

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23889

研究課題名(和文)大腸癌における癌幹細胞及びEMT制御に関するメトホルミンの作用機序の解析

研究課題名(英文) Mode-of-action analysis of metformin to inhibit the epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells in colon cancer

研究代表者

高倉 有( Takakura, Yuji )

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：20581698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌化学放射線治療抵抗性における上皮間葉移行(EMT)及び癌幹細胞の関与を明らかにするとともに、メトホルミンによるEMT阻害効果を確認するために以下の検討を行った。まず、臨床検体を用いた検討では、直腸癌術前化学放射線治療症例において、病理学的完全奏功が得られなかった症例のうち、CD44高発現症例は有意に無再発生存率が低い傾向にあった。大腸癌細胞株LoVo、DLD-1を用いた検討で、スフェロイド培養モデルを樹立し、コントロールと比較してCD44/CD133陽性細胞比率が増加していることを確認した。細胞傷害実験で抗癌剤へのメトホルミン添加によって細胞傷害作用の増強効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直腸癌は大腸癌の中でも治療成績が不良であり、局所再発率が高値であるため、いかに局所制御率を向上させるかが課題である。直腸癌に対する化学放射線治療は局所制御率を向上させる有効な治療法と認識されているものの、それでも局所再発率は依然10%程度にのぼる。化学放射線治療抵抗性への上皮間葉移行(EMT)及び癌幹細胞の関与を検討する今回の我々の検討では、臨床検体を用いた解析で大腸癌幹細胞のマーカーであるCD44高発現症例において有意に再発率が高値であった。直腸癌の治療抵抗性には大腸癌幹細胞が関与している可能性があり、さらなる研究成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to analyze the relationship between epithelial-mesenchymal transition (EMT), cancer stem cells (CSC) and chemoradiotherapy resistance in rectal cancer. We also evaluate the inhibition of metformin on EMT. Analysis of rectal cancer patients who received preoperative chemoradiotherapy, patients with CD44 highly-positive tumor showed significantly poor relapse-free survival in non-pCR patient group. We successfully generated the spheroid from colon cancer cell line, LoVo and DLD-1. Ratio of CD44+/CD133+ cells were increased in spheroid cells in compared with control cells.

研究分野：大腸外科

キーワード：直腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

直腸癌における放射線治療は手術療法、化学療法と並ぶ重要な治療手段である。欧米においては、進行直腸癌における術前化学放射線治療(chemoradiation therapy:CRT)が標準治療とされているが、治療に奏功しない症例や、手術後に早期に再発を来す症例にも遭遇する。

近年、治療抵抗性の機序に放射線誘発性の上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal transition: EMT)が関与しているという報告がある。EMTにより、癌は上皮としての特性を失い周辺組織に移動しやすい間葉系細胞としての特徴を獲得することで癌が浸潤、転移能を獲得するとされる。

腫瘍からのTransforming growth factor- (TGF- )

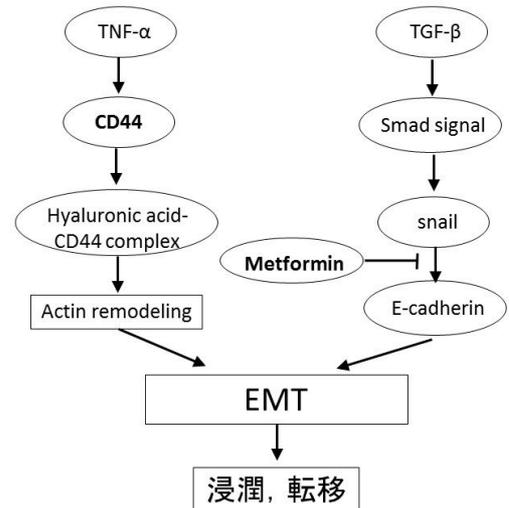
などの成長因子が上皮固形癌における EMT 誘発因子であると考えられている。近年の基礎研究では、乳癌の癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)において古くから使用されているメトホルミンが、TGF による E-カドヘリンの発現抑制を阻害することにより EMT を制御することが報告されている。(1)

以前からメトホルミンを内服している糖尿病患者におけるがん罹患率、がん死亡率の低下が観察されたことから、メトホルミンにはなんらかの抗腫瘍効果があるのではと考えられてきた。近年、大きな疫学研究や、基礎研究、動物実験、一部の臨床試験(melanoma, 前立腺癌、膵臓癌)においてメトホルミンの抗腫瘍効果が確認されている。(2)3)4) つまり、メトホルミンには抗腫瘍

効果があることが推定されるものの、その作用機序の解明にまでは明らかになっていない。

CSC は EMT に関与していると考えられており、メトホルミンの抗腫瘍効果には CSC を介した EMT 制御が関与している可能性がある。(Fig. 1)

Fig. 1: EMTにおけるCD44, Metforminの関与



## 参考文献

- 1) Cufi S, Vazquez-Martin A, et al. Metformin against TGFβ-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis. Cell cycle. 9 (22); 4461-4468, 2010.
- 2) Li K, Zhang, TT, et al. Metformin suppresses melanoma progression by inhibiting KAT5-mediated SMAD3 acetylation, transcriptional activity and TRIB3 expression. Oncogene. 37; 2967-2981, 2018.
- 3) Richards KA, Liou JI, et al. Metformin use is associated with improved survival for patients with advanced prostate cancer on androgen deprivation therapy. J Urol. 200(6): 1256-1263, 2018.
- 4) Kordes S, Pollak M.N, et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. Lancet Oncol. 16(7); 839-847, 2015.

## 2. 研究の目的

(本研究の目的及び学術的独自性と創造性)

本研究の目的は、大腸癌領域において、予後が不良であるとされる直腸癌のさらなる治療成績向上を目指して、メトホルミンの治療薬としての可能性を探索することである。まず、その足掛かりとして、直腸癌における CRT へのメトホルミン併用による抗腫瘍効果とその分子作用機序をスフェロイドを用いて探索することを発想した。

従来の固形癌細胞の in vitro での解析には 2 次元平面培養が標準的であった。しかし細胞が本来

持っている特性も多くの場合失われていると推測され、癌細胞の本来の生育状態を正確に反映しているとは言えず、近年 3 次元培養法であるスフェロイドが癌の生物学特性をより忠実に反映すると考えられており注目されている。本研究では大腸癌細胞株を用いてスフェロイドを作成し、放射線照射及び抗癌剤投与を行うことで、生体での CRT を模倣した状態を作り出すことができる。そのモデルにメトホルミンを投与し抗腫瘍効果を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株における CD44 発現を確認し、高発現株、低発現株を用いてそれぞれスフェロイド培養モデルを作成する。

(2) 作成したヒト大腸癌細胞株スフェロイド培養モデルに抗癌剤投与 + 放射線照射を行い臨床での直腸癌化学放射線治療を模したモデルを作成し、EMT が誘導されること、癌幹細胞形質の発現を証明する(Fig.2)。

(3) EMT 誘導の確認のために、E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, HIF-1

TGF- $\beta$ 1, Slug, Snail, Twist などの EMT 関連誘導蛋白、転写因子の発現変化の評価、増殖能、浸潤能の変化を評価する。癌幹細胞形質発現が増加していることを、細胞表面マーカー発現の変化を Flow cytometry を用いて行う。

(4) (2) で作成した CD44 高発現、低発現ヒト大腸癌細胞株スフェロイド培養モデルを用いた化学放射線治療モデルにメトホルミンを添加することで、細胞傷害効果が増強されることを証明する。

(5) メトホルミンの有無における EMT 関連誘導蛋白、転写因子の発現変化、増殖能、浸潤能の変化を観察し、メトホルミンにおける EMT 誘導の抑制効果と、細胞表面マーカー発現の変化によって癌幹細胞形質の発現抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 実臨床での検討

当科で治療を行った直腸癌術前 CRT 症例 33 例の検討において、病理学的完全奏功 (pCR) が得られた 6 症例と比べ、病理学的腫瘍遺残症例 (non-pCR) 27 例は無再発生存率が低い傾向にあった (3 年無再発生存率 100% vs. 64.5%,  $p = 0.278$ )。non-PCR 症例 19 例に対して切除標本の免疫染色を用いた検討では、CD44 が高発現している 12 例は、低発現群 7 例と比べ有意に無再発生存率が低い結果であった (3 年無再発生存率 80.5% vs. 22.3%,  $p < 0.01$ ) (Fig.3)。

この結果から、大腸癌 CSC の主要な表面マーカーと考えられている CD44 は、結腸直腸癌における予後因子、化学療法・放射線治療における治療抵抗因子となりうる可能性があると考え、基礎的実験に移った。

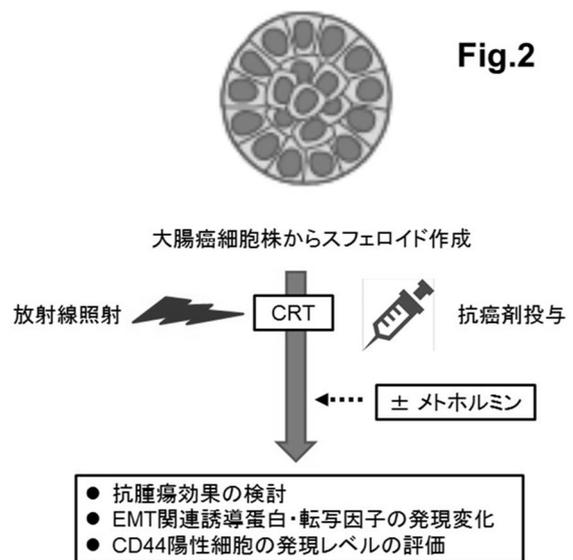
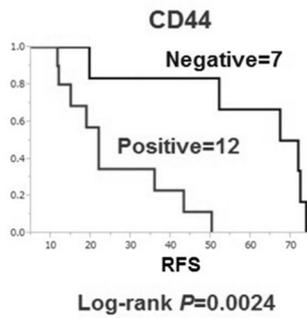


Fig.2

Fig.3



・Non-pCR症例の中で術後CD44高発現はRFS不良

Characteristic		Univariate analysis		
		Risk	HR (95% CI)	P value
Age	<65	1	Reference	0.8851
	≥65	1.09	(0.29-3.33)	
Sex	Female	1	Reference	0.7211
	Male	1.34	(0.19-4.94)	
CEA	<5	1	Reference	0.7271
	≥5	1.22	(0.37-3.61)	
CA19-9	<37	1	Reference	0.6749
	≥37	1.37	(0.11-2.80)	
Local recurrence	Rec+	1	Reference	0.5278
	Rec-	-	(0.076-0.076)	
Distant recurrence	Rec+	1	Reference	0.4146
	Rec-	-	(0.13-0.13)	
Grade	Grade 1	1	Reference	0.2596
	Grade 2	2.32	(0.49-8.57)	
Histology	Tub/pap	1	Reference	0.2813
	Others	2.76	(0.50-51.96)	
ypT	T1	1	Reference	0.4129
	T2/3/4	1.56	(0.53-4.61)	
ypT	T1/2	1	Reference	0.4853
	T3/4	1.97	(0.37-36.43)	
ypN	N0	1	Reference	0.4156
	N1/2	1.68	(0.45-5.38)	
ypStage	Stage I	1	Reference	0.1701
	Stage II/III/IV	2.35	(0.71-10.63)	
CD44 expression	Negative	1	Reference	0.0015
	Positive	13.46	(2.38-254.8)	

### (2) ヒト大腸癌細胞株スフェロイド培養モデルの樹立

ヒト大腸癌細胞株の中でも文献的に CD44 高発現であると報告されている結腸腺癌細胞株 LoVo 及び DLD-1 を用いて、3D 培養を行い、スフェロイド細胞塊を樹立することに成功した。樹立したスフェロイド細胞塊と 2D コントロール細胞とを用いてフローサイトメトリーを行い、スフェロイド培養モデルにおいて、2D コントロール細胞株と比較して大腸癌幹細胞マーカである CD133 陽性かつ CD44 陽性の細胞比率が増加していることを確認した。

### (3) 放射線照射による EMT 誘導, メトホルミンによる細胞傷害増強効果, EMT 抑制

放射線照射による EMT 誘導を確認すべく、大腸癌細胞株 Lovo, DLD1 から作成したスフェロイド培養モデルに対してそれぞれ、1, 5, 10Gy の 48 時間放射線照射を行い ICRT を模したモデルを作成した。このモデルを用いて E-cadherin, N-cadherin, HIF-1, TGF- $\beta$ 1 の発現について Western blot 法を用いて確認したが、本研究では、放射線照射による EMT 誘導関連蛋白の上昇を証明することができなかった。

DLD1, Lovo それぞれを用いて 5-FU, メトホルミンを用いた細胞傷害実験を行い IMTT assay にて評価した。2D 培養モデルを用いた検討では、5-FU 及びメトホルミンの濃度依存的な細胞傷害性及び、5FU へのメトホルミン付加による細胞傷害増強効果を確認できた。しかしながら、スフェロイド培養モデルを用いた細胞傷害実験で 2D 培養モデルのような安定した実験系を確立することができず、メトホルミンによる細胞傷害増強効果を確認することができなかった。

今回の研究成果によって、CD44 高発現が大腸癌の予後不良因子、治療抵抗性因子となる可能性が示唆されたが、基礎研究による治験を得るまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 望月哲矢, 清水亘, 高倉有二, 河内雅年, 田口和浩, 赤羽慎太郎, 佐藤幸毅, 好中久晶, 小野紘輔, 松原啓壮, 服部稔, 大段秀樹
2. 発表標題 直腸癌に対する術前CRTの治療成績
3. 学会等名 第94回大腸癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月哲矢, 清水亘, 高倉有二, 河内雅年, 赤羽慎太郎, 佐藤幸毅, 好中久晶, 小野紘輔, 松原啓壮, 服部稔, 大段秀樹
2. 発表標題 下部進行直腸癌に対する術前化学放射線療法の治療成績
3. 学会等名 第185回 広島外科会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Takakura, Katsunori Shinozaki, Satoshi Ikeda, Hiroyuki Egi, Yuzo Hirata, Manabu Shimomura, Takafumi Oshiro, Takao Hinoi, Daisuke Sumitani, Masahiro Nakahara, Masanori Yoshimitsu, Naruhiko Honmyo, Tsuyoshi Kobayashi, Hideki Ohdan
2. 発表標題 Pre- versus postoperative CAPOX plus bevacizumab (CAPOX-Bev) for resectable liver metastases from colorectal cancer (CLM): A randomized phase II/III trial (HiSCO-01)
3. 学会等名 2020 ASCO virtual scientific program (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------