

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11640

研究課題名（和文）Biguanide薬剤Metforminの腫瘍細胞内微細環境特異的致死効果の解析

研究課題名（英文）Analyses of selective cytotoxicity of the anti-diabetic biguanide drug, Metformin, in solid tumor specific microenvironment

研究代表者

田野 恵三（TANO, Keizo）

大阪公立大学・大学院理学研究科・客員研究員

研究者番号：00183468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Metforminは2型糖尿病の第一選択薬として一般的に使用されている。Metforminを処方されている患者は、他の処方患者に比べてがんのリスクが低いことが知られており、がん予防薬としての可能性が強調されている。腫瘍細胞環境で特異的な低血糖下において、Metforminは腫瘍細胞内で特定のDNA損傷を誘発し、それが致死的な遺伝子病変であることを本研究で明らかにした。このことは、Metforminががん細胞に対し特異的な致死作用を有する可能性を示唆しており、Metforminを副作用の少ない抗がん剤として応用するうえで、致死誘導の原因と生成機序の理解の基盤となる情報を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗がん剤は正常細胞にも強く影響するため副作用がデメリットの一つである。Metforminは糖新生を抑制し血糖値を下げる作用から糖尿病治療薬として使用されており、一方、抗がん剤開発研究分野では、腫瘍細胞に特異的な致死効果を与える研究が進んでいる。腫瘍組織は血管不良に伴う低グルコース（低血糖）や低酸素など特徴的な微細環境下であり、それら環境要素は腫瘍の悪性化、また、放射線や化学療法の抵抗性獲得に関わっている。腫瘍組織環境下でのMetforminの作用機序と腫瘍細胞特異的致死効果を解明することは、新規抗がん剤や増感剤の開発、がん患者の負担軽減を目指す治療計画への知見として有益である。

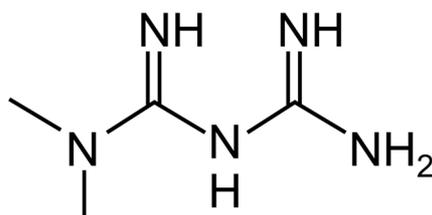
研究成果の概要（英文）：Metformin is commonly used as a first-line drug for type 2 diabetes. Patients prescribed metformin are known to have a lower risk of cancer than those prescribed other drugs, highlighting its potential as a cancer preventive. According to this study, under hypoglycemia, which is specific to the tumor cell environment, Metformin induces specific DNA damage in tumor cells, leading to a lethal genetic lesion. This suggests that metformin may have specific lethal effects on cancer cells and provides fundamental information for understanding the cause and mechanism of lethal induction when applying metformin as an anticancer drug with fewer side effects.

研究分野：放射線生物学 細胞生物学

キーワード：DNA損傷修復 ビグアノイド薬剤 腫瘍細胞内微細環境 DNAタンパククロソリンク損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



(Fig.1) Structure of Metformin

Metformin は、2 型糖尿病の治療薬として医療の第一線で投与されている薬剤である (Fig.1)。 「Metformin 処方患者は、他の薬剤処方患者より発癌リスクが 31% 低い」との疫学的報告があり (*Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(11): 1451-1461) Metformin のがん予防薬としての潜在性が注目されていた。一方、抗がん剤開発研究分野では、腫瘍組織微細環境に着目し、腫瘍細胞に特異的致死効果を与えることで、正常細胞が副次的に受ける影響を抑える研究が進んでいる。

申請者らは、Metformin による DNA 損傷誘発とその応答機構に視点を当て、ニワトリ DT40 細胞を用いて、(1) 腫瘍細胞特徴的環境の低グルコース下 Metformin 処理において高い致死効果が認められること、(2) DNA 架橋損傷 (DPCs) 修復に関与する FANCONI 遺伝子群の FANCC, FANCL 欠損細胞でより高い致死感受性を示すこと、以上二点を見いだし報告した (*PLoS ONE*, 2017, 12(9): e0185141)。低副作用と腫瘍細胞特異的致死効果を併せ持つ Metformin の抗がん剤応用を考える時、安全性と有効性の両面で期待値の大きい薬剤であるが故に、その作用機序を根本から解明する基礎研究が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

以下の 4 つを目的とした。

- (1) ヒトへの薬剤評価の指標となる基礎データを得るため、実験に使用する細胞は、これまでのトリ B リンパ細胞由来の DT40 細胞を用いた系からヒトリンパ細胞 TK6 の系にシフトする。
- (2) 低グルコース培養下で、Metformin により誘発されると予想される初期の DNA 損傷について、損傷の同定と生化学的な定量を行うための実験系を構築する。
- (3) Metformin により誘発される損傷が、Biguanide 系薬剤として一般化されるものであるか否かを検証する。
- (4) さらに、マウス実験系を用いて、腫瘍細胞内の微細環境下で Metformin が腫瘍細胞特異的な致死効果をもたらすか否かについての検証を行い、より生体に近いレベルでの解析の系を探索する。

これらの目的の初期設定は、Metformin の腫瘍環境特異的抗がん作用の検証実験にとどまらず、正常細胞と腫瘍細胞における細胞内 DNA 機構の損傷誘発の相違点についても基礎的な知見を得るものとして期待される。

3. 研究の方法

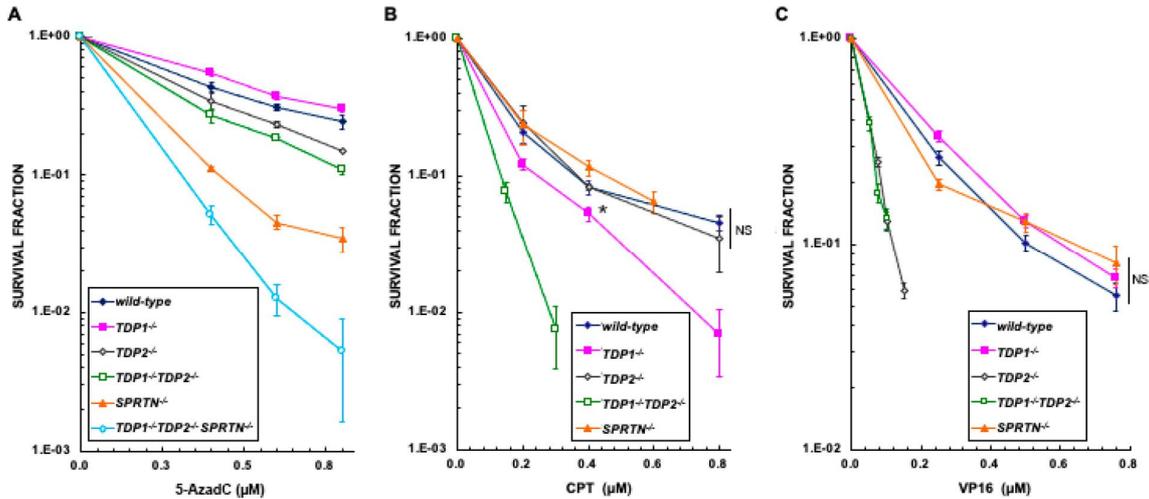
基本的な戦略は、ヒト B リンパ細胞由来の TK6 を用いた逆遺伝学的なアプローチによる実験を行い、その結果をもとに、マウス実験系を用いた生体レベルでの再現、検証を行う。主な方法は以下の通りである。

- (1) Metformin が誘発する初期 DNA 損傷の同定と定量を行う。
- (2) 低グルコース下の Metformin 処理により、DPCs 型の DNA 損傷を形成されることを示唆する結果は得ているが、形成される DPCs の同定と定量には至っていないため、細胞から直接 DNA を精製し、DPCs を同定、定量する。さらに、種々の抗体を用いて、DPCs を形成するタンパク種を同定する系を設定し解析する。
- (3) 染色体断裂を指標とした致死損傷誘発について解析する。
- (4) 低グルコース下 Metformin 処理による初期 DNA 損傷 (DPCs) が致死損傷を誘導することについて、致死 DNA 損傷である染色体断裂を指標に解析を進める。同様に、染色体分配異常の指標となる小核形成についても並行して解析する。
- (5) 腫瘍環境特異的抗がん剤や増感剤の開発につなげるため、マウス移植実験系を試みる。

4. 研究成果

(1) TDP1 欠損細胞は種々の DNA タンパククロスリンク (DPCs) 損傷に感受性を示す

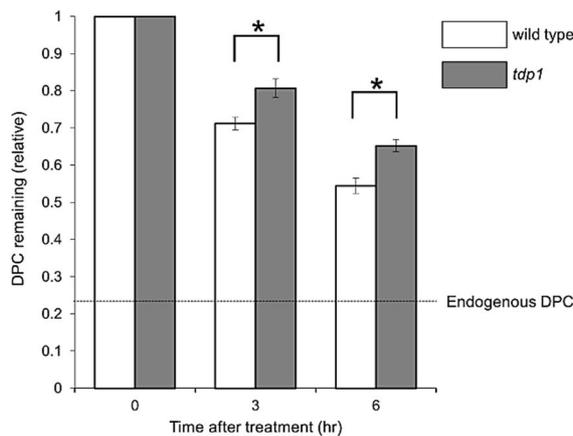
ニワトリ DT40 細胞における解析結果をもとに、ヒト B リンパ細胞由来の TK6 についても、種々の DNA タンパククロスリンク (DPCs) 誘発薬剤に対する感受性を比較した (Fig.2)。TDP1 欠損細胞が、従来の報告にある Camptothecin (CPT) に加えて Etoposide (VP-16) Formaldehyde (FA) Azacytidine (AzdC) に対して感受性を示すことを見いだした。さらに、低グルコース下の Metformin に対して感受性を示すことを見いだした。この結果は、低グルコース下で、Metformin が DPCs 様の DNA 損傷を誘発することを示唆した (*Chem. Res. Toxicol.*, 2022, 35(11): 2059-2067)。



(Fig.2) *SPRTN* and *TDP1*^{-/-}*TDP2*^{-/-} TK6 cells are hypersensitive to 5-azadC.

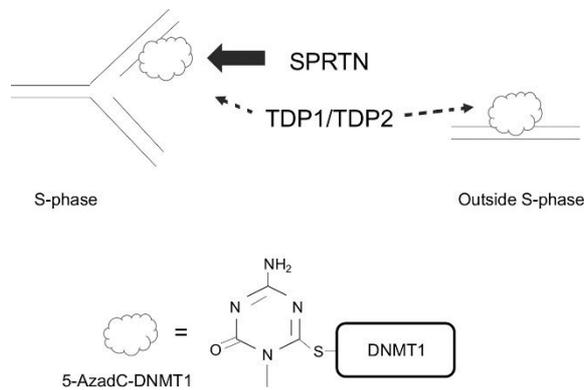
(2) TDP1 は、TOP1-DPCs のみならず FA が誘発する DPCs の除去にも関与する

TDP1 は、Topoisomerase 1 (TOP1) と DNA の異常結合 (TOP1-DPCs) の解除に関わるとされてきた。FA 処理した細胞から DNA を精製し、FITC ラベルで DPCs 総量を定量した結果、TDP1 が FA 誘発 DPCs の除去に直接関与することを明らかにした (Fig.3)。これは、DNA 鎖切断を伴わない DPCs の除去に TDP1 が関与するという初めての報告となる (*PLOS ONE*, 2020, 15(6): e0234859)。

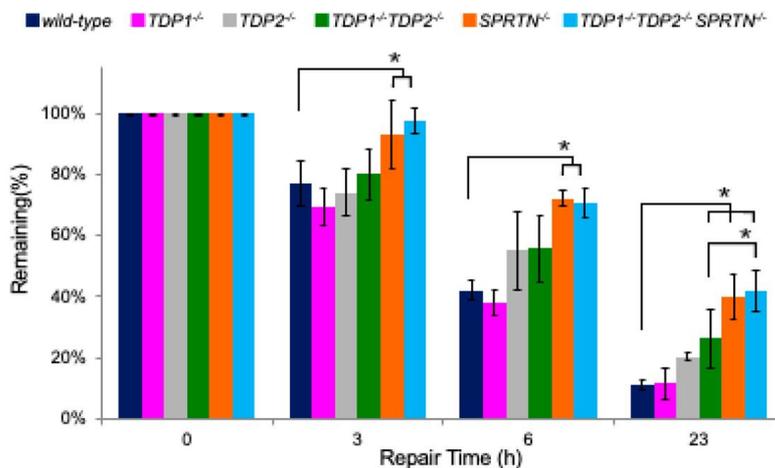


(Fig.3) Repair of formaldehyde-induced DPCs is compromised in *tdp1* cells.

(3) Dnmt1-DPCs の除去には *SPRTN* と TDP1, TDP2 が関与する



AzadCは、DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) を選択的にDNA上にトラップし、Dnmt1-DPCsを形成する。ヒトTK6細胞のSPRTN欠損細胞がAzadCに感受性を示した。これは、AzadCで誘発されるDnmt1-DPCsの分解にSPRTNが関わることを示す。AzadCで処理した細胞からDNAを直接精製し、抗Dnmt1抗体を用いて定量を行った結果、SPRTN欠損細胞ではDnmt1-DPCsの除去が遅れること、SPRTN/TDP1/TDP2三重欠損細胞ではこの遅延が増大することから、DNMT1-DPCsの除去にSPRTN, TDP1, TDP2が直接関与することを見いだした。これはTDP1とTDP2が、Dnmt1-DPCsの解除にSPRTNと相補的に関わる最初の報告でもある (Fig.4)。さらに、初期損傷であるDnmt1-DPCsは細胞分裂過程で染色体分配異常による小核を形成し、最終的に致死損傷である染色体裂を誘発することを見いだし報告した (Chem. Res. Toxicol., 2022, 35(11): 2059-2067)。



(Fig.4) Removal of 5-azadC-induced DNMT1-DPCs is delayed in *SPRTN*^{-/-} TK6 cells.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Moriwaki Takahito, Tsuda Masataka, Miyakawa Misa, Hanaichi Yuto, Sasanuma Hiroyuki, Hirota Kouji, Kawanishi Masanobu, Ide Hiroshi, Tano Keizo, Bessho Tadayoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 SPRTN and TDP1/TDP2 Independently Suppress 5-Aza-2 -deoxycytidine-Induced Genomic Instability in Human TK6 Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2059 ~ 2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00213	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 該当する
1. 著者名 T. Moriwaki, A. Yoshimura, Y. Tamari, H. Sasanuma, S. Takeda, M. Seki, K. Tano	4. 巻 43
2. 論文標題 PRDX1 is essential for the viability and maintenance of reactive oxygen species in chicken DT40	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-021-00211-4	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 Toshiaki Nakano, Mahmoud I. Shoulkamy, Masataka Tsuda, Hiroyuki Sasanuma, Kouji Hirota, Minoru Takata, Shin-ichiro Masunaga, Shunichi Takeda, Hiroshi Ide, Tadayoshi Bessho, Keizo Tano	4. 巻 15
2. 論文標題 Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234859	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 該当する
1. 著者名 Shin-ichiro Masunaga, Yu Sanada, Keizo Tano, Yoshinori Sakurai, Hiroki Tanaka, Takushi Takata, Minoru Suzuki, Koji Ono	4. 巻 61
2. 論文標題 An attempt to improve the therapeutic effect of boron neutron capture therapy using commonly employed 10B-carriers based on analytical studies on the correlation among quiescent tumor cell characteristics, tumor heterogeneity and cancer stemness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 876-885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa048	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 Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Takata T, Suzuki M, Sanada Y, Tano K, Maruhashi A and Ono K	4. 巻 95
2. 論文標題 Effect of a change in reactor power on response of murine solid tumors in vivo, referring to impact on quiescent tumor cell population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Radiat. Biol.	6. 最初と最後の頁 635-645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2019.1558300	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 Masunaga S, Tano K, Sanada Y, Suzuki M, Takahashi A, Ohnishi K and Ono K	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of p53 status of tumor cells and combined treatment with mild hyperthermia, wortmannin or caffeine on recovery from radiation-induced damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J. Oncol.	6. 最初と最後の頁 132-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/wjon1203	査読の有無 無
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 Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Takata T, Suzuki M, Sanada Y, Tano K, Maruhashi A and Ono K	4. 巻 95
2. 論文標題 Usefulness of combination with both continuous administration of hypoxic cytotoxin and mild temperature hyperthermia in boron neutron capture therapy in terms of local tumor response and lung metastatic potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Radiat. Biol.	6. 最初と最後の頁 1708-1717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2019.1666214	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 Sanada Y, Sasanuma H, Takeda S, Tano K, Masunaga S	4. 巻 94
2. 論文標題 Disruption of Hif-1 enhances cytotoxic effects of metformin in murine squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2018.1409443	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野敏彰、津田雅貴、森脇隆仁、笹沼博之、川西優喜、鹿園直哉、井出博、田野恵三
2. 発表標題 azadCによって生じるDNMT1-DPC損傷の修復に関わるSPRTNとプロテオソーム依存的経路の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敏彰、津田雅貴、森脇隆仁、笹沼博之、川西優喜、赤松憲、井出博、田野恵三
2. 発表標題 DNMT1-DNAクロスリンク損傷の修復に関わるSPRTNとプロテオソーム依存的経路の働き
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敏彰、笹沼博之、津田雅貴、廣田耕志、赤松憲、川西優喜、武田俊一、井出博、田野恵三
2. 発表標題 DNAタンパク質クロスリンク損傷修復におけるSPRTNの関与
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野敏彰、笹沼博之、津田雅貴、廣田耕志、赤松憲、川西優喜、武田俊一、井出博、田野恵三
2. 発表標題 SPRTNはazadCによって導入されたDPCの修復機構に関与している
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiaki Nakano, Mahmoud Shoulkamy, Masataka Tsuda, Hiroyuki Sasanuma, Shin-ichiro Masunaga, Shunichi Takeda, Hiroshi Ide, Tadayoshi Bessho, Keizo Tano
2. 発表標題 How does TDP1 exert in DNA-protein cross- links repair mechanism?
3. 学会等名 ACEM/JEMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤池春奈、Mahmoud Shoulkamy、Amir Salem、津田雅貴、笹沼博之、増永慎一郎、武田俊一、井出博、田野恵三
2. 発表標題 脊椎動物におけるDNA-タンパク質クロスリンク損傷修復へのTDP1, TDP2遺伝子産物の関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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 分担者	増永 慎一郎 (Masnaga Shinichiro) (80238914)	大阪府立大学・研究推進機構・客員研究員 (24403)	
研究 分担者	川西 優喜 (Kawanishi Masanobu) (70332963)	大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授 (24403)	

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
---------	---------