

## 論文内容の要旨

### 細胞外グルコース濃度感知機構の解明

学生証番号 47 - 107304

がん先端生命科学分野

大和田 賢

## 序論

栄養や酸素が適切に供給されることは、細胞のエネルギー産生、増殖、生存において非常に重要である。細胞分裂時には、核酸、タンパク質、脂質、糖の合成が適切に行われる必要があり、炭素源としてグルコースが多く使われる。また、グルコースは ATP 産生のうえでも非常に重要なエネルギー源である。そのため、細胞には細胞外グルコース濃度に応じて様々な適応応答が精緻に制御されていると考えられた。酵母は、ヘキソキナーゼやグルコースキャリアホモログである **Snf3** や **Rgt2** を使って細胞外グルコース濃度を感知することが知られている。一方、哺乳動物細胞では、細胞外グルコース濃度感知に関わる因子として **AMPK** が挙げられるが、その研究は十分になされていない。

ヒトがん組織では、がん細胞の無秩序な増殖により不均一な血管形成が起こることが知られている。グルコースや酸素は血流を通して供給されるため、ヒトがん組織ではグルコースの供給が極めて限られていることが想定された。事実、ヒト大腸がんや胃がんの手術検体を用いた解析では、非がん部に比べがん部でのグルコース濃度は極めて低い値を示した。そのような環境で生存しているがん細胞には、細胞外グルコース濃度を感知する機構及びその環境に適応する機構が十分に用意されていると考えられる。当研究室では、多くのがん細胞株において培地中のグルコースを除くと、腫瘍の増殖や生存に関わる **AKT** のリン酸化が亢進されることを報告してきた。また、すい臓がん由来細胞株 **PANC-1** は、グルコース欠乏に対し耐性を示すことが報告され、その耐性メカニズムの一部に **AKT** のリン酸化が関与していることも報告されている。

本研究では、グルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化を一つのモデルとし、細胞外グルコース濃度感知機構の解明に取り組んだ。

## 結果

### 1) ①グルコース欠乏により増加する **AKT** のリン酸化

肝臓がん由来細胞株 **HepG2** をグルコース欠乏培地に曝露することにより、**AKT** リン酸化の増加は 0.5h 以内から観察され 3h まで維持されていた。この時、**PI3K** の阻害剤である **LY294002** を処理することにより、グルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化は抑制された (図 1A)。このことよりグルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化は、**PI3K** 依存であることを示した。次に、グルコース欠乏により誘導される **AKT**

リン酸化が、どのような細胞外グルコース濃度域で観察されるのか検討した。健康成人の血中グルコース濃度（血糖値）は 5.5 mM である。通常血中グルコース濃度のおよそ四分の一から、AKT リン酸化の増大が観察されたことから、細胞が細胞外グルコース濃度を感知する機構は生理的な範囲内で起こると考えられた。哺乳動物細胞でも、細胞外グルコース濃度感知にヘキソキナーゼやグルコーストランスポーターが関与するか検討するために、グルコースのアナログである 2-deoxyglucose (2-DG) を用いた。グルコース欠乏培地に 2-DG を添加すると AKT リン酸化が亢進された。さらに、グルコース存在下でも、2-DG 添加により AKT リン酸化は亢進されたことか

ら、グルコース代謝の中間産物を認識することにより AKT リン酸化の制御がなされている可能性が考えられた。そこで、グルコース代謝を正常な flux に戻せばグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化が誘導されないのではないかと考え、フルクトース、ガラクトースを用いた。フルクトース、ガラクトース処置により、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は抑制された（図 1B）。これらのことよりグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、細胞がグルコース自体を認識するわけではなく解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物を認識することにより制御されていることが強く示唆された。

## ②グルコース欠乏下で増大する細胞内過酸化水素が AKT リン酸化に及ぼす影響

グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、ガラクトース、フルクトースにより抑制されたことから、細胞の代謝の変化に起因して AKT リン酸化が制御されている可能性が考えられた。解糖系の最終代謝産物ピルビン酸を培地中に添加すれば、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は惹起されないのではと考え、検討した。グルコース欠乏培地にピルビン酸を添加すると、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は抑制された。また、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤処理により、細胞内活性酸素種の増大が報告されている。グルコース欠乏下でも、細胞内活性酸素種の

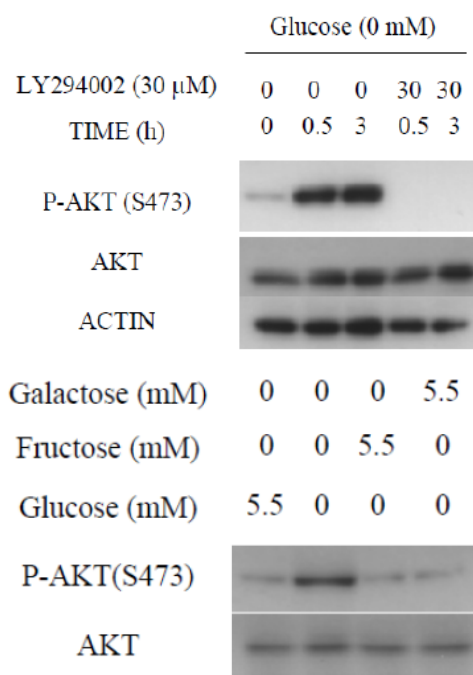
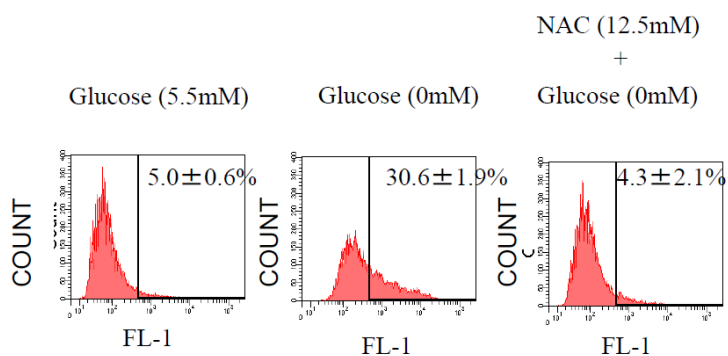
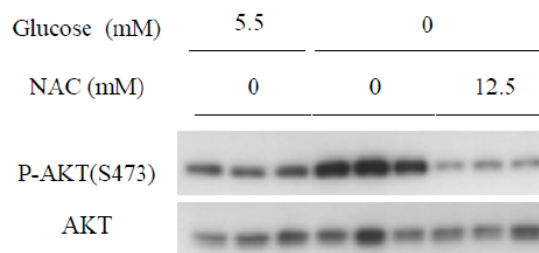


図 1 (A)グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化及び LY294002 の効果 (B)ガラクトース及びフルクトースによる AKT リン酸化への影響

増加が観察されるか検討した。過酸化水素を特異的に検出するプローブを用いて、グルコース欠乏下での細胞内過酸化水素の検出を行った。グルコース欠乏下で細胞内過酸化水素の増加が観察され、抗酸化剤である N - acetylcysteine (NAC) を処置することにより減少した(図 2A)。グルコース欠乏により誘導される AKT



リン酸化も NAC 処置により減少した(図 2B)。このことより、グルコース欠乏下で誘導される AKT リン酸化は過酸化水素がメディエーターであることが強く示唆された。過酸化水素がメディエーターとして、PI3K 依存的に AKT を活性化する機構として



SRC/OSSA/PI3K を介する経路が知られている。RNAi 干渉法を用いた OSSA の発現抑制、SRC の阻害剤である PP2 とともに、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は抑制された。このことよりグルコース欠乏により誘導される AKT のリン酸化には、SRC の活性化及び OSSA が強く関与していることが示された。

図 2(A)グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素及び抗酸化剤 NAC の効果(B)グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす NAC の効果

### ③グルコース欠乏下増大する細胞内活性酸素種は NOX4 依存的である

細胞内で、活性酸素種の主要な産生場所として NADPH oxidase (NOX) やミトコンドリア が知られている。近年、増殖因子の刺激で NOX4 由来の活性酸素種が増大することが報告されている。また、増殖因子の刺激は AKT にリン酸化をグルコース欠乏同様極めて早い時間で増加させることが報告されている。グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素の産生場所として NOX4 の関与を検討した。RNAi 干渉法を用いて、NOX4 の発現抑制を行うと、グルコース欠乏により誘導される細胞内過酸化水素の増大は観察されず、AKT のリン酸化も増加しなかった (図 3A,B)。このことよりグルコース

欠乏により誘導される AKT リン酸化は NOX4 由来の過酸化水素がメディエーターとして作用していることを強く示唆された。

図 3 (A)NOX4 発現抑制時の、グルコース欠乏による細胞内過酸化水素の変化及び(B)AKT リン酸化に及ぼす影響

結論

グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、過酸化水素がメディエーターとなっていることを示した。また、過酸化水素の産生場所が NOX4 であることも明らかにした。さらにグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物により制御されていることを示し、グルコース欠乏に適応する新たな細胞内情報伝達系の存在を明らかにした。

発表論文

Owada S, Shimoda Y, Tsuchihara K, Esumi H. Critical role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by NOX4 during cellular response under glucose deprivation. PLOS ONE, in press (2013)

