

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10008

研究課題名(和文)腫瘍特異性の高い放射線増感剤の開発 - メトフォルミンを用いた胃癌細胞での検討 -

研究課題名(英文) Development of tumor-specific innovative drug Metformin for gastric cancer cell lines

研究代表者

茂松 直之 (Shigematsu, Naoyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：30178868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：進行胃癌は依然として難治性であり、集学的治療による治療成績向上が望まれる。放射線治療効果を高めるため、経口糖尿病薬であるメトフォルミンに着目した。胃癌培養細胞に対し放射線照射、メトフォルミン投与、照射と薬剤投与併用を行い、細胞生存率、アポトーシスの比率、細胞周期の変化について測定し、放射線増感効果を探した。照射と薬剤投与併用により効果的な殺細胞効果が得られ、アポトーシス分画比率の増加が観察された。細胞周期の検討では、併用投与においてG2/M期分画の増加時間が持続していた。以上よりメトフォルミンは有効な放射線増感剤と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Treatment results of gastric cancer in advanced stages need improvement. More effective anti-tumor radiosensitizing drug is anticipating. We selected metformin which is one of oral diabetes drugs as a promising radiosensitizer. Treatment effectiveness is assessed by irradiation, drug exposure alone and concomitant use of irradiation and drug in human gastric cell lines. Cell survival was evaluated with colony formation. Apoptosis and cell cycle distribution was evaluated using flow cytometric analyses. Combined therapy showed larger cytotoxic effect and higher apoptotic rate than the other exposure. The G2/G1 ratio was elevated and continued in 72-hours by combined therapy. Metformin showed not only cytotoxic effect but radiosensitizing effect in terms of arresting cell cycle in G2/M phase.

研究分野：医学

キーワード：放射線治療 放射線生物学 放射線増感剤 胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌に対する放射線治療は、わが国では一般的治療として普及していない。その理由として手術可能な段階での発見が多く、根治的手術治療により、良好な治療成績が得られていることが挙げられる。一方ステージ 以上の進行癌に関しては、手術治療と補助化学療法が施行されているが、その治療成績は十分とはいえない。一方海外では、疾患の頻度は低いものの高度進行癌の占める割合が大きく、化学療法ならびに放射線治療による補助療法が盛んに行われている。術前の放射線治療を行うことで、手術単独治療に比較して生存率の改善が報告されており、術前化学放射線治療に関する臨床試験では、手術時に 20-30% 程度の pCR が得られている。研究代表者らは、一般・消化器外科とともに進行胃癌に対する放射線化学療法に積極的に取り組み、治療成績を国際的に評価の高い雑誌に報告している。その結果は、放射線化学療法の奏功率は海外とほぼ同等であった (Saikawa Y et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008)。その一方で、局所制御可能症例において遠隔転移や腹膜播種を多く経験しており、従来の抗癌剤とは異なる機序による、放射線増感効果 (局所病巣の制御)、転移抑制効果 (遠隔転移病巣の制御) を持った薬剤の探索が必要である。

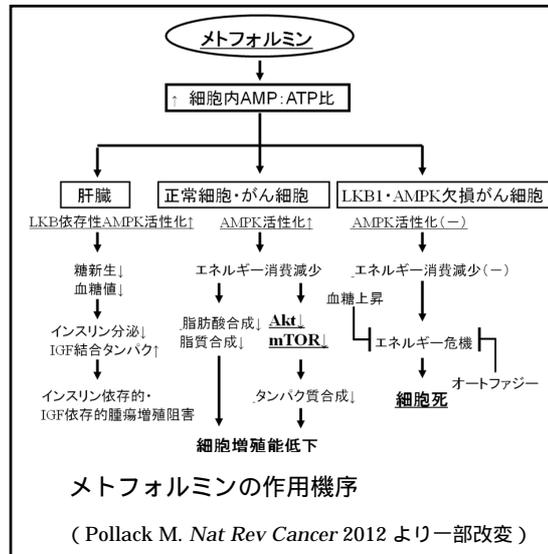
2. 研究の目的

難治性である進行胃癌に対しては、集学的治療による治療成績改善が望まれる。放射線治療効果を高めるため、経口糖尿病治療薬であるメトフォルミンに着目した。メトフォルミンの関与するシグナル伝達系として AMPK が知られているが、この活性化は細胞の主要な増殖生存シグナルである PI3K-Akt-mTOR 経路を介した抗腫瘍効果が示唆されている。(右上図) 胃癌細胞に放射線照射とメトフォルミン投与を行い、細胞生存率、細胞応答、AMPK 活性及び PI3K-Akt-mTOR 経路の活性度を評価し、放射線増感剤としての有効性及びその機序を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 代表的なヒト胃癌由来細胞のなかから使用する培養細胞株を複数選択し、放射線照射、メトフォルミンの投与、照射とメトフォルミン投与を行い、それぞれの細胞生存率をコロニー形成法、MTT assay 法にて測定する。照射と阻害剤投与は同時投与と逐次投与の両方を行い比較検討する。

(2) 細胞生存率の測定により、照射と阻害剤の併用効果が観察されたら、上記と同様の 4 通りについてアポトーシスと細胞周期を観察する。測定はフローサイトメトリー法で行う。経時的变化についても検討するため、細胞は処理後 24-72 時間後にそれぞれ回収、測定した。



(3) コントロール、放射線照射、阻害剤投与、両者併用時それぞれにおける AMPK、Akt/mTOR 経路の活性度評価を評価するため、4 群の処理を行った細胞を回収し、AMPK および Akt/mTOR に関連する分子の発現につき Western blot 法により測定する。

(4) これまでの結果より、メトフォルミンによる放射線増感効果、機序を解明する。

4. 研究成果

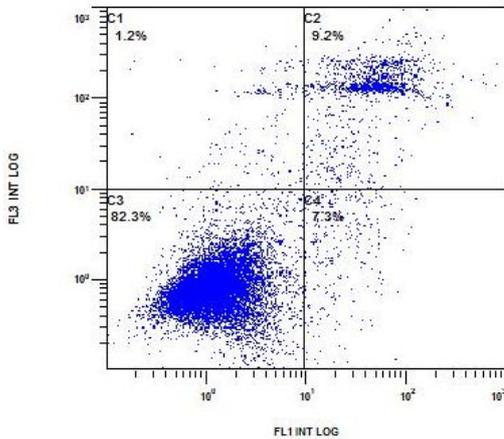
(1) 生存率 (生残率) 測定

ヒト胃癌細胞セルラインとして MKN45, MKN74 を選択したのち照射によるコロニー形成法を行った。生残率を測定したところ、照射と薬剤両者の投与において最もコロニー形成率が低下した。一例として MKN\_74 における形成率は、コントロールを 100% とすると、コントロール、薬剤単独、照射単独、照射と薬剤投与で 100、83、71、66% であった。MTT アッセイ法による薬剤投与後の細胞生存率については、薬剤濃度 10mM から確実に生存率減少が観察され、25mM で 40% 程度となった。以上より照射線量を 4 Gy、併用に用いるメトフォルミン濃度は 10mM、25mM を選択した。

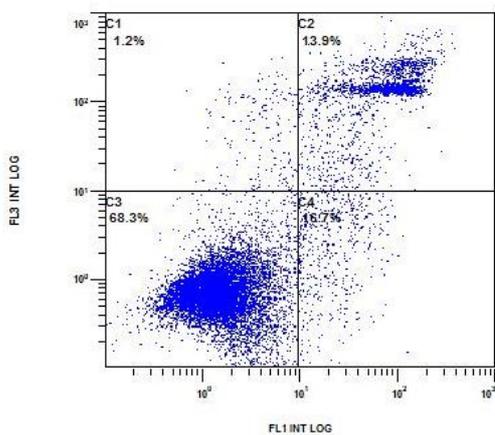
(2) アポトーシスの観察

前述(2)の方法で処理を行った照射、メトフォルミン投与いずれにおいても早期アポトーシス、後期アポトーシス分画両群の増加が認められた。同時投与群では、早期アポトーシス分画の増加がより顕著であり、MKN\_74 における 1 例として、コントロール、照射単独、メトフォルミン投与単独、同時投与の 4 群で早期アポトーシス分画がそれぞれ 16.5、30.7、29.6、40.4% であった (次ページ図)。

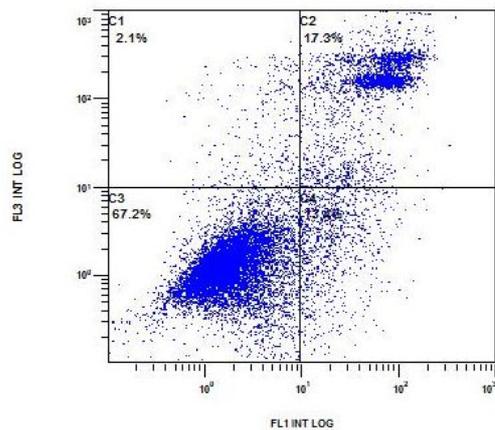
### コントロール



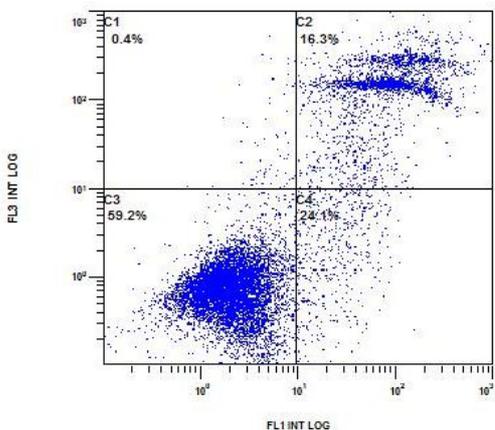
### メトフォルミン投与



### 照射



### 照射 + メトフォルミン



### (3) 細胞周期の測定

細胞周期の変化についても前述の4群で検討した。その結果、24時間では照射単独、薬剤単独、併用群いずれにおいてもG2/M期分画の増加を認めた。72時間においては照射単独、薬剤単独ではG2/M期分画は低下していたが、併用群ではG2/M期分画の増加が持続していた。

### (4) ウェスタンブロッティング

前述の4群について細胞を固定、回収し、タンパクの発現の測定を試みた。Akt、p-Aktについてはバンドの発現が観察されたが、mTOR、p-mTORについては今回十分な観察が行えなかった。

### (5) まとめ

胃癌細胞に対する放射線とメトフォルミン投与の併用は抗腫瘍効果において有効であった。機序の解明については今後も検討する。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Kumabe A, Zenda S, Motegi A, Onozawa M, Nakamura N, Kojima T, Daiko H, Shigematsu N, Akimoto T. Long-term Clinical Results of Concurrent Chemoradiotherapy for Patients with Cervical Esophageal Squamous Cell Carcinoma Anticancer Research 37; 5039-44, 査読有 (2017) DOI

10.21873/anticancer.11919

(2) Kumabe A, Fukada J, Kota R, Koike N, Shiraishi Y, Seki S, Yoshida K, Kitagawa Y, Shigematsu N. Long-term results of concurrent chemoradiotherapy with

daily-low-dose continuous infusion of 5-fluorouracil and cisplatin (LDFP) for Stage I-II esophageal carcinoma Diseases of the Esophagus 31; 1-8, 査読有 (2017) DOI doi.org/10.1093/dote/dox138

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 外山弘文、深田淳一、隈部篤寛、公田龍一、小池直義、白石悠、北川雄光、茂松直之

ステージ I-II 期食道癌に対する化学放射線療法

日本放射線腫瘍学会第30回学術大会 (2017)

(2) Fukada J., Abe T., Kumabe A., Takaishi H., Kitagawa Y., Shigematsu N.; Pleural and pericardial effusion after chemoradiotherapy in esophageal cancer patients -A predictive modeling using mean pericardial irradiated dose-  
57th Annual Meeting of American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, (2016)

(3) Fukada J., Takaishi H, Kitagawa Y, Shigematsu N. Pleural effusion after chemoradiotherapy for esophageal cancer - a dosimetric analysis-  
15th International congress of Radiation Research (2015)

(4) Shigematsu N., Fukada J., Kota R, Shiraishi Y, Kawata T. Cytogenetic Effects of Radiation and Caffeine on Normal Human Fibroblast and Ataxia Telangiectasia Heterozygous Fibroblast Cells  
15th International Congress of Radiation Research (2015)

(5) Kawata T., Liu C, Fukada J., Kota R, Shigematsu N. Chromosomal Aberrations in Normal and AT Cells Exposed to High Dose of Low-dose-rate  
15th International Congress of Radiation Research (2015)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

茂松 直之 (SHIGEMATSU, Naoyuki)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授  
研究者番号：30178868

### (2)研究分担者

深田 淳一 (FUKADA, Junichi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：50338159

川田 哲也 (KAWATA, Tetsuya)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員  
研究者番号：60234077

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者