

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10702

研究課題名(和文) 肥満・インスリン抵抗性を標的にしたメトホルミンの子宮体癌予防にむけた臨床的研究

研究課題名(英文) Clinical study of endometrial cancer prevention by metformin: targeting obesity and insulin resistance

研究代表者

三橋 暁 (Mitsubishi, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40302541

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)：子宮体癌は、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病の合併も多いことが確認された。インスリン抵抗性の獲得、糖尿病の発症に、Phosphatase 2A (PP2A)(セリン・スレオニン脱リン酸化酵素)の活性化が関与する。子宮体癌患者に対するメトホルミン投与で、投与前後でPP2AmRNAの発現が減弱し、免疫染色でもPP2A活性の低下が確認された。また、PPP2R4の抑制で子宮体癌細胞株の増殖活性の低下、アポトーシスの増加が確認された。メトホルミンは間接的にPP2Aの発現を抑制することで、インスリン抵抗性改善につながる。PP2Aの抑制は子宮体癌の予防、治療として有用な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Normal glucose metabolism, insulin resistance, and obesity were found to be highly prevalent in patients with endometrial cancer and atypical endometrial hyperplasia. Protein phosphatase 2A (PP2A) is a serine/threonine phosphatase that is associated with insulin resistance and type 2 diabetes. Preoperative metformin treatment significantly reduced PPP2R4 mRNA expression in endometrial cancer tissues and immunohistochemistry showed significantly decreased expression of the PP2A- subunit. PPP2R4 knockdown reduced cell proliferation and induced apoptosis in HEC265 and HEC1b cells by activating caspases 3/7. Metformin inhibited the growth of endometrial cancer cells in vivo by indirectly down-regulating PP2A- and PPP2R4. Inhibition of PP2A may become a preventive measure and a therapeutic strategy for endometrial cancer with insulin resistance.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 肥満 インスリン抵抗性 メトホルミン

## 1. 研究開始当初の背景

### 肥満・インスリン抵抗性と子宮体癌

子宮体癌は、肥満と強く関連した癌で、子宮体癌の発癌リスクは、BMI25 以上では、25 未満の女性と比較して 2-4 倍高い。また、インスリン抵抗性・糖尿病の合併が多く、ケースコントロール研究でも、インスリン・IGF-1 高値が高リスクであると報告されている。この肥満で増加している発癌リスクは、脂肪細胞でのアロマターゼ活性化による活性型 E2 の上昇、インスリン抵抗性に伴うインスリン・IGF-1・レプチンの上昇、炎症性サイトカインの増加(TNF、IL-6 等)が、関与している可能性が指摘されている。肥満女性の子宮内膜では非肥満女性と比較して、リン酸化 AKT・リン酸化 ERK の活性の上昇や Ki-67 の活性化が認められ、増殖活性が亢進していることがあきらかになっている。

われわれも、子宮体癌患者の 60%以上がインスリン抵抗性や耐糖能異常を有すること、若年者で特に肥満との関連が強いことを確認した。このような背景から、子宮体癌はメタボリックシンドロームとも位置づけられており、肥満・インスリン抵抗性をターゲットにした子宮体癌の化学予防の可能性について注目した。

### 子宮体癌とメトホルミン

メトホルミンは、糖尿病の治療薬だけでなく、糖尿病発症予防に有用であることが報告されている。このような糖尿病に対する効果に加えて、近年メトホルミンに癌の発生予防効果があることが注目を集めている<sup>3)</sup>。また、乳癌・子宮体癌では、メトホルミン服用患者は非服用患者に比べ予後が良い。

われわれもメトホルミンの子宮体癌への効果に注目し、子宮体癌培養細胞株で、増殖抑制効果を確認した。その作用機序として、AMPK の活性化による mTOR の抑制の他に、cyclin D1・Rb の抑制を介した G1 停止を確認した。さらに実際の子宮体癌患者にメトホルミンを投与し、in vivo でも同様に AMPK の活性化による mTOR の抑制と、ERK の抑制、Ki-67 などの増殖活性の減弱を確認した。この研究でメトホルミンはインスリン抵抗

性改善、IGF-1、レプチン等の糖代謝関連蛋白の減少から、間接的に子宮内膜癌組織の増殖活性を抑制することを明らかにした<sup>4)</sup>。

また、子宮体癌の medroxyprogesterone acetate(MPA)による温存療法の高い再発率が、メトホルミンを併用することで、80%減少することを報告してきた。メトホルミン服用による再発予防効果は、インスリン抵抗性など背景因子の改善による、新たな発症の予防とも位置づけられる。

## 2. 研究の目的

### (1)子宮体癌リスク因子を有する女性の子宮内膜に対するメトホルミンの効果の検討

本試験では、子宮体癌発癌リスクを有する女性、特に肥満女性の子宮内膜に対するメトホルミンの効果を確認することを目的とする。肥満患者に一定期間メトホルミンを投与し、子宮内膜における細胞周期蛋白、増殖シグナルの変化(ERK/AMPK-mTOR 経路関連蛋白)、インスリン抵抗性の改善を検証する。

メトホルミンは疫学的に糖尿病患者における発癌予防効果が報告されている薬剤である。今回の探索的試験では、メトホルミン投与により子宮内膜組織内での増殖関連蛋白の減少、及び血液中の増殖因子の低下を確認する。子宮体癌のリスク因子を有する女性に対して、メトホルミンに発癌予防効果が期待できるか検討する。

### (2)肥満細胞の子宮内膜増殖に関連する因子の探索

in vitro で脂肪細胞と子宮内膜細胞の関連を検討し、脂肪細胞の分泌するアディポサイトカインの正常子宮内膜に対する影響を明らかにし、メトホルミンによる抑制効果を確認する。

## 3. 研究の方法

### (1)子宮体癌リスク因子を有する女性の子宮内膜に対するメトホルミンの効果の検討

試験デザイン：探索的臨床試験

主要評価項目は、メトホルミン投与による子宮内膜への影響(ERK 発現の変化)の検討。

副次評価項目は、メトホルミン投与による子宮内膜への影響（S6、細胞周期蛋白,AKT, AMPK 発現の変化）の検討。メトホルミン投与による子宮内膜における増殖活性（Ki-67, Topo II 発現）の変化の検討。メトホルミン投与前後でのインスリン抵抗性、IGF-1、レプチン等の血清マーカーや、体重変化を比較する。メトホルミン投与前後の血清を用いた増殖抑制効果の確認を行う。

## （２）メトホルミンによる PP2A 抑制の検討

倫理委員会の承認のもと、同意の得られた子宮体癌患者（高・中分化型類内膜腺癌、1 期相当）の術前に、Met 750-2250mg/日投与し、服用前後の組織を採取した。Met 服用前後の組織で PP2A の発現を RT-PCR 法、免疫組織染色法で比較した。さらに子宮体癌細胞株で siRNA による PP2A 抑制実験を行い細胞増殖能を WST8 法で評価した。

## 4. 研究成果

（１）肥満・インスリン抵抗性など、子宮体癌リスクを有する女性に対し、同意のもとメトホルミンを投与して、投与前後の増殖活性変化を検討した（UMIN 000015470）。正常 4 名、子宮内膜増殖症 6 名登録し、9 例解析した。HOMA-R は投与前平均 4.96（2.35-9.88）、投与後平均 4.12（1.35-8.89）と 9 例中 8 例が改善していた。現時点では症例数が少なく有意差は確認できなかったが、短期間のメトホルミン服用で、HOMA-R は改善する傾向が確認された。一方、pERK や pAKT に減少を 3 例に認めただけで、有意な傾向は確認できなかった。

（２）子宮体癌は、肥満・インスリン抵抗性がリスクとなり、糖尿病の合併も多い。このインスリン抵抗性の獲得に、Phosphatase 2A (PP2A)(セリン・スレオニン脱リン酸化酵素)の活性化が関与していると報告されている。また、Okadaic acid や内因性の PP2A 抑制因子により癌の増殖が亢進するとの報告から、

PP2A は癌抑制因子と考えられている。しかし、癌腫によっては PP2A の抑制により、癌の増殖が抑制され、増殖因子との報告もある。これまで、子宮体癌患者に対するメトホルミン投与で、癌の増殖が抑制され、その抑制効果はインスリン抵抗性の改善による間接効果と考えた。そこで、メトホルミン投与時の PP2A の関与を検討したところ、投与前後で PP2AmRNA の発現が減弱し、免疫染色でも活性の低下が確認された。siRNA で PPP2R4 を抑制したところ、子宮体癌細胞株の増殖活性の低下、アポトーシスの増加が確認された。In vitro ではメトホルミン投与で PP2A の発現に変化はなく、この効果は直接的なものではなく、メトホルミン投与時の間接効果と考えられる。

（３）PP2A 抑制剤である LB100 で子宮体癌培養細胞株の増殖抑制効果が確認された。メトホルミンと LB100 の併用で、細胞増殖抑制効果が増強した。PPP2R 4 の抑制では ERK や S6 の低下は認めず、メトホルミンによる細胞増殖抑制効果と別の機序が働くものと推測している。

## 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 11 件)

1. Hanawa S, Mitsuhashi A, Shozu M. Antitumor effects of metformin via indirect inhibition of protein phosphatase 2A in patients with endometrial cancer. PLoS One. 2018;13(2):e0192759. 査読あり
2. Mitsuhashi A, Uehara T, Hanawa S, Shozu M. Prospective evaluation of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer. Support Care Cancer. 2017; 25(5):1495-501. 査読あり

3. Mitsuhashi A, Usui H, Nishikimi K, Yamamoto N, Hanawa S, Tate S, Watanabe-Nemoto M, Uno T, Shozu M. The Efficacy of Palonosetron Plus Dexamethasone in Preventing Chemoradiotherapy-induced Nausea and Emesis in Patients Receiving Daily Low-dose Cisplatin-based Concurrent Chemoradiotherapy for Uterine Cervical Cancer: A Phase II Study. *Am J Clin Oncol*. 2017; 40(2):118-121. 査読あり
  4. Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A, Shozu M, Maihle NJ, Carmichael GG, Taylor HS, Huang Y. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene*. 2017; 36(17) 2345-54. 査読あり
  5. Hanawa S, Mitsuhashi A, Matsuoka A, Nishikimi K, Tate S, Usui H, Uno T, Shozu M. Efficacy of palonosetron plus aprepitant in preventing chemoradiotherapy-induced nausea and emesis in patients receiving daily low-dose cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy for uterine cervical cancer: a phase II study. *Support Care Cancer*. 2016; 24(11):4633-8. 査読あり
  6. Usui H, Kiyokawa T, Qu J, Nishikimi K, Tate S, Mitsuhashi A, Nakatani Y, Shozu M. Comparison Between Pathological Diagnosis and Cytogenetic Diagnosis by Short Tandem Repeat Polymorphism Analysis of Suspected Molar Pregnancies. *J Reprod Med*. 2016;61(5-6):219-23. 査読あり
  7. Mitsuhashi A, Sato Y, Kiyokawa T, Koshizaka M, Hanaoka H, Shozu M. Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus metformin as a fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27(2):262-6. 査読あり
  8. Matsumoto K, Maeda H, Oki A, Takatsuka N, Yasugi T, Furuta R, Hirata R, Mitsuhashi A, Kawana K, Fujii T, Iwata T, Hirai Y, Yokoyama M, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Yoshikawa H; Japan HPV and Cervical Cancer (JHACC) Study Group. Human leukocyte antigen class II DRB1\*1302 allele protects against cervical cancer: At which step of multistage carcinogenesis? *Cancer Sci*. 2015; 106(10):1448-54. 査読あり
  9. Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyomaru T, Goto Y, Fukumoto I, Usui H, Mitsuhashi A, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2015; 47(1):325-34. 査読あり
  10. Hanawa S, Mitsuhashi A, Usui H, Yamamoto N, Watanabe-Nemoto M, Nishikimi K, Uehara T, Tate S, Uno T, Shozu M. Daily Low-Dose Cisplatin-Based Concurrent Chemoradiotherapy for the Treatment of Cervical Cancer in Patients 70 Years or Older. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25(5):891-6. 査読あり
  11. Uehara T, Mitsuhashi A, Tsuruoka N, Shozu M. Metformin potentiates the anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro. *Oncol Rep*. 2015; 33(2):744-50. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 9 件)
1. Mitsuhashi A. Long-term outcomes of medroxyprogesterone acetate plus metformin as fertility-sparing treatment for atypical

- endometrial hyperplasia and endometrial cancer. The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (Tokyo, Japan, 2017/11/30-12/2)
2. Kawai Y, Mitsuhashi A, Shozu M. et al. Spontaneous/mild ovarian stimulation for in vitro fertilization after fertility-preserving treatment for patients with endometrial cancer. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 (広島, 2017/4/13-16)
  3. Hanawa S, Mitsuhashi A, Shozu M. Antitumor effects of metformin via indirect inhibition of protein phosphatase PP2A in patients with endometrial cancer. 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS) (Lisbon, Portugal, 2016/10/29-31)
  4. 埜真輔、三橋暁、生水真紀夫. 子宮体癌組織の PP2A の発現はメトホルミン投与で抑制される. 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (米子 2016/7/8-10)
  5. 埜真輔、三橋暁、生水真紀夫. メトホルミン投与はインシュリン抵抗性を有する患者で子宮体癌組織の PP2A 発現を抑制する第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 (東京 2016/4/21-24)
  6. 三橋暁、他. 子宮体癌に対するメドロキシプロゲステロン+メトホルミン併用妊孕性温存療法の臨床第 2 相試験 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 (東京 2016/4/21-24)
  7. 三橋暁、他. 子宮体癌に対するメトホルミン療法の応用 第 16 回関東ホルモンと癌研究会 (東京 2016/1/30)
  8. 三橋暁、他. 子宮体癌患者の糖代謝異常・インスリン抵抗性の前方視的検討 第 30 回日本女性医学学会学術集会 (名古屋 2015/11/7-8)
  9. 三橋暁、他. メトホルミンはインスリン抵抗性改善による間接効果で子宮内膜癌の増殖を抑制する 第 88 回日本内分泌学

会 (東京 2015/4/23-25)

〔図書〕(計 1 件)

1. 三橋暁 特集/婦人科悪性腫瘍治療に対するドラッグリポジショニングの幕開け-既存薬に秘められた新たな可能性-糖尿病治療薬メトホルミンが子宮体がんに奏効する可能性. 産科と婦人科 2015; 82: 1099-1105.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/rinsyo/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

三橋 暁 (MITSUHASHI AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40302541

### (2)研究分担者

生水 真紀夫 (SHOZU MAKIO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30226302