG R:HMG-CoA reductase, mTOR:mammalian target of rapamycin, eNOS:endothelial nitric oxide synthase, PFK2:6-phosphofructo-2-kinase.

Fig.2 飢餓耐性における ARK5 の位置づけ

Akt の下流因子でもあり、かつ AMPK ファミリーの一つでもある ARK5 がこれら 2 つの経路の接点となりうる分子であることを模式的に示した。

Fig.3 Akt、AMPK による mTOR の制御

栄養飢餓耐性に関与することが明らかとなっている、Akt、ARK5、および AMPK α による mTOR の制御機構を示した。

Fig.4 グルコース飢餓耐性における AMPK の作用機序の模式図

AMPK のグルコース飢餓耐性における作用機序についての模式図を示した。実線は存在が確認されている経路、点線は存在が確認されていない経路を表した。

Fig.5 細胞株における LKB1, ARK5, AMPK α の発現とグルコース飢餓環境下での各細胞株の生存率およびシグナル伝達の解析

A. 各細胞株から RNA およびタンパク質を抽出し、LKB1, ARK5, AMPK α の発現を見るため、RT-PCR およびウェスタンブロッティングを行った。B. 各細胞株におけ

るグルコース欠乏培地置換後のタンパク質の発現およびリン酸化の変化を解析するため、ウェスタンブロッティングを行った。C. 各細胞株をグルコース欠乏培地で培養し、トリパンブルー染色による生存率の判定を行った。

Fig. 6 AMPK の機能阻害によるグルコース飢餓耐性への影響

A.膵がん細胞株 Panc1 において、siRNA による LKB1 のノックダウンの確認を RT-PCR を用いて行った。B.#5 の siRNA を用いて LKB1 の遺伝子発現抑制下における通常培地およびグルコース欠乏培地での生存率の判定をトリパンブルー染色により行った。各々の siRNA は最終濃度が 5nmol/L となるように加えた。C.Panc1 において、CompoundC を最終濃度 20 μ mol/L となるように添加した通常培地およびグルコース欠乏培地中での生存率の判定をトリパンブルー染色を用いて行った。D.Panc1 を様々な濃度の CompoundC を含む通常培地およびグルコース欠乏培地中で 48 時間培養後の生存率の判定を Cell counting Kit-8 により行った。NS:non-silencing siRNA, cont:control, CC:Compound C, Glc(+):通常培地, Glc(-):グルコース欠乏培地

Fig. 7 グルコース飢餓耐性における mTOR 経路の役割

膵がん細胞株 Panc1 において、LY294002、CompoundC をそれぞれ単独で含む通常培地またはグルコース欠乏培地、および両方の薬剤を含む培地中での生存率の判定をトリパンブルー染色を用いて行った。LY294002 は最終濃度が 10 μ mol/L となるように加えた。CompoundC は最終濃度が 20 μ mol/L となるように加えた。

CC:CompoundC, LY:LY294002

Fig. 8 グルコース飢餓により誘導される Akt の活性化における S6K1 の役割

A.膵がん細胞株 Panc1 および乳癌細胞株 MCF7 において、グルコース欠乏培地に置

換後のタンパクの発現量およびリン酸化の変化の解析をウェスタンブロッティングを用いて行った。B. Panc1 細胞において、Rapamycin を処理後のタンパクの発現量およびリン酸化の変化の解析をウェスタンブロッティングを用いて行った。また、rapamycin を含む通常培地中で24時間前処理した状態で、rapamycin を含むグルコース欠乏培地に置換後のタンパクの発現量およびリン酸化の変化についても同様に解析を行った。なお、p-Akt のバンドの濃さの相対値を ImageJ を用いて求めた。Rapamycin は最終濃度が 20 μ mol/L となるように加えた。rap:rapamycin, Glc(+):通常培地, Glc(-):グルコース欠乏培地

Fig. 9 膵がん細胞株 Panc1 におけるグルコース飢餓環境下でのシグナル伝達の解析

膵がん細胞株 Panc1 において、グルコース欠乏培地に置換後の TSC2/mTOR 経路での経時変化をウェスタンブロッティングにより解析した。

Fig.10 膵がん細胞株 Panc1 における LKB1 発現抑制下でのグルコース飢餓環境下でのシグナル伝達の解析

膵がん細胞株 Panc1 において、siRNA により LKB1 の遺伝子発現抑制下におけるグルコース飢餓環境下でのシグナル伝達の解析をウェスタンブロッティングにより行った。siRNA は最終濃度 5nmol/L となるように加えた。

Fig.11 膵がん細胞株 Panc1 におけるグルコース飢餓環境下での新規経路

グルコース飢餓により S6K1 が mTOR 非依存的に脱リン酸化を受けるという結論から想定された、グルコース飢餓環境下での S6K1 に関する新規経路の模式図を示した。X は未同定のタンパクを表した。

Fig.12 mTOR 複合体の関与するシグナル経路

mTOR は少なくとも二種類の異なる複合体を形成することでそれぞれ異なる機能を持つことが知られている。それらの複合体の PI3K 経路におけるシグナル経路を示した。mTORC1:mammalian target of rapamycin complex1, mTORC2:mammalian target of rapamycin complex2

参考文献

1. Folkman J., et al., *Tumor angiogenesis therapeutic implication*. Engl J Med, 1971, 285: 1182-1186
2. Koong AC., et al., *Pancreatic tumors show high levels of hypoxia*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, 48: 919-922
3. Warburg G., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956, 124: 269-270
4. Gregg LS., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 721-732
5. Esumi H., et al., *Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner*. J Biol Chem, 2002, 277: 32791-32798
6. Imamura K., et al., *Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5"-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287: 562-567
7. Awale S., et al., *Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation*. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 581-583
8. Esumi H., et al., *Antitumor activity of pyrvinium pamoate, 6-(dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium pamoate salt, showing preferential cytotoxicity during glucose starvation*. Cancer Sci, 2004, 95: 685-690
9. Lu J., et al., *Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cell's tolerance to nutrient starvation*. Cancer Sci, 2004, 95: 547-552
10. Awale S., et al., *Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation*. Cancer Res, 2006, 66:

- 1 1 . Izuishi K., et al., *Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy*. *Cancer Res*, 2000, 60:6201-6207.
- 1 2 . Kato K., et al., *Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation*. *Oncogene*, 2002, 21:6082-6090
- 1 3 . Suzuki A., et al., *Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein*. *J Biol Chem*, 2002, 278:48-53
- 1 4 . Hardie DG., et al., *The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell?* *Eur J Biochem*, 1997, 246:259-273
- 1 5 . Hardie DG., *The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream*. *J Cell Sci*, 2004, 117:5479-5487
- 1 6 . Jose M., et al., *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1*. *EMBO J*, 2004, 23:833-843
- 1 7 . Hawley SA., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *J Biol*, 2003, 2:28
- 1 8 . Rebecca LH., et al., *The Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. *J Biol Chem*, 2005, 280:29060-29066
- 1 9 . Fresno Vara JA., et al., *PI3K/Akt signaling pathway and cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30:193-204
- 2 0 . Julia M., et al., *Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response*. *Curr Biol*, 1994, 4:315-324

- 2 1 . Gabriela S.,et al.,*Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression*.Proc Natl Acad Sci USA,2000,97:4023-4028
- 2 2 . Suzuki A.,et al.,*ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling*.Mol Cell Biol,2004,24:3526-3535
- 2 3 . Inoki K.,et al.,*TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*.Cell,2003,115:577-590
- 2 4 . Alexandros T.,et al.,*Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via Raptor-dependent mTOR-mediated Insulin receptor substrate 1 phosphorylation* Mol Cell Biol,2006,26:63-76
- 2 5 . Nave BT.,et al.,*Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*.Biochem J,1999,344:427-431
- 2 6 . Carretero J.,et al.,*Dysfunctional AMPK activity,signaling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer*.Oncogene,2006,1-10
- 2 7 . Buzzai M.,et al.,*The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation*.Oncogene,2005,24:4165-4173
- 2 8 . Zong H.,et al.,*AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation*.Proc Natl Acad Sci USA,2002,99:15983-15987
- 2 9 . Danial NN.,et al.,*BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis*.Nature,2003,424:952-956
- 3 0 . Vander MG.,et al.,*Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism*.Mol Cell Biol,2001,21:5899-5912
- 3 1 . Rathmell JC.,et al.,*Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation*

change and promote growth factor-independent survival. Mol Cell Biol, 2003, 23:7315-7328

3 2 . David M., *mTOR and cancer: insight into a complex relationship.* Nat Rev Cancer, 2006, 6:729-734

3 3 . Elstrom RL., et al., *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells.* Cancer Res , 2004, 64:3892-3899