

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09024

研究課題名（和文）癌幹細胞におけるエネルギー代謝の制御と化学・放射線療法感受性に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Study on regulation of energy metabolism and sensitivity to chemo / radiotherapy in cancer stem cells

研究代表者

蒲池 浩文（Kamachi, Hirofumi）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60374237

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）：メトホルミンは、幹細胞の一部に何らかの影響を与え、従来のゲムシタピンを使用した術前化学放射線療法と併用することによりその治療効果を高め、膵癌患者の予後を改善させた。また、EpCAMは膵癌幹細胞関連分子としてのみならず、その高発現が予後不良因子であるとともに、メトホルミン併用効果に対する治療感受性マーカーとなりうる可能性も示唆された。加えて、メトホルミンが膵癌細胞において増殖能、浸潤能を低下させ、その治療効果の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

膵癌は本邦での癌死因4位の疾患で患者数は年々増加し、5年生存率が数%、切除例ですら15%程度に過ぎず、予後不良である。局所進行膵癌に対するゲムシタピンを用いた術前化学放射線療法は切除例の平均生存期間39か月、5年生存率28%と予後を改善させるが、メトホルミン併用によりさらに予後改善につながる可能性が示唆された。また、膵癌幹細胞の関連分子であるEpCAMの高発現が、予後予測因子やメトホルミン併用療法の感受性因子として有用である可能性が示唆された。さらなる研究により、膵癌に対するテーラーメイド治療の進歩、治療成績の向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Metformin had some effect on some stem cells and enhanced the therapeutic effect when combined with conventional preoperative chemoradiotherapy with gemcitabine and improved the prognosis of pancreatic cancer patients. The results also suggest that EpCAM is not only a pancreatic cancer stem cell-associated molecule, but also that its high expression is a poor prognostic factor and may be a marker of treatment sensitivity to the combined effect of metformin. In addition, metformin decreased the proliferative and invasive potential of pancreatic cancer cells, suggesting the possibility of its therapeutic effect.

研究分野：医学

キーワード：膵癌 癌幹細胞 化学放射線療法 メトホルミン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦での癌死因 4 位の疾患で疾患数は年々増加し、5 年生存率が数%、切除例ですら 15% 程度に過ぎない。抗癌剤の進歩で予後改善しつつあるが、新規治療法の開発が急務といえる。我々は局所進行膵癌に対するゲムシタピンを用いた術前化学放射線療法 (NACRT) を実施し、切除例の平均生存期間 39 か月、5 年生存率 28% という良好な成績を得た (Kamachi, In Vivo, 2018)。

癌幹細胞 (CSC) はバルクの癌細胞集団の中の、自己複製能を有し再発・転移に関わる一つの細胞集団と考えられている。また CSC は通常の癌細胞に比較し抗癌剤・放射線療法に抵抗性を有することが知られており、予後との関連から癌治療における重要ターゲットとして認識されている。CSC の分子シグナルのターゲットとして Hedgehog, Notch, Wnt, CXCR4, mTOR、等が知られており、CSC の抑制が膵癌治療に大きな影響を与えようと考えられる。

近年、メトホルミンは通常癌細胞とは異なる CSC のエネルギー代謝に抑制的に働くことが示唆され、CSC 選択的な抗腫瘍作用を有していると考えられている。メトホルミンは 50 年に渡り世界で最も多用されているビグアナイド系 2 型糖尿病薬であるが、疫学的に内服患者の癌発生率が低下することが報告されており (Josie, BMJ, 2005) 作用機序としてミトコンドリア complex1 を抑制することで ATP 産生低下によるエネルギー不足状態が、LKB1-AMPK 経路を活性化し mTOR 阻害や糖新生を抑制しエネルギーストレスを増強させ細胞障害性を発生させることが知られている。通常癌細胞は嫌気性解糖系に偏ったブドウ糖代謝が行われており、発生したピルビン酸はミトコンドリア内の TCA cycle で利用されず乳酸に変換し ATP を産生する (Warburg effect)。一方 CSC はミトコンドリア内での酸化的リン酸化 (OXPHOS) が ATP 産生の主体であり、メトホルミンのミトコンドリア complex1 抑制により CSC のエネルギーが欠乏し、通常癌細胞に比較し選択的に CSC 抑制作用を認めると考えられている (Sancho, Cell Metab, 2015)。その糖代謝は MYC/PGC-1 発現状況で変化し、CSC の可塑性にも関係しうる。

### 2. 研究の目的

局所進行膵癌に対する術前化学療法にメトホルミンを併用することによる、治療効果を検討する。また、臨床検体の CSC 関連分子の発現解析を行い、メトホルミンの CSC に対する作用を明確化し、化学・放射線療法における CSC を標的とする治療法の開発につながる基礎研究を行う。CSC 関連分子のメトホルミン治療感受性の評価も行う。

in vitro 系を用いて、メトホルミンの膵癌に対する細胞機能への影響も解析を行い、メトホルミンの膵癌 CSC に対する新規治療法としての可能性を模索する。

### 3. 研究の方法

(1) 局所進行膵癌切除症例を用いた術前化学放射線療法にメトホルミン併用効果の検討  
ゲムシタピン併用 NACRT 施行の局所進行膵癌切除検体を用いてメトホルミン投与のなし群 (G group, n=17) と有り群 (GMET group, n=12) における膵癌 CSC 関連分子 (EpCAM, CD44, CD133, CXCR4, ALDH1) の発現を免疫組織学的に評価し、臨床病理・臨床経過と比較検討し、臨床的意義を検討する。生存曲線は Kaplan-Meier 法にて作成し、生存率の群間比較はログ-ランク検定にて行った。

G group と GMET group で全生存率 (OS)、無再発生存率 (RFS) を比較した。

G group と GMET group の患者の膵癌切除検体を用いて、膵癌 CSC 関連分子 (EpCAM, CD44, CD133, CXCR4, ALDH1) の免疫組織染色を行い、それぞれの群の陽性率を評価した。また各膵癌 CSC 関連分子の陽性患者群、陰性患者群に群別化し、OS、RFS を比較した。

膵癌再発に対する膵癌 CSC 関連分子の発現に関し、ロジスティック回帰分析を行い、それらの関連性を評価した。

(2) 膵癌細胞株 (Panc-1、MIA-PaCa2) を用いた、増殖能、浸潤能に対するメトホルミンの効果の検討

Panc-1、MIA-PaCa2 をそれぞれ 96 ウェルプレートに  $5.0 \times 10^3$  細胞を播種し、メトホルミンを 0-1000  $\mu\text{M}$  の濃度下で培養し、24 時間、48 時間後に MTS アッセイにて増殖能を評価した。

Panc-1 を用いて、メトホルミン 0-1000  $\mu\text{M}$  の濃度下で invasion アッセイを行った。播種細胞数は  $2.5 \times 10^4$  個とし、24 時間培養後にメンブレンを染色し、それぞれのメンブレンの 5 視野の細胞数をカウントした。

#### 4. 研究成果

(1)

統計学的有意差は認めなかったが、G 群に比較し、GMET 群では OS、RFS とともに良好な予後を認める傾向にあった (図 1)。

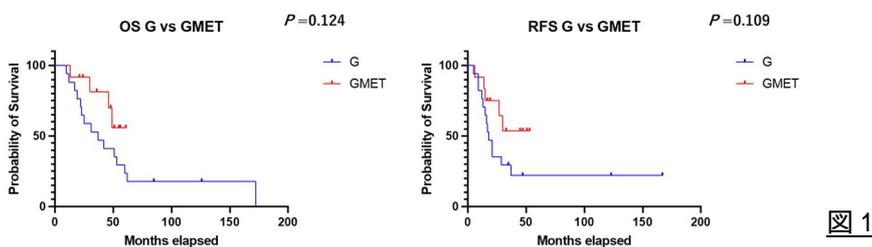


図 1

膵癌 CSC 関連分子の免疫染色の結果を図に示した。メトホルミン併用群で EpCAM は有意に陽性率が減少、CXCR4 は有意に陰性率が減少しており治療効果予測因子としての可能性が示唆された (図 2)。

	NACRT (n=17)	Met-NACRT (n=12)	P value
EpCAM (+):- (positive rate(%))	11:6 (64.7)	3:9 (25)	0.032
ALDH1 (+):- (positive rate(%))	7:10 (41.2)	8:4 (66.7)	0.26
CD133 (+):- (positive rate(%))	7:10 (41.2)	8:4 (66.7)	0.26
CXCR4 (+):- (positive rate(%))	5:12 (29.4)	10:2 (83.3)	0.0078
CD44 (+):- (positive rate(%))	8:9 (47.1)	6:6 (50)	1

図 2

OS において、EpCAM 陽性、CXCR4 陰性群で他群に対し有意に予後不良であった (図 3)。

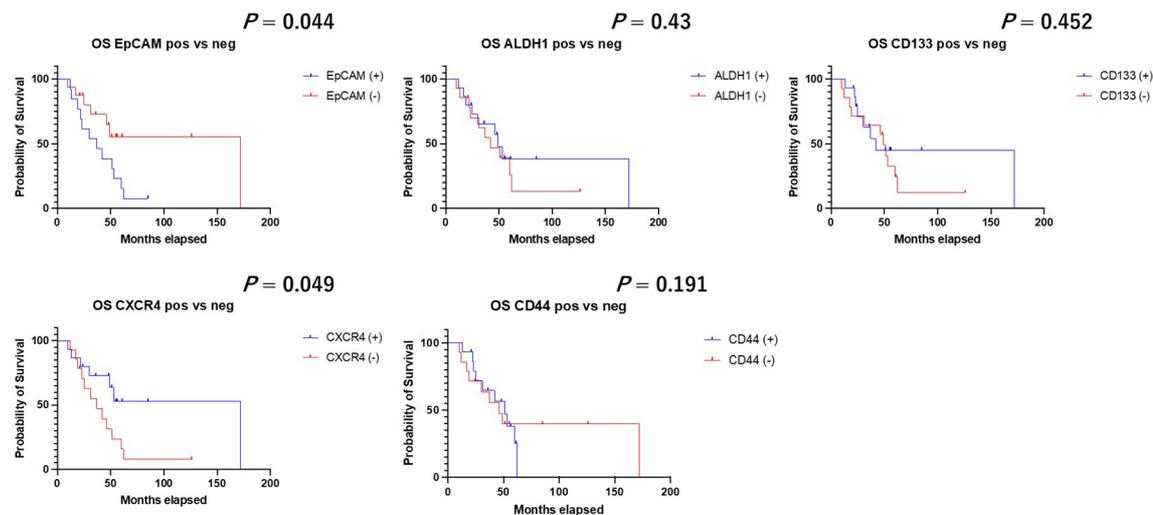


図 3

RFS においては有意差のある膵癌 CSC 関連分子は認めなかったが、EpCAM 陽性群で予後不良な傾向であった (図 4)。

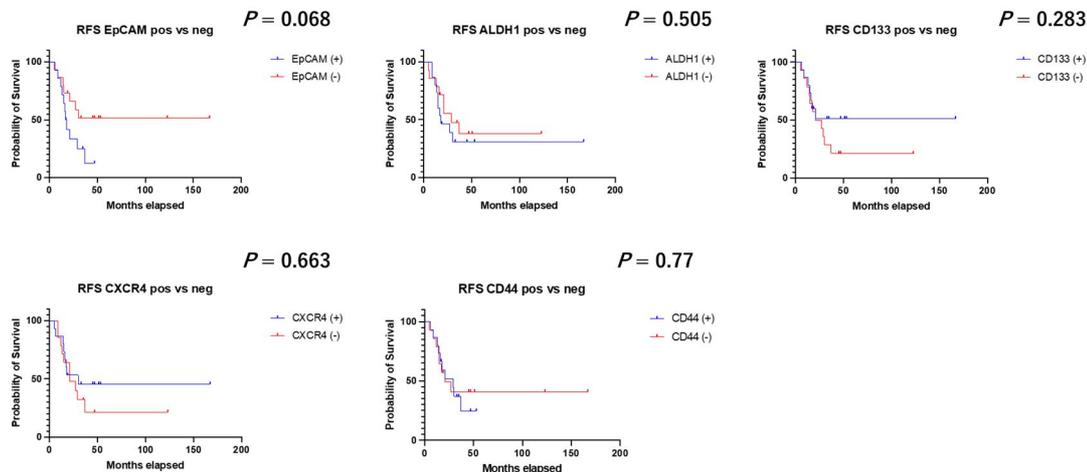


図 4

単変量解析では EpCAM 陽性 (OR;4.2、95%CI;0.82-21.4、 $p=0.085$ )、CD133 (OR;0.24、95%CI;0.041-1.1、 $p=0.073$ ) 陰性で再発が高い傾向であり、多変量解析では EpCAM 陽性のみが有意な独立した再発高リスク因子 (OR; 16.0、95%CI;1.4-181.6、 $p<0.05$ ) として抽出された。

これらより、メトホルミンは、がん幹細胞の一部に何らかの影響を与え、従来の NACRT の効果を高め、膵癌患者の予後を改善する可能性がある。また、EpCAM は CSC マーカーや予後不良因子であるとともに、メトホルミン併用効果に対するマーカーの可能性も示唆された。

(2)

膵癌細胞株の Panc-1、MIA-PaCa2 とともにメトホルミンの存在下では、有意に細胞増殖能の低下を認めた (図 5)。

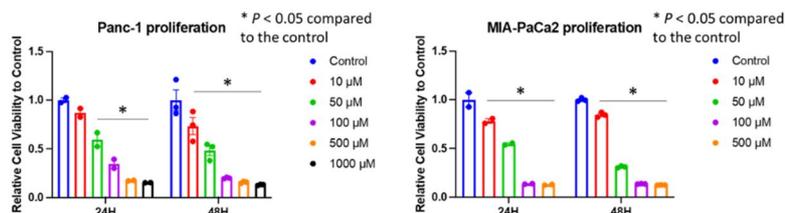


図 5

Panc-1 ではメトホルミン濃度 100 μM 以上で有意に浸潤能の低下を認めた (図 6)。

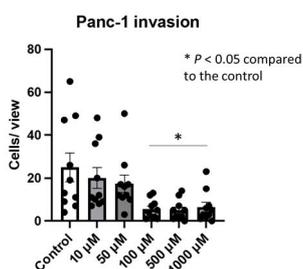


図 6

これらの結果より、メトホルミンが膵癌細胞において増殖能、浸潤能を低下させ、その治療効果の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Fujii Yuki, Kamachi Hirofumi, Matsuzawa Fumihiko, Mizukami Tatsuzo, Kobayashi Nozomi, Fukai Moto, Taketomi Akinobu	4. 巻 39
2. 論文標題 Early administration of amatuximab, a chimeric high-affinity anti-mesothelin monoclonal antibody, suppresses liver metastasis of mesothelin-expressing pancreatic cancer cells and enhances gemcitabine sensitivity in a xenograft mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 1256 ~ 1266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-021-01118-1	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 Matsuzawa Fumihiko, Kamachi Hirofumi, Mizukami Tatsuzo, Einama Takahiro, Kawamata Futoshi, Fujii Yuki, Fukai Moto, Kobayashi Nozomi, Hatanaka Yutaka, Taketomi Akinobu	4. 巻 21
2. 論文標題 Mesothelin blockage by Amatuximab suppresses cell invasiveness, enhances gemcitabine sensitivity and regulates cancer cell stemness in mesothelin-positive pancreatic cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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） 10.1186/s12885-020-07722-3	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	深井 原  (Fukai Moto)  (60374344)	北海道大学・医学研究院・特任講師   (10101)	
研究分担者	折茂 達也  (Orimo Tatsuya)  (80711861)	北海道大学・大学病院・特任助教   (10101)	

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