

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16214

研究課題名（和文）悪性腫瘍の発生・転移においてDPP-4が演じる分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms by which DPP-4 plays a role in the development and metastasis of malignant tumors

研究代表者

高垣 雄太（TAKAGAKI, Yuta）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50759123

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：in vitroにおいてDPP-4阻害薬投与によりCXCL12/CXCR4シグナル依存的にmTORが活性化し、EMTプログラムが誘導されること、in vivoではCXCR4阻害薬投与により腫瘍サイズの縮小・転移が抑制されることを確認した。また、DPP-4をノックダウンした乳癌細胞はEMTプログラムの誘導を介してドキソルビシンへの耐性を獲得することが明らかとなった。手術標本を用いた検討ではStage Iの乳癌組織においてDPP-4の発現が増加、CXCR4の発現が減少しているもの、およびStage IVの乳癌組織においてDPP-4の発現が減少、CXCR4の発現が増加するものがあることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は癌のリスクが上昇することが知られており、2倍以上リスクが増加する癌種もあり、糖尿病治療薬により発癌、病期進行を来す可能性に関しては十分な検討が必要である。本研究の結果は現在、その優れた血糖降下作用や低血糖リスクの少なさから、高齢者を含めた多くの患者に使用されている、DPP-4阻害薬の新たなリスクの可能性を明らかにすることで、より病態に応じた使い分けを行う指標となる。

研究成果の概要（英文）：In vitro, DPP-4 inhibitor treatment induced EMT program by activating mTOR in a CXCL12/CXCR4 signaling-dependent manner, and in vivo, CXCR4 inhibitor treatment reduced tumor size and suppressed metastasis. In addition, DPP-4 knockdown breast cancer cells acquired resistance to doxorubicin through induction of the EMT program. Using surgical specimens, we found that DPP-4 expression was increased and CXCR4 expression was decreased in Stage I breast cancer tissues, while DPP-4 expression was decreased and CXCR4 expression was increased in Stage IV breast cancer tissues.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 DPP-4 癌

## 1. 研究開始当初の背景

DPP-4 阻害薬は現在の糖尿病治療の中心的役割を担う薬剤の一つである。DPP-4 阻害薬は食後、腸管から血中に分泌され膵臓からのインスリン分泌を促進させるインクレチンホルモン分解を阻害することで、血糖依存性に血糖降下作用を有するため、比較的低血糖のリスクが少ない薬剤と考えられており、また国内外で実施された第Ⅲ相試験の中には日本人に対する血糖降下作用が高いとする報告もあり、あらゆる年代・病態の患者に幅広く使用されている。また、DPP-4 阻害薬はその血糖降下作用のみでなく基礎研究や幾つかの臨床研究では、細小血管合併症の発症・進展を抑制する可能性も示唆される。DPP-4 はセリンプロテアーゼとして働くのみならず、膜結合タンパクとして細胞内外の分子と相互作用を行うことが知られており、実際に我々のグループでは、STZ 誘導 1 型糖尿病マウスに DPP-4 阻害薬リナグリプチンを投与することで腎線維化の抑制を認めることを報告している。この変化は DPP-4 阻害薬が TGF- $\beta$ /smad 経路の抑制を介し線維芽細胞の起源として考えられている内皮間葉系細胞移行 (EndMT) プログラムを抑制することに起因することが示唆された。また、予備的検討において STZ 誘導 1 型糖尿病マウスにウシ血清アルブミン (BSA) を腹腔投与し、近位尿細管障害モデルを作成。このモデルでは尿細管間質の線維化および、近位尿細管で上皮間葉系移行 (EMT) プログラムが誘導されており、DPP-4 阻害薬テネリグリプチン投与はこれらを抑制した。EMT プログラムは臓器線維化の鍵を握る筋線維芽細胞の起源の一つとして考えられている。しかし予想外な事に、非糖尿病マウスに対し同様の検討を行った際、DPP-4 阻害薬は EMT 誘導因子である Snail の遺伝子発現を増加させた *In vitro* でも正常な乳腺上皮細胞および 2 種類の乳癌細胞株を用いた予備的検討では siRNA 投与による DPP-4 阻害は正常乳腺上皮細胞・乳癌細胞の両者において EMT プログラムを誘導した。

多くの研究から TGF- $\beta$ /smad 経路, EMT プログラムは癌細胞の初期段階の播種、転移に重要であることが示唆されている。また最近の研究では EMT プログラムを起こした細胞は化学療法や低酸素状態に対する抵抗性を獲得することが明らかとなっており、今後の癌治療において、化学療法に併せて EMT プログラムをターゲットとした治療に注目が集まっている。前述の我々の予備的検討では DPP-4 阻害薬投与により癌の転移や薬剤耐性獲得が助長される可能性が示唆された。実際に本年に入り Wang らにより DPP-4 阻害薬 (サキサグリプチン・シタグリプチン) 投与が複数の由来の癌細胞株において浸潤・転移を増加させたとの報告がなされている。現在までに少数ではあるが、糖尿病治療薬と糖尿病の関連についての研究は行われており、ピオグリタゾンが膀胱癌のリスクを増加させるとの報告やその一方でメトホルミンが癌のリスクを減少させるとの報告もある。癌は糖尿病の重要な並存疾患であり、糖尿病患者では癌のリスクが増大する。既存の報告では肝癌、膵癌および子宮体癌では 2 倍以上、大腸癌、乳がんおよび膀胱癌のリスクも 1.2~1.5 倍増加するとされている。90%以上の癌死は癌の全身への浸潤や転移が関与するとされており、DPP-4 阻害が癌に及ぼす影響について詳細な検討が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

癌は糖尿病患者死因の 30%以上を占め、糖尿病状態及び糖尿病治療薬が癌の発症進展機序にもたらす影響の理解は重要な研究課題である。近年 dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬は 70%近くの糖尿病症例に処方されているが、DPP-4 は多面的作用を有する蛋白であり、その阻害がもたらす全体像の把握は十分でない。我々は予備的検討で、糖尿病腎において DPP-4 阻害が臓器線維化の鍵を握る筋線維芽細胞の起源と考えられている上皮間葉系移行 (EMT) プログラムを抑制することを見出した。しかしながら予想に反して、正常乳腺上皮細胞・乳癌細胞を用いた解析において、DPP-4 阻害により EMT プログラムは逆に誘導され、さらに異種乳癌細胞移植マウスでは DPP-4 阻害により肺転移が増加した。この結果は病態・臓器によって DPP-4 阻害が及ぼす影響が異なることを示唆する。DPP-4 の基質である C-X-C motif chemokine 12(CXCL12)はその受容体 CXCR4 に結合し、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を介して EMT プログラムを誘導し腫瘍の増殖や転移に影響を及ぼすことが知られている。本検討では遺伝子改変乳癌細胞に DPP-4 阻害薬を投与し、遺伝子発現の網羅的解析・分子生物学的手法を用いて責任となるシグナル分子の同定を行う。本研究により DPP-4 阻害が癌細胞、担癌個体に及ぼす影響の全体像の把握及び、癌細胞における DPP-4 の生物学的意義を明らかにする事が出来る。

## 3. 研究の方法

悪性腫瘍の発生・転移において DPP-4 が演じる分子機構を明らかにする為に下記項目を検討した。

- (1) ヒト由来の培養乳癌細胞において siRNA により DPP-4 をノックダウンし、表現系・EMT プログラムに関して検討する。
- (2) マウス由来の高転移性乳癌細胞株をマウスに移植し、DPP-4 阻害薬を投与し、腫瘍の広が

り、表現形に関して検討する。

(3) 高転移性乳癌細胞株においてレンチウイルスを用いて DPP-4 をノックダウン、CXCL12 を過剰発現させマウスに移植し、腫瘍の広がり、表現系に関して検討する。

(4) 乳癌患者より摘出した乳癌細胞において DPP-4 および CXCL12 の発現を解析し、腫瘍の広がりとの相関に関して検討する。

(1) ヒト由来の培養乳癌細胞において siRNA により DPP-4 をノックダウンし、表現系・EMT プログラムに関して検討する。

ヒト由来正常乳腺上皮細胞(MCF10A)、低転移性乳癌細胞(MCF7)、高転移性乳癌細胞(MDA-MB-231)において DPP-4 siRNA を用いて DPP-4 をノックダウンし、細胞の表現系および、EMT プログラムについて蛋白発現の解析を行い検討する。

(2) マウス由来の高転移性乳癌細胞株をマウスに移植し、DPP-4 阻害薬を投与し、腫瘍の広がり、表現形に関して検討する。

マウス由来高転移性乳癌細胞(4T1 細胞)を正常マウス(BALB/c)の乳腺組織に移植し、DPP-4 阻害薬(KR-62436)を投与、原発巣のサイズ、肺転移の個数および、原発巣・転移巣の組織学的解析を行う。また、DPP-4 阻害による腫瘍の表現系変化に影響を及ぼす責任シグナル分子を同定する。

(3) 高転移性乳癌細胞株においてレンチウイルスを用いて DPP-4 をノックダウン、CXCL12 を過剰発現させマウスに移植し、腫瘍の広がり、表現系に関して検討する。

高転移性乳癌細胞株(4T1 細胞)においてレンチウイルスを用いて DPP-4 shRNA、および CXCL12 の過剰発現を行い、マウスに移植。腫瘍の広がり、表現形に関して検討する。

(4) 乳癌患者より摘出した乳癌細胞において DPP-4 および CXCR4 の発現を解析し、腫瘍の広がりとの相関に関して検討する。

金沢医科大学病院で摘出された乳癌組織における DPP-4 および CXCR4 の蛋白発現を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) DPP-4 siRNA 投与により正常乳腺、低転移性乳癌細胞および高転移性乳癌細胞で EMT プログラムが誘導された。

DPP-4 siRNA 投与により MCF10A 細胞、MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞は、紡錘形へと変化し、ウェスタンブロット法を用いた蛋白発現解析では有意に上皮マーカー E-cadherin の減少および間葉系マーカー  $\alpha$  SMA の増加を認め EMT プログラムが誘導されることを確認した。また、DPP-4 siRNA 投与群ではコントロール siRNA 群と比較して DPP-4 の基質である CXCL12 の受容体 CXCR4 発現の増加および、mTOR 経路の誘導を認めた。CXCR4 阻害薬 AMD3100 および mTOR 阻害薬ラパマイシン投与は DPP-4 siRNA により誘導される EMT プログラムを抑制した。

(2) DPP-4 阻害薬 KR-62436 投与により、原発巣のサイズの増大、肺転移巣の個数の増加および、原発巣・転移巣で EMT プログラムの誘導を認めた。

4T1 細胞を BALB/c マウスの乳腺組織に移植。DPP-4 阻害薬投与群ではビークル群と比較して原発巣サイズの増大、肺転移巣の個数の増加を認めた。また、原発巣・転移巣において蛋白発現解析では上皮マーカー E-cadherin の減少、および間葉形マーカー  $\alpha$  SMA の増加を認め、EMT プログラムが誘導されることを確認した。実験 1 と同様に CXCR4 阻害薬 AMD3100 および mTOR 阻害薬ラパマイシン投与は DPP-4 siRNA により誘導される EMT プログラムを抑制し、さらに原発巣のサイズ・肺転移巣の個数を減少させた。

(3) DPP-4 をノックダウン 4T1 細胞では腫瘍増殖能の増大、EMT プログラムの誘導および肺転移巣の増加を認めた。

shRNA を用いて DPP-4 を 4T1 細胞でノックダウンし、実験 2 同様に BALB/c マウスの乳腺組織に移植したところ、EMT プログラムの誘導および肺転移巣の個数の増加を認めた。ラパマイシンおよびメトホルミンを介した mTOR 阻害により、この EMT プログラムは抑制され、また肺転移巣の個数が減少することが明らかとなった。

(4) 腫瘍組織での DPP-4 および CXCR4 の発現量は、乳癌患者の予後に関与する可能性が示唆された。

実際の患者の予後と手術時の標本での DPP-4 及び CXCR4 の発現量の相関に関しての検討を行なったところ、Stage I の乳癌組織において DPP-4 の発現が増加、CXCR4 の発現が減少しているもの、および Stage IV の乳癌組織において DPP-4 の発現が減少、CXCR4 の発現が増加

するものがあることが見出された。

#### 考察

糖尿病患者は非糖尿病患者と比較して癌の有病率が高く、経口血糖降下薬の中には癌の分子機構に影響を及ぼす可能性のあるものも存在する。よって糖尿病治療戦略構築のためには、経口血糖効果薬が発癌・転移に及ぼす影響の詳細な検討は非常に重要となる。本研究では、我々は DPP-4 阻害薬の多面的な効果に関して検討を行なった。我々は本検討で、①DPP-4 siRNA および阻害薬投与による DPP-4 の抑制が、ヒトおよびマウス由来の乳癌細胞において EMT プログラムを誘導すること、②DPP-4 阻害薬投与は基質である CXCL12 の増加のみならず、CXCL12 の受容体である CXCR4 の増加をきたすこと、およびその下流シグナルの mTOR の活性を誘導すること、③CXCR4 阻害薬 AMD3100 および mTOR 阻害薬ラパマイシンは DPP-4 阻害薬投与により誘導される EMT プログラムを抑制することを確認した。

一般的に糖尿病治療薬を用いた臨床研究が行われる際には、担癌患者は除外されるため、担癌糖尿病症例に対して DPP-4 阻害薬を投与する安全性に関しては未だに明らかでないことも多い。しかし、一部では DPP-4 阻害薬は NRF2 の誘導を介して癌の転移を増加させるとの報告もある。我々は本検討においては DPP-4 がサイトカインのプロセッシングに与える影響を中心に解析を行った。CXCL12 は DPP-4 により不活性化されることが知られている。CXCL12 とその特異的な受容体の CXCR4 は血管新生や腫瘍の増殖に影響を与えることが知られている。さらに mTORC1 は細胞増殖や CXCR4 を介した腫瘍の浸潤を抑制することおよび mTOR 阻害薬ラパマイシンは腫瘍原発巣の縮小および CXCR4 を介したリンパ節転移を減少させてマウスの寿命を延長させたとの報告がある。mTOR ノックダウンにより培養大腸癌細胞で上皮マーカーの増加および間葉系マーカーの減少を認めるとの報告がある。これらの背景から、我々の結果は、DPP-4 阻害薬は乳癌細胞において CXCL12/CXCR4 および mTOR 経路活性化を介して EMT を誘導すると考えられる。

#### 結論

我々は DPP-4 阻害が CXCL12/CXCR4 を介した mTOR 活性化により誘導される EMT プログラムにより乳癌の転移を増加させる可能性を明らかにした。これらの結果は現在、低血糖リスクを含め比較的的安全性の高いと考えられている DPP-4 阻害薬の潜在性リスクを示唆するものである。その一方で、EMT プログラムは癌の転移・浸潤能・化学療法耐性獲得に関与するとの報告もあり、本検討は DPP-4 の癌治療ターゲット分子としての可能性も示唆すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yang Fan, Takagaki Yuta, Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Li Jinpeng, Kitada Munehiro, Kumagai Asako, Kawakita Emi, Shi Sen, Kanasaki Keizo, Koya Daisuke	4. 巻 79
2. 論文標題 Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial?Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 735 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0620	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 Kawakita Emi, Yang Fan, Kumagai Asako, Takagaki Yuta, Kitada Munehiro, Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Nakamura Yuka, Ishigaki Yasuhito, Kanasaki Keizo, Koya Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Metformin Mitigates DPP-4 Inhibitor-Induced Breast Cancer Metastasis via Suppression of mTOR Signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 61 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0115	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川北恵美、熊谷麻子、高垣雄太、金崎啓造、古家大祐
2. 発表標題 メトホルミンとDPP-4阻害薬の併用が乳癌細胞の肺転移に与える影響についての検討
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Takagaki, FanYang, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya
2. 発表標題 Dipeptidyl peptidase-4 inhibition may accelerates cancer metastasis via SDF-1/CXCR4 pathway dependent epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 the 2018 Asia Islet Biology & Incretin Symposium (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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