

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590738

研究課題名（和文） 転移性肝臓におけるマイクロRNAを標的分子とした治療法開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） MicroRNAs as target molecular in metastatic liver cancer

研究代表者

正木 勉 (Masaki Tsutomu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30335848

研究成果の概要（和文）：胃癌細胞株、MKN1、MKN45、MKN74、肝がん細胞株 HLE、HLF、Huh7、Alex、大腸癌細胞株 Caco2、WiDr、Colo320、膵癌細胞株 PK-1、PK-7、Panc-1、食道癌細胞株 T. T、KYSE30、KYSE70 を用いてメトホルミンの抗腫瘍効果を検討した。すべての癌腫において、*in vitro* の系で MTT アッセイにより濃度依存的に細胞増殖抑制効果があった。また、フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析から、メトホルミンは、種々の癌細胞の G1 アレストを引き起こしていた。メトホルミンの細胞増殖抑制効果は、ウェスタンブロット解析から細胞周期関連分子 cyclinD1、Cdk4、Cdk6、cyclinE、Cdk2 を抑制していた。また、メトホルミンはレセプター型チロシンキナーゼを有する分子、特に EGFR の活性をすべての癌腫において減少させていた。また *in vivo* の系で MKN74、WiDr、Huh7、Panc-1 をヌードマウスに移植し、すべての癌腫において、メトホルミンを投与群は非投与群と比較し、腫瘍の増殖は抑制されていた。また *in vitro*、*in vivo* の系でメトホルミン投与と非投与の癌細胞において多くのマイクロ RNA が変化していた。以上の結果からメトホルミンは種々の癌細胞を細胞周期の G1 で停止させ、細胞増殖を抑制すると考えられた。さらにメトホルミン投与により種々のマイクロ RNA も変化し、このマイクロ RNA の変化もまた癌細胞の増殖抑制に関与していると考えられた。また、大腸がんの転移を転移性肝臓モデルを作成し、メトホルミンの投与により、その腫瘍の増大の抑制が認められ、マイクロ RNA も変化させた。

研究成果の概要（英文）：**Objective:** Recent studies suggest that metformin, which is a member of the biguanide family and commonly used as an oral anti-hyperglycemic agent, may reduce cancer risk and improve prognosis of numerous types of cancer. However, the mechanisms underlying metformin's anti-tumor effect on gastric, esophageal, colon, pancreas, liver cancers remain unknown. The goal of the present study was to evaluate the effects of metformin on the proliferation of various cancers *in vitro*, and to study changes in the expression profile of microRNAs (miRNAs), since miRNAs have previously been associated with the anti-tumor effects of metformin in other human cancers.

Design: The human various cancer cell lines, such as esophageal cancer cell lines T.T, KYSE30 and KYSE70, hepatocellular carcinoma cell lines HLE, HLF HiH7, Alex, colon cancer cell lines Caco 2, WiDr, Colo 320, pancreas cancer cell lines PK-1, PK-7 and Panc 1 were used to study the effects of metformin on human various cancers *in vitro*. In addition, we used miRNA array tips to explore the differences between miRNAs in some cancer cells with and without metformin treatment.

Results: Metformin inhibited the proliferation of all cancer cells *in vitro*. Metformin blocked the cell cycle in G0/G1 *in vitro*. This blockade was accompanied by a strong decrease of G1 cyclins, especially cyclin D1, as well as decreases in cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4), Cdk6, and phosphorylated retinoblastoma protein (Rb). In addition, the expression of miRNAs was markedly altered with the treatment of metformin *in vitro*.

Conclusion: Metformin inhibited the growth of human cancer cell lines, and this inhibition may have involved reductions in cyclin D1, Cdk4 and Cdk6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,400,000	720,000	3,120,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：マイクロ RNA、転移性肝癌

1. 研究開始当初の背景

原発癌の治療に対する飛躍的な進歩にもかかわらず、転移性癌の克服は難しく、あらゆる領域の癌治療における最大の問題となっている。転移性癌のなかでも、最も頻度の高いのは肝転移であり、その治療は大きな障壁に直面している。実際、臨床の場においては、原発性肝細胞癌に対する治療は、ある程度進歩したにも関わらず、転移性肝癌に対して、手術療法、化学療法、免疫療法、分子標的治療薬を主体とした幾多の治療が行われているが、十分な効果を得ているとは言い難い。特に手術不能な転移性肝癌の予後は極めて悪く、現在本邦で、7万人以上の患者がいるにもかかわらず、内科的領域においても、その治療はなおざりにされている感が否めない。大腸癌、胃癌の肝臓転移もその例外ではない。

我々は、これまで20年に渡り、原発性肝細胞癌、胃癌、大腸癌の分子機構について研究を続け、それらの癌において、癌遺伝子の活性化、細胞周期の破綻、血管新生分子の増強について検討し、現在それらの研究から、大腸癌、胃癌、肝細胞癌の転移進展抑制のための分子標的治療薬になりうる候補分子を同定している。主にチロシンキナーゼを有する細胞増殖因子のレセプターあるいは血管新生分子を標的とした抗体療法（HER2の抗体：ハーセプチン、EGFERの抗体：アービタックス、VEGF抗体：アバスタチン）を動物実験で肝癌進展抑制効果を検討しているが、ある程度の効果は見られるものの満足できるものではない。よって新しい視点による、転移性肝癌の発癌・進展機構の解明とそれに基づいた治療薬の開発が必要である。

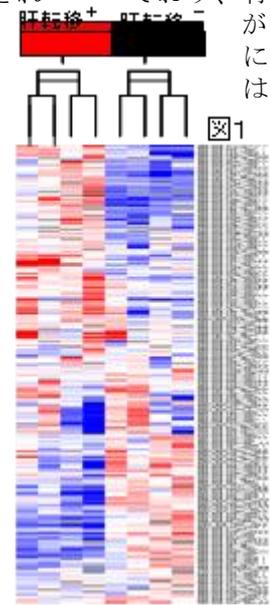
90年代の急速な勢いでヒトゲノムプロジェクトが進行した。その結果、予想に反してゲノムDNA30億からタンパクの翻訳に使用される遺伝子は、1.5%にすぎず、タンパク数にして2万2千を規定しているにすぎないと

ということが判明した。さらに、意外な事に、ゲノムDNAの70%がRNAに転写されており、細胞内には膨大な未知のnoncoding RNAが存在することが判明した。マイクロRNAは、このnoncoding RNAの範疇に属し、植物や動物のゲノムイントロンにコードされる21～25塩基程度の小さな分子で、これらマイクロRNAの機能としては特異的なメッセンジャーRNA(mRNA)の3'非翻訳領域に部分相補的に結合し、そのmRNAの翻訳、遺伝子発現を抑制している。

最近、種々の癌において発現しているマイクロRNAが、正常組織と比較し、著明に変化していることが報告されており、特定のマイクロRNAが、細胞の癌化・進展

関与しているのではないかと推測されている(正木の業績3)。我々は大腸癌の転移機構にマイクロRNAが関与しているのではないかと考え、既に、それぞれ4症例の肝癌転移のある大腸癌と転移のない大腸癌組織において662種類のマイクロRNAの発現プロファイリングのパイロットスタ

ディーを行い、肝臓転移のある大腸癌と肝臓転移のない大腸癌ではマイクロRNAのプロファイリングは明確に異なることが判明した(図1、未発表データ)。これらの予備的なデータは、大腸癌の肝転移に関与するマイクロRNAが存在することを示しており、他の消化器癌の肝転移も密接な関連を持つマイクロRNAも存在す



る可能性があり、本申請課題研究を、今後さらに押し進めていく価値があると考えられる。

2. 研究の目的

転移性肝癌は、現在本邦において患者数が7万人あまりいるといわれ、終末期を迎えた多くの癌患者の死亡要因である。しかしながら、種々の原発癌の終末期のため、その治療法に関しては、困難を極めている。よって新しい視点に基づいた転移性肝癌の治療開発は、急務である。マイクロ RNA (21~25 塩基程度の noncoding RNA) は、複数のターゲット遺伝子を抑制する、新たなタンパク質発現制御機構である。本研究の目的は、大腸癌および胃癌の肝転移に関与するマイクロ RNA を同定し、それを標的としたマイクロ RNA が、転移性肝癌の進展を抑制させる分子標的治療薬に成り得るかどうかの可能性を探ることである。

3. 研究の方法

大腸癌、胃癌の肝転移に関連するマイクロ RNA 分子を見つけ、そのマイクロ RNA を標的にした、転移性肝癌の治療法の可能性を目的とした全体の計画要旨とその役割分担を述べる。研究は大きく分けて5段階からなる。①まず、術後組織サンプル、内視鏡下組織サンプルの収集は、それぞれ、当課題の研究グループの消化器外科教室(鈴木)、消化器内科教室(正木, 米山, 出口, 桶本)が行なう。②次に、そのサンプルを使用しマイクロ RNA の実験遂行を消化器内科グループ(正木, 米山, 出口, 桶本)が行なう。③そのデータから、大腸癌、胃癌の肝転移のある群とない群の組織の発現プロファイルを作成し、クラスター解析を行なう。同時に肝臓転移に関係のあるマイクロ RNA の拾い上げと、それらのマイクロ RNA のターゲット遺伝子のコンピューター予測は、Bioinformatics を専門とする情報基盤センターグループ(岩間)が行なう。④肝臓転移に関与するマイクロ RNA の絞りこみ、⑤転移性肝癌の進展阻止の観点から見たヌードマウス肝臓転移モデルにおけるマイクロ RNA の有効性の検討を消化器内科グループ(正木, 米山, 出口, 桶本)が行なう。

4. 研究成果

胃癌細胞株、MKN1、MKN45、MKN74、肝がん細胞株 HLE、HLF、Huh7、Alex、大腸癌細胞株 Caco2、WiDr、Colo320、膵癌細胞株 PK-1、PK-7、Panc-1、食道癌細胞株 T.T、KYSE30、KYSE70 を用いてメトフォルミンの抗腫瘍効果を検討した。すべての癌腫において、in vitro の系で MTT アッセイにより濃度依存的に細胞増殖抑制効果があった。また、フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析から、メトフォルミンは、種々の癌細胞の G1

アレストを引き起こしていた。メトフォルミンの細胞増殖抑制効果は、ウェスタンブロット解析から細胞周期関連分子 cyclinD1、Cdk4、Cdk6、cyclinE、Cdk2 を抑制していた。また、メトフォルミンはレセプター型チロシンキナーゼを有する分子、特に EGFR の活性をすべての癌腫において減少させて

いた。また in vivo の系で MKN74、WiDr、Huh7、Panc-1 をヌードマウスに移植し、すべての癌腫において、メトフォルミンを投与群は非投与群と比較し、腫瘍の増殖は抑制されていた。また in vitro、in vivo の系でメトフォルミン投与と非投与の癌細胞において多くのマイクロ RNA が変化していた。以上の結果からメトフォルミンは種々の癌細胞を細胞周期の G1 で停止させ、細胞増殖を抑制すると考えられた。さらにメトフォルミン投与により種々のマイクロ RNA も変化し、このマイクロ RNA の変化もまた癌細胞の増殖抑制に関与していると考えられた。

また、大腸がんの転移在転移性肝癌モデルを作成し、メトフォルミンの投与により、その腫瘍の増大の抑制が認められ、マイクロ RNA も変化させた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1, Kobayashi M, Kato K, Iwama H, Fujihara S, Nishiyama N, Mimura S, Toyota Y, Nomura T, Nomura K, Tani J, Miyoshi Hi, Kobara H, Mori H, Murao K, Masaki T, Antitumor effect of metformin in esophageal cancer: In vitro study, Int J Oncol. 2013 Feb;42(2):517-24. doi: 10.3892/ijo

2, Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T, Human microRNAs originated from two periods at accelerated rates in mammalian evolution, Mol Biol Evol. 2013 Mar;30(3):613-26. doi: 10.1093/molbev/mss262

3, Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y, Kobara H, Mori H, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo, Mol Cancer Ther. 2012 Mar;11(3):549-60. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0594

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正木 勉 (Masaki Tsutomu)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：30335848

(2) 研究分担者

樋本 尚志 (Himoto Takashi)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20325343

出口 章広 (Deguchi Akihiro)
香川大学・医学部・講師
研究者番号：30380174

米山 弘人 (Yoneyama Hirohito)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80294750

(3) 連携研究者

岩間 久和 (Iwama Hisakazu)
香川大学・総合生命科学研究センター・准
教授
研究者番号：20398035

鈴木 康之 (Suzuki yasuyuki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：40304092