

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	赤坂 保行
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
<p>Auraptene Enhances AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation and Thereby Inhibits the Proliferation, Migration and Expression of Androgen Receptors and Prostate-Specific Antigens in Prostate Cancer Cells</p> <p>(オーラプテンは AMP-Activated Protein Kinase のリン酸化を促進し、それにより前立腺癌細胞において増殖・遊走・アンドロゲン受容体の発現、前立腺特異抗原の発現を抑制する)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	日向 信之	印
審査委員	教授	岡本 渉	
審査委員	准教授	藤本 成明	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>AMP-activated protein kinase (AMPK) はセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内エネルギーの枯渇 (AMP/ATP 比増加) に反応して Liver kinase B1 (LKB1) または calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) を介した AMPKα サブユニットの Thr172 のリン酸化によって活性化される。その結果、グルコースの取り込み、脂質の分解、ミトコンドリア生合成、オートファジー、細胞周期の停止、アポトーシス等を誘導することが知られている。</p> <p>一方、八朔等の柑橘類に含まれる Auraptene は天然のクマリン化合物の一種であり、これまでに前立腺癌、乳癌、大腸癌等に対する抗腫瘍効果が報告されている。本研究では Auraptene の作用を 1% fetal calf serum を含む DMEM 下で培養した前立腺癌細胞株 (LNCaP、DU145、PC3) と HEK-293 細胞の 4 細胞株を用いて検討し、以下の抗腫瘍効果を明らかにした。</p>			
<p>1. Auraptene による細胞増殖抑制および遊走抑制</p> <p>4 種類の細胞に対し、Auraptene (0、3、10、30μM) を添加し、24 時間あるいは 48 時間培養したところ、LNCaP、PC3、HEK293 細胞では 3μM 以上で濃度依存的に細胞増殖抑制効果が認められた。また、LNCaP 細胞に対し、30μM の Auraptene を 96 時間処理したところ、顕著な遊走抑制効果が認められた。一方、DU145 細胞では、高濃度 (30μM 以上) で細胞増殖抑制効果が認められたが、LNCaP、PC3、HEK293 細胞と比較すると、Auraptene による細胞増殖効果は有意に低かった。</p>			
<p>2. Auraptene による AMPK 活性化</p> <p>4 種類の細胞に対し、Auraptene (0、3、10、30μM) を添加し、8 時間後に cell lysate を調整し、AMPK 及びその下流に位置する Acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化を検討した。その結果、LNCaP、PC3、HEK293 細胞では Auraptene の濃度依存的に AMPK 及び ACC のリン酸化の上昇が認められた。一方、DU145 細胞では AMPK 及び ACC のリン酸化が認められなかった。</p>			

さらに、Auraptene (30 μ M) による AMPK 及び ACC のリン酸化の経時的変化を検討したところ、LNCaP、PC3、HEK293 細胞では 1 時間から 8 時間の間で AMPK の顕著なリン酸化上昇が認められたが、DU145 ではリン酸化が全く認められなかった。

また、Auraptene (30 μ M) で LNCaP 細胞を 1 時間処理すると、細胞内 ADP/ATP 比が上昇することが判明した。さらに、AMPK の下流に位置する mTOR-S6K 経路の抑制が認められた。

3. Auraptene による androgen receptor (AR) と prostate specific antigen (PSA) 発現抑制

LNCaP 細胞に対し、10 μ M の Auraptene または AMPK 活性化剤である AICAR を 24 時間処理したところ、いずれの刺激によっても AR 及びそのターゲット遺伝子である PSA のタンパクレベルでの発現減少が認められた。また、mRNA レベルでも AR と PSA の発現減少が認められた。

4. Auraptene による AR と PSA の発現抑制は AMPK を介する証明

LNCaP 細胞に control siRNA 又は AMPK siRNA を transfect した後に Auraptene で処理し、AR と PSA の発現を検討した。AMPK siRNA で処理した場合には control siRNA と比較して、Auraptene 処理による AR の発現量減少が抑制されることが示された。また、AMPK 阻害剤である Compound C で LNCaP 細胞を前処理した場合にも、Auraptene 処理による AR と PSA の発現量減少が抑制された。

以上より、Auraptene は AMPK 活性化を介して AR や PSA の発現を調整していることが示唆された。

5. Auraptene による AMPK 活性化に対する LKB1 の関与

先述のように、LNCaP、PC3、HEK293 細胞を Auraptene で処理した場合に濃度依存的に AMPK 及びその下流に位置する ACC のリン酸化を誘導されたが、DU145 細胞ではそれらのリン酸化が認められなかった。そこで、Auraptene による AMPK の活性化の機序を明らかにする上で、DU145 細胞の性質に着目した。DU145 細胞では AMPK の上流キナーゼである LKB1 が欠損していることが確認されたので、DU145 細胞に LKB1 を transfect した後に Auraptene で処理したところ AMPK のリン酸化が引き起こされることが示された。従って、Auraptene は細胞内 ADP/ATP 比を上昇させ、AMPK のリン酸化を誘導するが、そのキナーゼは LKB1 であることが示唆された。

本論文の上記の結果をまとめると、Auraptene が細胞内の AMP/ATP 比を上昇させることで LKB1 を介して AMPK を活性化する作用があることが証明された。さらに、AMPK の下流に位置する mTOR-S6K 経路の抑制、脂肪酸合成経路の抑制、AR 経路の抑制という少なくとも 3 つの分子機序を介して、前立腺癌細胞の増殖を抑制することが示された。すなわち、AMPK 活性化を誘導する Auraptene は、前立腺癌を含む悪性腫瘍の治療に有効である可能性が提唱された。よって審査委員会委員全員は、本論文が赤坂保行に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。