

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10056

研究課題名(和文)メトホルミンを用いたがんの化学予防実現のための分子基盤の確立

研究課題名(英文)Detailed analysis of the molecular basis for cancer chemoprevention with metformin

研究代表者

飯泉 陽介 (Iizumi, Yosuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20533178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：数々の臨床試験から、がんの予防効果が見出されていた糖尿病治療薬メトホルミンについて、ナノ磁性ビーズへの固定化法を確立した。メトホルミン固定化ビーズを用いて、メトホルミン結合タンパク質を精製し、10種の新規メトホルミン結合タンパク質をMALDI-TOF型質量分析計を用いて同定することに成功した。同定されたタンパク質Bに基づく解析から、メトホルミンがタンパク質Bに直接結合し作用することで、糖新生抑制タンパク質を増加させ、糖新生を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに様々な手法を用いて、メトホルミンによるがん予防効果、がん抑制効果の分子メカニズムが解析されてきたが、メトホルミンが直接作用する標的タンパク質の同定には至っていなかった。本研究ではナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化法を開発することにより、メトホルミン結合タンパク質を10種同定することに成功した。これら10種の結合タンパク質の解析により、メトホルミンが有する様々な薬理作用の分子メカニズムを詳細に明らかにできる可能性がある。またタンパク質Bに基づく解析から、メトホルミンの抗糖尿病効果とそれに付随するがん予防効果に重要な糖新生阻害の新規メカニズムも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since the anti-diabetic agent metformin has been proved to have chemopreventive effects from several clinical trials, we established a method to immobilize metformin onto FG beads. Using metformin-immobilized FG beads, metformin-binding proteins were purified from HT-29 whole cell extracts, and ten novel metformin-binding proteins were identified with MALDI-TOF MS. Through analyzing one of the metformin-binding proteins, protein B, it was suggested that metformin increases the expression of a gluconeogenesis-suppressive protein and inhibits gluconeogenesis by directly binding to protein B.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー ナノ磁性ビーズ 結合タンパク質 -catenin 糖新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性新生物(がん)の罹患率は、我が国においても年々上昇しており、効果的ながんの予防法の確立が必要である。これまでの疫学研究から、複数の医薬品にがんの予防効果が期待されていて、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるアスピリンについては、がんの化学予防剤候補として我が国でも大規模臨床試験が行われている。しかし、アスピリンの長期投与による胃腸障害や出血のリスクがあるため、次いで期待されている医薬品が糖尿病治療薬メトホルミンである。メトホルミンは、ミトコンドリアのグリセロリン酸脱水素酵素(mGPD)を直接標的として、糖新生を阻害し抗糖尿病効果を発揮する(Nature, 2014; 510: 542-546)。これまでの疫学研究により、メトホルミンの服用によって、全がんの発生率が有意に減少することが明確になってきた(PLoS One, 2012; 7: e33411、国立国際医療研究センターによるメタ解析)。さらに、横浜市立大学のグループから、大腸ポリープ切除後のポリープの再発に対して、メトホルミンが予防効果を示したことが報告され、大きな注目を集めた(Lancet Oncol., 2016; 17: 475-483)。ポリープ発生に対して再発予防効果があったことから、メトホルミンの有する血糖降下作用だけでは、メトホルミンによるがん予防効果が説明できないことが明らかになってきた。

(2) メトホルミンは比較的安全で、健常人の常用も許容されることから、がんの予防剤としても期待されている。しかし、「メトホルミンがどのような分子メカニズムにより、がんの予防効果を発揮しているか」に関しては、アスピリンのように明確ではない。メトホルミンの直接の標的タンパク質(作用点)が見出せれば、そこから新規がん予防法を考察、提案することも可能になる。

2. 研究の目的

本研究課題では、ナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの手法を用いて、メトホルミンが直接結合し作用するヒト細胞内の結合タンパク質を網羅的に精製し、質量分析計を用いて同定する。そして、メトホルミンをがんの化学予防剤として安心して使用するための詳細な作用機序、分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) ナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化

本研究課題により開発したナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化法は、まだ論文として発表していないため、ここには始めに検証し開発した固定化法の基礎となった方法を記載する。2 mgのカルボキシ基を表面に有したナノ磁性ビーズ(FG beads)をジオキササンで3回洗浄し、ジオキササン中に分散させて、HOSuを0.023 gとEDC・HClを0.0384 g加えた。室温においてシェーカーで混合しながら、ナノ磁性ビーズを2時間反応させて、カルボキシ基を活性化させた。その後、ジメチルホルムアミドで3回洗浄し、DMSOに溶解したメトホルミンを活性化したナノ磁性ビーズと混合し室温で一晩反応させた。反応後のビーズに、ジメチルホルムアミドに1Mで溶解した2-アミノエタノールを加え室温で4時間反応させて、残存していた活性化したカルボキシ基をマスクした。その後、50%メタノール水溶液で3回、超純水で2回洗浄し、超純水に懸濁した状態でナノ磁性ビーズを冷蔵庫内で保存した。

(2) メトホルミン固定化ビーズを用いたメトホルミン結合タンパク質の精製と同定

ヒト大腸癌細胞株のHT-29細胞を大量培養し、スクレーパーを用いて培養皿から剥がし、遠心分離(2,000 rpm, 4 , 5分)によりHT-29細胞を回収した。そこに、NP-40 lysis buffer(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)を加え、時々混合しながら氷中で30分間反応させ、HT-29細胞を溶解した。遠心分離(15,000 rpm, 4 , 10分)により不溶性画分を沈降させ、上清をHT-29細胞の抽出液として回収した。(1)で作製したメトホルミン固定化ビーズをNP-40 binding buffer(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)で2回洗浄後、回収したHT-29細胞の抽出液と混合し、冷蔵庫内でローテーターを用いて混合しながら、メトホルミン固定化ビーズと細胞抽出液を4時間反応させた。その後、磁気スタンドを用いて反応後のメトホルミン固定化ビーズを回収し、NP-40 binding bufferで3回洗浄した。洗浄したビーズにサンプルバッファーを加え、98 で5分間加熱することで、結合したタンパク質をビーズから剥がし、サンプルバッファー中に溶解した。

メトホルミン固定化ビーズを用いて精製した結合タンパク質は、SDS-PAGE により分離し銀染色によって検出した。

銀染色にて検出された結合タンパク質を、剃刀を用いてバンドとして切り出し、銀染色の脱色、脱水、乾燥の後、結合タンパク質の還元・アルキル化、そして修飾トリプシンによるゲル内消化を行い、生じたペプチド断片をゲルから抽出した。抽出したペプチド断片の分子量を MALDI-TOF 型質量分析計 (Autoflex II) により測定し、Mascot を用いた peptide mass fingerprinting (PMF) 法により結合タンパク質を同定した。メトホルミンのがん予防効果において解析対象としたメトホルミン結合タンパク質 A、B に関しては、精製した結合タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、ウエスタンブロッティング法により、タンパク質 A、B が精製されているか否かも確かめた。

(3) 組換えヒトタンパク質を用いた、メトホルミンとタンパク質 A、B との直接結合の検証

メトホルミンのがん予防効果において解析対象としたメトホルミン結合タンパク質 A、B について、OriGene Technologies Inc. から C 末端に Myc タグと DDK タグを付した組換えタンパク質を購入した。Myc-DDK タグ付組換えタンパク質 A と B をそれぞれ、5 ng/μl に NP-40 binding buffer で希釈した。これらをメトホルミン固定化ビーズと混ぜ、冷蔵庫内でローテーターを用いて混合しながら、メトホルミン固定化ビーズと 4 時間反応させた。その後、磁気スタンドを用いて、反応後のメトホルミン固定化ビーズを回収し、NP-40 binding buffer で 3 回洗浄した。洗浄したビーズにサンプルバッファーを加え 98 °C で 5 分間加熱することで、結合したタンパク質 A、B をビーズから剥がし、サンプルバッファー中に溶解した。精製されたタンパク質 A、B は、SDS-PAGE により分離後、DDK タグに対する抗体 (OriGene Technologies Inc. TA50011-100) を用いたウエスタンブロッティング法により検出した。

(4) メトホルミンによる糖新生抑制タンパク質への影響の解析

正常肝細胞株の NCTC-1469 細胞にメトホルミンを添加し、24 時間、37 °C で培養した。培養後の NCTC-1469 細胞をスクレーパーで培養皿から剥がし、遠心分離 (2,000 rpm, 4 °C, 5 分) により NCTC-1469 細胞を回収した。そこに RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) を加え、ローテーターを用いて冷蔵庫内で 30 分間混合し、NCTC-1469 細胞を溶解した。遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10 分) により不溶性画分を沈降させ、上清を NCTC-1469 細胞の抽出液として回収した。この細胞抽出液を SDS-PAGE により分離し、糖新生抑制タンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、メトホルミンの糖新生抑制タンパク質の発現量への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化法の開発

メトホルミンに官能基としてアミノ基があったことから、始めにカルボキシ基を有するナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化を試みた。3 (1)に記載した常法により、ナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化反応を行い、反応後のナノ磁性ビーズと HT-29 細胞の抽出液を混合することで、メトホルミン結合タンパク質を精製し銀染色にて検出した。しかし、非固定化ビーズと同様に固定化反応を行ったビーズでも、タンパク質は全く精製されず、固定化されていないことがわかった。研究協力者の京都府立医科大学医学部医学科化学教室の伊藤幸裕先生 (現: 大阪大学産業科学研究所) に相談し、触媒や反応条件などの改善策を教えてください種々の条件を検討した。その結果、ナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化法が完成し、図 1 のようにメトホルミンと反応させたナノ磁性ビーズにより、結合タンパク質を精製することに成功した。



図1. メトホルミン結合タンパク質の精製

(2) メトホルミン結合タンパク質の同定

作製したメトホルミン固定化ビーズを用いて、メトホルミン結合タンパク質を HT-29 細胞の抽出液より大量に精製した。SDS-PAGE を用いて分子量により分離し銀染色にて検出し、修飾トリプシンによりゲル内消化を行い、生じたペプチド断片を MALDI-TOF 型質量分析計を用いて解析した。その結果、10 種類の新規メトホルミン結合タンパク質を同定することに成功した。これらの中には、メトホルミンの抗癌作用に関わるβ-catenin を制御することが示唆されているタンパク質 A とメトホルミンの抗糖尿病効果に関わる糖新生を制御することが示唆されているタンパク質 B が含まれていた。メトホルミンの薬効と関連性が高かったことから、タンパク質 A、B に着目した解析を進めた。まずタンパク質 A、B それぞれに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、同定されたタンパク質 A、B がメトホルミン固定化ビーズにより精製されていることを確かめた (図 2)。

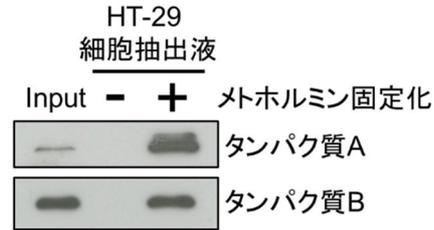


図2. タンパク質A、Bの精製の確認

(3) メトホルミンとタンパク質 A、B の直接結合の検証

Myc-DDK タグ付き組換えタンパク質 A、B それぞれとメトホルミン固定化ビーズを混合し反応させ、組換えタンパク質 A、B が精製されてくるか否かを検証した。図 3 のように、メトホルミン固定化ビーズにより組換えタンパク質 A、B はそれぞれ精製され、メトホルミンはタンパク質 A、B それぞれに直接結合することが明らかになった。

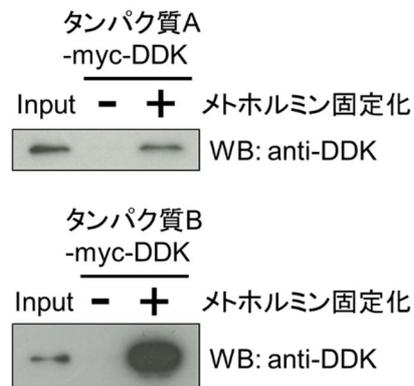


図3. タンパク質A、Bとの直接結合の検証

(4) タンパク質 B が制御する糖新生抑制タンパク質へのメトホルミンの影響の解析

メトホルミン結合タンパク質として同定されたタンパク質 B は、糖新生抑制タンパク質の発現を増加させることで糖新生を阻害することが報告されていた。メトホルミンとタンパク質 B は直接結合することから、メトホルミンがタンパク質 B に結合し活性化することで、糖新生抑制タンパク質の量を増加させ糖新生を阻害すると仮説を立てた。正常肝細胞株の NCTC-1469 細胞にメトホルミンを 24 時間添加し、ウエスタンブロッティングにより NCTC-1469 細胞内の糖新生抑制タンパク質の発現量の変化を解析した。図 4 のように、低濃度からメトホルミンは糖新生抑制タンパク質の発現量を増加させることが明らかになった。この結果は、メトホルミンが新規結合タンパク質 B を介して糖新生抑制タンパク質を増加させることで糖新生を阻害し、抗糖尿病効果とそれに付随するがん予防効果を発揮する可能性を示唆している。

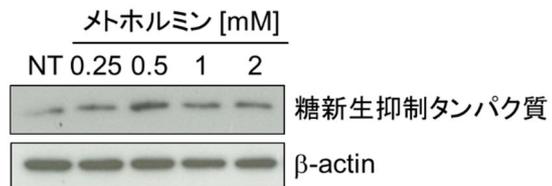


図4. 糖新生抑制タンパク質への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe Motoki, Yamada Yasumasa, Kurumida Yoichi, Kameda Tomoshi, Sukeno Mamiko, Iizuka-Ohashi Mahiro, Sowa Yoshihiro, Iizumi Yosuke, Takakura Hideki, Miyamoto Shingo, Sakai Toshiyuki, Mutoh Michihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Rabdosianone I, a Bitter Diterpene from an Oriental Herb, Suppresses Thymidylate Synthase Expression by Directly Binding to ANT2 and PHB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13050982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamoya Takahiro, Fujii Gen, Iizumi Yosuke, Narita Takumi, Komiya Masami, Matsuzawa Yui, Miki Kohei, Kondo Tadashi, Kishimoto Shinji, Watanabe Kenji, Wakabayashi Keiji, Sakai Toshiyuki, Toshima Jiro, Mutoh Michihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Artesunate inhibits intestinal tumorigenesis through inhibiting wnt signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 148 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 武藤倫弘、飯泉陽介、藤井元	4. 巻 38
2. 論文標題 【特集：環境因子と発がん】がん予防学の科学的・社会的側面と現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学 2020年7月号	6. 最初と最後の頁 1862 ~ 1866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umamura Shiori, Sowa Yoshihiro, Iizumi Yosuke, Kitawaki Jo, Sakai Toshiyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Synergistic effect of the inhibitors of RAF/MEK and AXL on KRAS-mutated ovarian cancer cells with high AXL expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2052 ~ 2061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chihara Yusuke, Iizumi Yosuke, Horinaka Mano, Watanabe Motoki, Goi Wakana, Morita Mie, Nishimoto Emi, Sowa Yoshihiro, Yamada Tadaaki, Takayama Koichi, Sakai Toshiyuki	4. 巻 56
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitor OBP-801 and amrubicin synergistically inhibit the growth of squamous cell lung carcinoma by inducing mitochondrial ASK1-dependent apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 848 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.4969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aono Yuichi, Horinaka Mano, Iizumi Yosuke, Watanabe Motoki, Taniguchi Tomoyuki, Yasuda Shusuke, Sakai Toshiyuki	4. 巻 505
2. 論文標題 Sulindac sulfone inhibits the mTORC1 pathway in colon cancer cells by directly targeting voltage-dependent anion channel 1 and 2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1203 ~ 1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.10.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Hisako, Sowa Yoshihiro, Horinaka Mano, Iizumi Yosuke, Watanabe Motoki, Morita Mie, Nishimoto Emi, Taguchi Tetsuya, Sakai Toshiyuki	4. 巻 171
2. 論文標題 The histone deacetylase inhibitor OBP-801 and eribulin synergistically inhibit the growth of triple-negative breast cancer cells with the suppression of survivin, Bcl-xL, and the MAPK pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-018-4815-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 武藤倫弘、渡邊元樹、飯泉陽介、増田光治、曾和義広
2. 発表標題 「がん予防」の定義を改めて考え、布石とする
3. 学会等名 第27回日本がん予防学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iizumi Yosuke、Taniguchi Tomoyuki、Goi Wakana、Sakai Toshiyuki
2. 発表標題 Identification of the target proteins of food factors with FG beads
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 幸裕 (Itoh Yukihiro) (30636402)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------