Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

AICAR induces mitochondrial apoptosis in human osteosarcoma cells through an AMPK-dependent pathway

Morishita, Masayuki

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2017-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6792号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006792

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

AICAR induces mitochondrial apoptosis in human osteosarcoma cells through an AMPK-dependent pathway

AICARはヒト骨肉腫において，AMPK経路を介してミトコンドリア系アポトーシスを誘導する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
外科系講座　整形外科学
(指導教員：黒田　良祐教授（客員教授・特命教授　等))

森　下　　雅　之

要旨

はじめに

骨肉腫は，小児・若年者に好発する骨原発悪性腫瘍である．術前後化学療法および外科的切除による集学的治療が行われるが，この20年間大きな予後の改善はなく，化学療法に用いられる新規薬剤の開発も行われていない．そのため，再発あるいは遠隔転移症例においてはいまだ予後不良の疾患であり，新たな治療法の開発が望まれる．

ミトコンドリアは，細胞の代謝と細胞死に主要な役割を果たす細胞内小器官であり，ミトコンドリアの機能低下とそれに関連した反応の制御は，悪性腫瘍に対する新たな治療法として注目されている．様々な癌腫においてミトコンドリア量の変化が報告されており，ミトコンドリア量の減少が肝細胞癌や乳癌において，腫瘍増殖や患者予後に関与しているという報告がある．ミトコンドリアの増殖においては，peroxisome proliferator-activated receptor-γ（PGC-1α）がtranscription of the gene coding mitochondrial transcription factor A (TFAM)を制御し，mitochondrial DNA（mtDNA）を増加させることが明らかとなっているが，我々は，過去に，骨軟部肉腫細胞においてミトコンドリア量が正常細胞と比較して著明に減少しており，ミトコンドリア量の減少が腫瘍増殖と関与していること，PGC-1αを強制発現させることでヒト骨肉腫細胞のミトコンドリア量を増加させ，ミトコンドリア系アポトーシスを亢進させること，を報告しており，ミトコンドリア量の増加が骨肉腫に対して抗腫瘍効果を示す可能性を示した．5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide（AICAR）は，AMP-activated protein kinase α（AMPKα）を活性化させる薬剤として広く使用されており，骨格筋においてPGC-1αを増加させることでミトコンドリア新生を促すことが報告されている．

以上の背景から，我々はAICARがAMPKを活性化させ，さらにPGC-1αを介したミトコンドリア量の増加とアポトーシス誘導を生じることで骨肉腫に対して抗腫瘍効果を示す，と仮説し，本研究を行った．

方法

ヒト骨肉腫細胞株に対するAICAR作用によるAMPK活性化とミトコンドリア量への効果の検討（in vitro）

ヒト骨肉腫細胞（MG63，KHOS）にAICARを作用させ，AMPK活性化と，ミトコンドリア関連蛋白であるPGC-1αおよびTFAMの発現変化についてimmunoblot法にて評価した．またミトコンドリア量の評価としてリアルタイムPCR法によるmtDNAの定量的評価を行った．

AICARによるヒト骨肉腫細胞株の細胞増殖能およびミトコンドリア系アポトーシスへの効果の検討（in vitro）

AICARによる細胞増殖能への影響について，WST assayを用いて評価した．またミトコ

ンドリア系アポトーシスへの影響の評価として，アポトーシス関連蛋白（caspase-3，-9，PARP）の発現および活性を immunoblot 法で，DNA 断片化については FACS で評価した．さらに蛍光免疫染色を用いて DNA 断片化とミトコンドリア量の定性的評価を行った．

ヒト骨肉腫細胞株皮下移植モデルマウスに対する AICAR の in vivo での抗腫瘍効果の検討

週齢 5 週のオス BALB/c ヌードマウスの背部皮下に MG63，KHOS 細胞株を移植しモデルマウスを作成した．AICAR 450 mg/kg を 14 日間連続腹腔内投与し，適時腫瘍径と体重を計測した．治療終了時に移植腫瘍を採取し，アポトーシス活性について immunoblot 法および FACS を用いて評価した．ミトコンドリア関連因子（PGC-1α，TFAM）についても immunoblot 法にて評価を行った．

統計学的解析

2 群間の比較には t 検定を用い，多群間の比較には ANOVA，post hoc 検定を用いた．$p<0.05$ を統計学的に有意とした．

結果

AICAR はヒト骨肉腫細胞において AMPKα をリン酸化し，PGC-1α/TFAM 経路を介してミトコンドリア量を増加させる

In vitro において AICAR を作用させることにより，投与後速やかに AMPKα（Thr172）のリン酸化が起こることを immunoblot 法にて確認した（Fig. 1A, B）．リアルタイム PCR 法により，AICAR 作用群において mtDNA の有意な上昇を認めた（Fig. 1C）．また，ミトコンドリア関連因子である PGC-1α，TFAM のタンパク発現の上昇を認めた（Fig. 1D）．これらは，AICAR が AMPK 活性化によって PGC-1α/TFAM 経路を介したミトコンドリア生合成を上昇させることを示唆している．

AICAR は in vitro においてヒト骨肉腫細胞の増殖能を抑制し，ミトコンドリア系アポトーシスを増加させる

WST assay により，MG63，KHOS 両細胞株において，AICAR は濃度依存性に殺細胞効果を認めた（Fig. 2A）．また FACS では，AICAR によるアポトーシス細胞の増加，immunoblot 法にて，アポトーシス関連蛋白（caspase-3, -9, PARP）の活性化を認めた（Fig. 2B，C）．さらに，蛍光免疫染色にて AICAR はミトコンドリア量の増加とそれに伴うアポトーシスの亢進を認めた（Fig. 3A，B）．これらの結果は，AICAR によるミトコンドリアの増加がミトコンドリア系アポトーシスを亢進させることを示唆している．

AICAR は in vivo においてヒト骨肉腫細胞の腫瘍増殖を抑制し，ミトコンドリア系アポトーシスを増加させる

In vivo の検討にて，AICAR はヒト骨肉腫細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍増大を有意に抑制した．AICAR 投与群とコントロール群において有意な体重差は認めなかった（Fig. 4A, B）．FACS，immunoblot 法による評価では，AICAR 投与群において，アポトーシス活性の増強とミトコンドリア関連蛋白である PGG-1α および TFAM の発現上昇を認めた（Fig. 5A，B，C）．さらに，蛍光免疫染色にて，in vitro と同様に，ミトコンドリア量の増加と同部位でのアポトーシスの亢進を認めた（Fig. 5D, E）．以上から，in vivo においても AICAR がミトコンドリアを増加させることによりアポトーシスを惹起し，ヒト骨肉腫に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された．

考察

AMPK は cell cycle において需要な役割を担っていると考えられており，ヒト骨格筋において，AMPK 活性化によって PGC-1α が活性化し，ミトコンドリア生合成を増加させると報告されている．腫瘍細胞に対する AMPK の効果についても，これまでに多く報告されており，p53 のリン酸化を介したアポトーシス亢進，cell cycle arrest を制御することによる抗腫瘍効果，などが報告されている．今回我々は，AMPK の活性化による PGC-1α を介したミトコンドリア量の増加に着目し，ヒト骨肉腫細胞に及ぼす影響について本研究を行った．

ミトコンドリア生合成において，AMPK/PGC-1α/TFAM 経路を活性化させる AMPK activator として metoformin や AICAR が使用されている．AICAR は，心血管保護作用を期待されて開発された薬剤であり，1980 年から 1990 年代に冠動脈バイパス術において使用された経緯がある．AICAR は生体に投与されると，ZMP と呼ばれる AMP の類似体に変化し，AMPK と同様の作用を示すことが示されており，これまでに骨肉腫以外の癌腫に対して AICAR が抗腫瘍効果を呈することが報告されている．HeLa 細胞では，AMPK をリン酸化することで PGC-1α，NRF-1，TFAM の mRNA 発現が上昇し，結果として mtDNA を増加させると報告されている．その他の癌腫に対しても AICAR による抗腫瘍効果が報告されているが，骨肉腫に対する AMPK あるいは AICAR の効果の報告はない．

本研究では，骨肉腫に対して，AICAR が AMPK を活性化させることで PGC-1α を増加させ，ミトコンドリア量増加によってミトコンドリア系アポトーシスを亢進させる，という仮説のもと，in vitro および in vivo での検討を行った．In vitro では，AICAR がヒト骨肉腫細胞において，AMPK のリン酸化，PGC-1α および TFAM の発現上昇，ミトコンドリア量増加をもたらし，アポトーシス活性が上昇することを確認した．さらに，in vivo においても，AICAR が明らかな体重減少なく骨肉腫の腫瘍増大を抑制することを確認した．本研究で得られた結果から，ミトコンドリア量の減少が骨肉腫の進行に影響している可能性が示され，さらに AICAR の AMPK 活性化による PGC-1α/TFAM 経路を介したミトコンドリア量の増加によって抗腫瘍効果が生じることが明らかとなった．

本研究の limitation としては，AICAR は骨肉腫に対して腫瘍増大抑制効果を認めたが，

腫瘍縮小効果までは得られなかった点，AICAR による抗腫瘍効果のメカニズムとして AMPK 阻害による検討を行っていない点があげられる．さらなる研究が望まれるが，AICAR による AMPK/PGC-1α/TFAM 経路を介したミトコンドリア量増加が，骨肉腫において重要な治療ターゲットとなる可能性が示唆された．

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2653号	氏　名	森下 雅之
論文題目 Title of Dissertation	AICAR induces mitochondrial apoptosis in human osteosarcoma cells through an AMPK-dependent pathway AICARはヒト骨肉腫において，AMPK経路を介してミトコンドリア系アポトーシスを誘導する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	掛地吾弘 味木徹夫 古屋敷智之	

(要旨は1，０００字～2，０００字程度)

ミトコンドリアは，細胞の代謝と細胞死に主要な役割を果たし，ミトコンドリアの機能低下とそれに関連した反応の制御は，悪性腫瘍に対する新たな治療法として注目されている．研究者らのグループは過去に，ヒト骨軟部肉腫細胞に強制的にPGC-1αを遺伝子導入することでTFAMを介したミトコンドリア量の増加を促し，ミトコンドリア系アポトーシスが誘導されることを報告している．AICARはAMPKαを活性化させる薬剤であり，PGC-1αを増加させることでミトコンドリア新生を促すことが知られているが，数種の癌腫において抗腫瘍効果を示すことが報告されている．

今回研究者らはAICARによるAMPK活性化がPGC-1αを介したミトコンドリア量の増加とアポトーシス誘導を生じ，骨肉腫に対して抗腫瘍効果を示す，と仮説し，本研究を行った．

対象と方法

In vitroにおいて，ヒト骨肉腫細胞（MG63，KHOS）にAICARを作用させ，AMPK活性化と，ミトコンドリア関連蛋白PGC-1α，TFAMの発現変化についてimmunoblot法にて評価した．ミトコンドリア量の評価としてリアルタイムPCR法によるmtDNAの定量を行った．AICARによるヒト骨肉腫細胞増殖能への影響をWST assayで評価し，ミトコンドリア系アポトーシスに関して，アポトーシス関連蛋白（caspase-3，-9，PARP）の活性化をimmunoblot法で，DNA断片化についてはFACSで評価した．さらに蛍光免疫染色によるDNA断片化とミトコンドリア量の定性的評価を行った．

In vivoにおける検討として，ヒト骨肉腫細胞株を移植したモデルマウスに対し，AICAR 450 mg/kg，14日間連続腹腔内投与による治療を行った．定期的に腫瘍径と体重を計測した．治療終了後に移植腫瘍を採取し，腫瘍内アポトーシス活性についてimmunoblot法，FACSを用いて評価した．PGC-1α，TFAMについてもimmunoblot法にて評価を行った．

統計学的解析には，2群間の比較にはt検定を用い，多群間の比較にはANOVA, post hoc検定を用いた．$p<0.05$を統計学的に有意とした．

結果

AICARはヒト骨肉腫細胞においてAMPKαをリン酸化し，PGC-1α/TFAM経路を介してミトコンドリア量を増加させる．

In vitroにおいてAICARを作用させることにより，投与後速やかにAMPKαのリン酸化を認め，それに伴ったPGC-1α，TFAMの蛋白発現上昇とmtDNAの有意な上昇を認めた．

AICARはin vitroにおいてヒト骨肉腫細胞の増殖能を抑制し，ミトコンドリア系アポトーシスを亢進する．

AICARはヒト骨肉腫細胞に対して濃度依存性の殺細胞効果を認めた．また，AICARによるアポトーシス細胞の増加，アポトーシス関連蛋白の活性化を確認した．蛍光免疫染色ではAICAR作用にてミトコンドリア量の増加とそれに伴うアポトーシスの亢進を認めた．

AICARはヒト骨肉腫細胞の移植腫瘍の増大を抑制し，ミトコンドリア系アポトーシスを亢進する．

AICARはヒト骨肉腫細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍増大を有意に抑制した．治療後腫瘍においてアポトーシス活性の増強とPGG-1α，TFAMの蛋白発現上昇を認めた．蛍光免疫染色にて，in vitroと同様に，ミトコンドリア量の増加と同部位でのアポトーシスの亢進を認めた．

考察および結論

本研究から，AICARがヒト骨肉腫細胞に対して，AMPKのリン酸化，PGC-1α・TFAMの発現上昇，ミトコンドリア量増加を生じることでアポトーシス活性が上昇し，抗腫瘍効果を示すことを，in vitroおよびin vivoにおいて確認した．以上から，AICARによるAMPK活性化とPGC-1α/TFAM経路を介したミトコンドリア量増加，ミトコンドリア系アポトーシスの亢進によって抗腫瘍効果が生じることが明らかとなった．

本研究は，骨肉腫においてAICARがAMPK/PGC-1α/TFAM経路を介したミトコンドリア量増加とミトコンドリア系アポトーシス亢進によって抗腫瘍効果を示すことを初めて証明した報告である．骨肉腫に対して，ミトコンドリアを増加させることが，新たな治療アプローチとなりうるとした点で，価値ある業績である．

よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める．