

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592043

研究課題名(和文)形態形成シグナル制御による膵癌癌性幹細胞の微小環境・再構築療法への挑戦

研究課題名(英文)Development of cancer treatment targeting morphogen and cancer stem cell

研究代表者

中村 雅史(NAKAMURA, Masafumi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30372741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(目的)metforminが癌微小環境での伝達因子であるSonic Hedgehog (Shh)に与える影響を明らかにする。(方法)膵癌細胞でmetforminがShh発現量へ与える影響をreal-time PCR, ウェスタン・ブロッティング、免疫染色を用いて調べた。さらにmetforminの標的であるAMPK抑制下でのShh発現量の変移を調べた。(結果と考察)metformin存在下ではShhの発現量は低下しAMPKのリン酸化が促進された。AMPK抑制でShhの産生が促進された。いくつかの膵癌細胞ではmetforminがAMPK経路でShhの産生を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：[Aim] The aim of this study is to explore the relationship between metformin and Hh signaling pathway, and to clarify the mechanism by which metformin prevents cancers. [Materials and methods] Expression of Shh was examined at protein and mRNA level with or without metformin by real-time PCR, immunoblotting and immunostaining. Phosphorylation of AMPK was detected by immunoblotting. [Results] Shh expression was decreased at protein and mRNA level by addition of metformin in BxPC3 cells. Phosphorylation of AMPK was increased by metformin and decreased by dorsomorphin. Interestingly, Shh expression was increased by dorsomorphin. This effect was further confirmed by siRNA of AMPK. [Conclusion] Metformin inhibits production of Shh in BxPC3 through phosphorylation of AMPK. Activation of AMPK might be one of the routes to link metformin and suppression of Shh.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 癌微小環境 形態形成シグナル Hedgehog signaling Sonic Hedgehog metformin AMPK

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌と Ras 変異: 膵癌は年々増加傾向にあり、その予後は非常に不良である。今日、癌に対する分子標的治療法が活発に開発されているが、多くは増殖因子シグナルに関するものである。これらのシグナルは Ras に収束するが、膵癌は Ras の変異が 95% 以上あり分子標的治療の発達によっても膵癌治療の展望は得にくいと思われる (1. Morris JPt, et al., KRAS, Nat Rev Cancer 2010;10:683-95.)。

(2) 膵癌幹細胞と微小環境: 膵癌は、その発育速度が非常に速い。近年、生体内においては癌性幹細胞が分裂し娘癌細胞を産生しているという癌性幹細胞の概念が普及してきている。これは、癌細胞周期が 20~40 時間程度であることと、癌の増幅速度のギャップをうまく説明する理論である。全ての癌細胞が増殖活性を持っておれば、腫瘍は日々倍増することとなるが、実臨床ではそのような事象は見受けられないということである。ところで、膵癌は生体内での増大速度がきわめて速いが、これは癌性幹細胞が豊富であることに由来する可能性がある (2. Du Z, et al., Dig Dis Sci 2011;56:741-50.)。薬剤への高い耐性も、癌性幹細胞成分が多いことで説明がつく。ところで、癌性幹細胞も正常な幹細胞同様に微小環境により維持されている (3. Borovski T, et al., Cancer Res 2011;71:634-9.)。細胞内に Ras 変異をもち癌性幹細胞を高い割合で含有することが予想される膵癌に対しては、この微小環境の改変が最も有効な治療法となることが予想される。

(3) 形態形成シグナルと微小環境: このように癌幹細胞維持に必須である微小環境の代表的維持因子である Hedgehog シグナルは胎生期に発現し器官形成を司る形態形成シグナル群の一つであり、我々は、癌組織内で再活性化し癌の形成をも司ることを報告してきた (4. Koga K, Nakamura M et al., Anticancer Res 2008;28:731-40., 5. Nakashima H, Nakamura M et al., Cancer Res 2006;66:7041-9., 6. Kameda C, Nakamura M et al., Br J Cancer 2010;102:738-47.)。Hh シグナルの活性化は主なりガンドである Sonic Hedgehog (Shh) 産生の亢進によってもたらされる。癌細胞が産生する Shh がパラクラインとして癌周囲の支持組織の維持に重要であることが明らかになりつつある。癌細胞より分泌された Shh は骨髄由来細胞に作用して血管新生を促進し、線維芽細胞に対しては線維成分の産生と様々なサイトカインの放出を引き起こしている (1. Morris JPt, et al., KRAS, Nat Rev Cancer 2010;10:683-95.)。本課題では、以上のエビデンスに基づき、癌性幹細胞の微小環境を構築している非腫瘍性細胞群を標的とし、これらの細胞群を統括

する再活性化した形態形成シグナルの制御法を確立することで、薬剤抵抗性であり Ras 変異を持つ非常に予後不良な膵癌の克服を目指す。

2. 研究の目的

(1) 代表的な難治癌である膵癌は化学療法剤耐性であり、Ras 変異が 95% 以上あるため、成長因子が標的である分子標的治療法も効果がない。線維芽細胞といった支持細胞に治療可能性が残されている。一方、形態形成シグナルは胎生期に発現し人体の構築を司るが、悪性腫瘍においても再活性化し血管・線維組織などよりなる新たな癌組織構築に重要な役割を果たしている。今回、膵癌発生の抑制因子である metformin の作用機序を解明することで、異常な形態形成シグナルの発生源である癌細胞よりの Shh 分泌抑制機序を解明し、癌細胞 支持細胞間連携の制御による膵癌制御法確立を目指す。

(2) 上記の目的のために metformin が Shh 分泌に関して膵癌細胞に与える影響を解析し、その機序を解明することを具体的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) metformin が膵癌細胞に与える影響の検証: 膵癌細胞である BxPC3, AsPC-1, Panc-1, 食道癌細胞である TE-1 を用いて metformin が癌細胞の Shh 産生に与える影響を調べた。各細胞は 37°C, 5% CO₂ 10% の環境下で fetal bovine serum (FBS; Sigma), antibiotics (10,000 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, Sigma) を添加した RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) 培養液中で培養された。免疫染色では示されている濃度の metformin 存在下で 48 時間培養された。免疫染色では 1 次抗体として Shh (ab53281, 1:600) (Abcam, Cambridge, UK) を 14 時間 4°C で反応させた。ウエスタン・ブロッティングでは、M-PER Reagents (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 細胞抽出液を用いて細胞抽出液を調整した。1 次抗体として Shh (ab53281, 1:2,000) もしくは β -actin (3700S, Cell Signaling Technology, Inc., Denver, CO) を用いた。Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) に用いた RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて調整した。プライマーは全て Life Technologies 社の既存プライマーであり β -actin (Hs99999903_m1), Shh (Hs00179843_m1) を用いた。計測値は β -actin の値を基準に標準化された。

(2) metformin の作用機序解明: AMPK リン酸化の測定のために BxPC3 細胞を metformin 0, 1, 10mM 存在下で 6 日間培養し上記の方法で免疫染色を行った。1 次抗体は anti-human

Phospho-AMPK (Thr172) antibody (40H9) (2535, 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Denver, CO) を用いた。コントロール群は anti-human β -actin antibody (3700, 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Denver, CO) を 1 次抗体として用いた。AMPK 抑制による Shh 産生活活性化を、AMPK 阻害剤 Dorsomorphin 0, 1, 10 μ M 存在下での上記の Shh を標的にした RT-PCR で調べた。また、AMPK に対する siRNA 存在下での Shh 発現量も上記と同様に RT-PCR で調べた。

4. 研究成果

(1) Shh 蛋白量は膵癌細胞内では metformin により抑制される: BxPC3 細胞内における Shh 蛋白の発現量を免疫染色で調べた。BxPC3 細胞を metformin 存在下で 48 時間培養したのちに細胞質における Shh 蛋白の発現量を定性的に調べた。Metformin 存在下では、免疫染色での Shh 陽性細胞率が 0mM での 93.2% に比較して、14.8% (1mM, $P < 0.0001^*$), 47.3% (10mM, $P = 0.0005^*$) と有意に減少していることが確認された (図 1)。

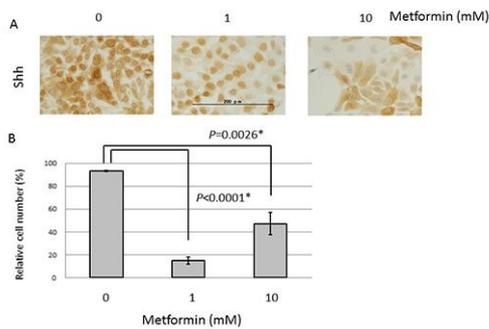


図 1 . metformin 存在下での Shh 陽性細胞の組織写真(A). および陽性率のグラフ(B).

Anticancer Res. 34: 1765, 2014

この metformin による細胞内 Shh 発現量の減少はウエスタン・ブロッティングでも確認された。上記同様に処理された BxPC3 細胞より蛋白を抽出しブロッティングを行い抗 Shh 抗体で染色した。Metformin 10mM の存在下で上記同様に Shh の発現が低下することが確認された。内部標準として用いられた β -actin にはこの変化は認められなかった (図 2)。

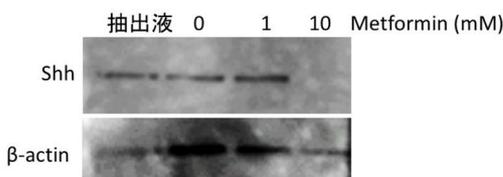


図 2 . metformin 存在下での Shh 蛋白発現。metformin 10mM で発現低下。

Anticancer Res. 34: 1765, 2014

(2) BxPC3 膵癌細胞内で metformin は Shh 遺伝子を不活化する: metformin による Shh 蛋白量減少効果が Shh の遺伝子発現に関連するこ

とを確認するために metformin と共培養した BxPC3 細胞の mRNA を抽出し Shh の mRNA 量を real time PCR で計測した。Shh mRNA は、metformin の量依存性に有意に減少しており、metformin 0.3mM, 1mM での Shh mRNA 計測値は各々 89.9%, 42.3% ($P = 0.0005^*$) であった (図 3)。

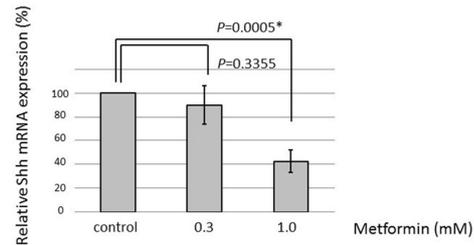


図 3 . Metformin 存在下での Shh mRNA 発現量を real time PCR で計測した。

Anticancer Res. 34: 1765, 2014

(3) Shh 発現に対する metformin の効果は細胞株によって異なる: Shh の mRNA 発現に対する metformin の効果の普遍性を膵癌細胞株 Panc-1, AsPC-1, そして食道癌細胞株である TE-1 を用いて調べた。これら 3 つの細胞株を上記と同様に metformin と共培養して Shh の mRNA 発現を調べた。10mM の metformin 存在下で AsPC-1 と TE-1 の Shh の mRNA 発現は低下した。Panc-1 は 0.3mM で一度低下したが 1mM, 10mM で 0mM と有意差ない値となり異なった挙動を示した (図 4)。以上より、metformin の膵癌抑制作用機序の一つとして、Shh の mRNA 発現が抑制されることが原因であることが示された。次に、この作用機序の詳細を AMPK に着目してさらに究明した。

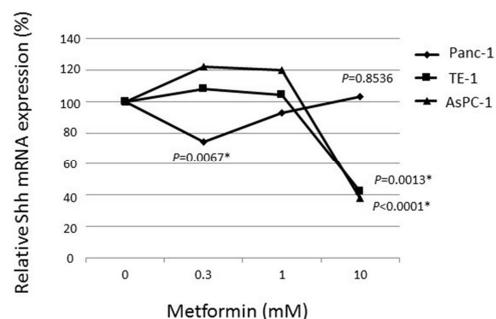


図 4 . Shh 発現に対する metformin の効果は細胞株によって異なる。

Anticancer Res. 34: 1765, 2014

(4)metformin 存在下では Shh 蛋白発現量と AMPK のリン酸化状態が逆相関する：metformin と共培養した BxPC3 細胞より蛋白を抽出し、上記同様の方法で抗 Shh 抗体、抗リン酸化 AMPK (p-AMPK)を用いてウエスタン・ブロッティングを行った。10mM の metformin 存在下で Shh 発現は上記のように低下した。AMPK のリン酸化は逆相関を示し 10mM の metformin でリン酸化が顕著となっていた (図 5)。

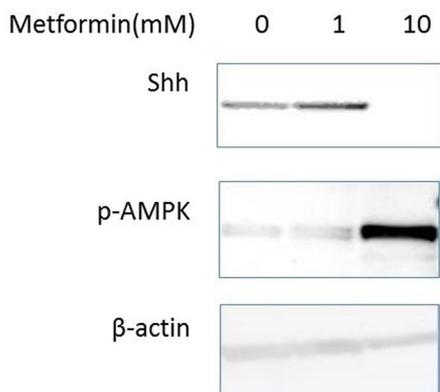


図 5 . metformin 存在下では Shh 蛋白発現量と AMPK のリン酸化状態が逆相関する。

(5)AMPK 阻害剤 dorsomorphin は Shh の発現量を増加する：AMPK の活性化が Shh の発現低下を引き起こすことを証明するために、AMPK 阻害剤である dorsomorphin で AMPK 活性を抑制することで Shh 発現量が増加するかを real time PCR にて観察した。dorsomorphin は 10 μM の存在下で Shh の mRNA 発現が有意差をもって低下することが明らかとなった。

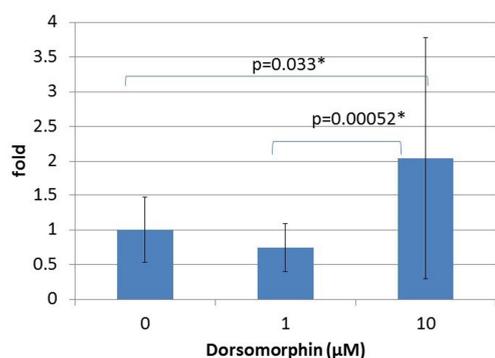


図 6 . AMPK 阻害剤 dorsomorphin は Shh の発現量を増加する。

AMPK 活性抑制による Shh-RNA 発現量増加という現象を、AMPK に対する siRNA によるノックダウンで確認した。siRNA にて AMPK 発現が阻害されたことを確認し、Shh の発現量を real time PCR で観察した。AMPK の siRNA 導入で AMPK の mRNA は減少するが、これに逆相関して Shh の mRNA は増加する。

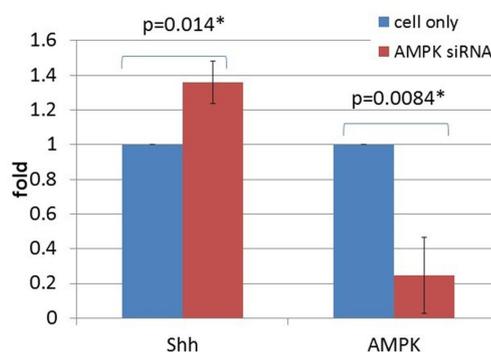


図 7 . AMPK のノックダウンは Shh の mRNA を増加させる。

BxPC3 細胞に AMPK の siRNA 導入し AMPK と Shh の mRNA 量を計測した。AMPK 発現量低下と逆相関して Shh 発現量は増加した。

以上の一連の結果より、metformin の膵癌抑制作用機序の一つとして、metformin の標的蛋白である AMPK の活性化を通じて、膵癌組織で再活性化している形態形成シグナルである Shh の発現が抑制されることが原因であることが示された。

<引用文献>

Morris JPt, et al., KRAS, Nat Rev Cancer 2010;10:683-95.
 Du Z, et al., Dig Dis Sci 2011;56:741-50.
 Borovski T, et al., Cancer Res 2011;71:634-9.
 Koga K, Nakamura M et al., Anticancer Res 2008;28:731-40.,
 Nakashima H, Nakamura M et al., Cancer Res 2006;66:7041-9.,
 Kameda C, Nakamura M et al., Br J Cancer 2010;102:738-47.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nakamura M, Ogo A, Yamamura M, Yamaguchi Y, and Nakashima H: Metformin suppresses sonic hedgehog expression in pancreatic cancer cells. Anticancer Res. 査読有 34: 1765-1770, 2014
<http://ar.iiarjournals.org/content/34/4/1765.short>

〔その他〕

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/dig-surg/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA, Masafumi)
 川崎医科大学・医学部・教授
 研究者番号：3 0 3 7 2 7 4 1

(2)研究分担者

中島 洋 (NAKASHIMA, Hiroshi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60623048

堤 宏介 (TSUTSUMI, Kosuke)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：00467937