

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462481

研究課題名(和文)腎細胞がんにおけるAMPK-mTOR経路を介した新しい治療戦略の開発

研究課題名(英文)The development of new therapeutic strategies through AMPK-mTOR pathway in renal cell carcinoma

研究代表者

松本 洋明(MATSUMOTO, Hiroaki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60610673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞がんの薬剤耐性の克服のため、メトホルミン(Met)と分子標的治療薬との相乗効果を検討した。細胞株にてエベロリムス、アキシチニブ(Axi)、Metはそれぞれ濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し、特にA498においてMetの増殖抑制効果は高く、Axiとの併用で相乗効果を認め、有意にアポトーシス増強効果を示した。また、AMPK発現が上昇し、mTOR発現が抑制された。マウスモデルでは併用療法は相乗的に腫瘍増殖抑制を示し、VEGFの発現低下と腫瘍血管密度低下を認めた。Metと分子標的治療薬との併用はAMPK/mTOR経路を介した新たな癌治療戦略となりうる。

研究成果の概要(英文)：To conquer drug-resistance of renal cell carcinoma, we tried to establish a new therapeutic strategy through AMPK/mTOR pathway and assessed the synergy effect combined with molecular targeted drug and metformin. In renal cancer cell lines, Everolimus, Axitinib and Metformin repressed the cell growth in dose dependent manner. As a result, Metformin showed high growth inhibitory effect in each cell lines. In particular, Metformin did not only show synergistic apoptosis effect in combination with Axitinib, but also enhanced AMPK expression and suppressed mTOR expression. In the mouse model, combination of Metformin and each single agent showed synergistic tumor growth inhibition, decreased micro-vessel density and repressed the expression of VEGF in tumor tissue. These results suggest that combination treatment of Metformin and molecular targeting for AMPK/mTOR pathway shows pre-clinical proof of principal as a new therapeutic strategy for renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎細胞がん AMPK メトホルミン mTOR阻害剤 チロシンキナーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

以前より各種癌細胞においては癌微小環境における低酸素状態での生存能を獲得するため脂肪酸代謝経路を促進させて好気性解糖系を活性化するワールブルグ効果がよく知られ、好気性、嫌気性解糖系の抑制は今後の癌治療において新しい治療戦略となると期待されている。

その癌抑制メカニズムとして LKB1 を介した AMP キナーゼ (AMPK) の関与が解明されつつある。AMPK 活性化は acetyl-CoA carboxylase (ACC) をリン酸化することによってその活性を抑制し、malonyl-CoA 量を減少させ、脂肪酸をミトコンドリアに取り込む酵素、carnitine-palmitoyltransferase 1(CPT1)を活性化させ、その結果脂肪酸酸化が亢進する。その結果嫌気性代謝が抑制され、癌細胞増殖抑制に作用する[1]。

また、AMPK はスタチンと同じように HMG-CoA 還元酵素を阻害して、メバロン酸の合成を阻害し、がん細胞の増殖を抑制することが証明されている[2]。さらに AMPK は mTOR(mammalian target of rapamycin)経路を阻害して蛋白質の合成を抑制し、がん細胞の増殖や血管新生を阻害することが明らかとなり、新しい有望な治療ターゲットと考えられている。さらに AMPK はがん抑制遺伝子 p53 は相互に作用してがんを抑制する方向で働くことが示されている[1]。

一方、近年糖尿病領域を中心に糖、脂質代謝において AMPK (AMP キナーゼ) の関与が注目されている。AMPK は骨格筋において糖の取り込みの促進、ミトコンドリアでの解糖系の促進、脂肪酸の取り込みの亢進を介し、血糖降下作用と耐糖能異常を改善する作用を発揮し、AMPK の活性化は糖尿病治療において重要なメカニズムのひとつである。その AMPK 活性化薬に metformin があり LKB1 の活性化を介して AMPK を活性化し経口血糖降下剤として広く臨床に用いられている。また、疫学研究から 2 型糖尿病患者は健康人に対し有意に各癌種で発がん率が高いことがメタ解析で証明されており[3]、さらにインスリン治療自体が発がん率を高めることが懸念されている[4]。それに対し metformin は癌発症率や癌死亡率を低下させるという報告が近年なされ注目を集めている[5]。

ところで、mTOR (mammalian target of rapamycin) は AMPK の下流で制御されているセリン・スレオニンキナーゼで、細胞の分裂や生存などの調節に中心的な役割を果たすと考えられている。

mTOR 阻害剤はすでに泌尿器科領域では転移性腎癌に対する治療薬としてチロシンキナーゼ阻害剤と前後して使用されているが、その効果は主に cytostatic で一時的であり、より強い抗腫瘍効果の得られる治療法の開発が急務である。

さらに、近年 AMPK はアポトーシスや上皮

間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) への関与が解明されつつあり、metformin は EMT 関連分子である ZEB1、TWIST、Slug、TGFβ などの転写因子を抑制することで癌幹細胞への抗腫瘍効果をもたらす薬剤としても有効である可能性が示唆されている[6]。以下に治療戦略の概略図を示す (図 1)

また、前立腺癌において我々はアンドロゲンレセプターシグナル伝達経路の阻害と Akt-mTOR 経路の阻害が相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを報告し[7]、その研究成果で society of urologic oncology (SUO)より 2011 年 Prostate Cancer Foundation Award を受賞した。我々のグループで様々な薬剤併用療法の実験手法が確立されており、ノウハウが蓄積されている[8]。そこで、今回我々は実臨床でも使用され安全性の確立された糖尿病治療薬の metformin を使用してその腎細胞がんでの腫瘍抑制効果について検討し、既存薬剤との併用療法により相乗的な抗腫瘍効果が得られるかを検討する。とくに mTOR 阻害剤との併用による AMPK-mTOR 経路の抑制メカニズム、癌幹細胞抑制のメカニズムを解明し、難治性腎癌における新たな治療戦略の一つとして最終的には臨床応用をめざし、癌患者の予後改善を目標とする。

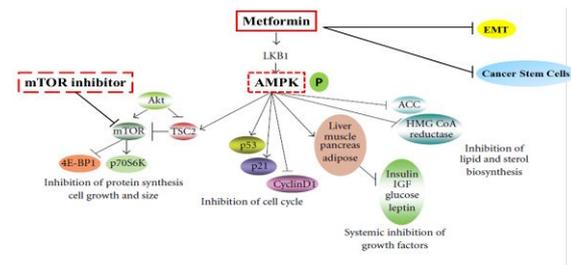


図 1.メトホルミンを中心とした癌抑制メカニズムと治療戦略の概略

2. 研究の目的

腎細胞がん分子標的治療薬は予後と QOL の改善に非常に有効ではあるが、難治例や薬剤耐性の克服が重要な課題である。そこで我々は、AMPK-mTOR 経路をターゲットとした新たな治療戦略を確立するため、メトホルミンと分子標的治療薬との相乗効果について検討した。

3. 研究の方法

まず、腎がん細胞株(786-O、769-P、ACHN、Caki-1、A498)を用いて、分子標的治療薬(エペロリムス、アキシチニブ)とメトホルミンの併用効果について検討した。細胞増殖につ

いては WST-1 アッセイ、クリスタルバイオレットアッセイを行い、相乗効果の検討は CompuSyn®にて Combination Index を算出した。アポトーシスの検出は Annexin 染色 (BD pharmingen FITC apoptosis detection Kit) による FACS ( BeckmanCoulter Cytomics FC500) で検出した。また、ウエスタンブロットにて AMPK-mTOR 経路のタンパク発現を検討した。抗体は抗 AMPK、p-AMPK、p-mTOR、mTOR、p-70S6K、AKT、p-AKT、REDD-1 抗体を用いた。( Cell signaling )

次いで、生後 6 週体重 20-30g の BALB/C nude マウス雌 50 匹 (千代田 SLC 社) を使用してイソフルレンによる吸入麻酔下において、 $3 \times 10^6$  個 LUC 遺伝子導入 A498 細胞 ( JCRB1388:A-498-Luc ) をマトリゲル®(corning 社) 0.1ml と懸濁しマウス左腎被膜下に移植し ( 48 匹 )、5 日後に D-ルシフェリン (住商ファーマインターナショナル株式会社) PBS 溶液 30mg/ml を PBS にて 1:1 で希釈した液 ( 0.2ml/匹 ) を腹腔内投与し、約 15 分後に生体発光イメージングシステム ( Perkin Elmer IVIS imaging system Spectrum BL ) を用いて発光強度を測定した。発光検出可能になったマウス 48 匹を発光強度が均等になるように各群に振り分け ( コントロール群、メトホルミン単独群、エベロリムス単独群、アキシチニブ単独群、メトホルミン + エベロリムス併用群、メトホルミン + アキシチニブ併用群 全 6 群 )、2 日後より薬剤投与を開始した。A498 細胞によるマウス同所性腫瘍移植モデルを用いて薬剤併用投与を行い、IVIS による発光イメージングによる腫瘍増殖抑制効果を比較した。また、摘出腫瘍による免疫染色にて VEGF の発現と腫瘍血管密度を測定した。

コントロール溶媒としてメチルセルロース (ニチリン化学工業) は滅菌蒸留水にて 0.1% 水溶液とし、メトホルミンは大日本住友製薬より、エベロリムスはノバルティスファーマより原末提供を受けたものを使用した。アキシチニブは Selleck chemical より購入したものをを用いた。投与は経口投与とし、メトホルミンは 250 mg/Kg/日の濃度で飲水中に懸濁し自由飲水にて投与し ( 予備実験によりマウス一匹平均 20g、1 日飲水量平均 6.4 ml より濃度調整 )、溶媒 (メチルセルロース) コントロール群、エベロリムス群 10mg/Kg、アキシチニブ群 30mg/Kg は経食道ゾンデにて体重あたり 10ml/Kg を超えないように濃度調節を行い、1 日 1 回毎日投与を行った。継続的に週 2 回腫瘍の発光強度を測定し、腫瘍量、転移巣の判定を行った。実験終了時 ( 薬剤投与開始後 37 日経過 ) にマウスを安楽死させ、開腹し臓器摘出を行い、腫瘍と共に腎臓 ( 左右 )、肺 ( 左右 )、肝臓を摘出した。摘出した腎臓腫瘍をホルマリン固定し、パラフィン包埋後 4 $\mu$ m の薄切標本を作製した。

#### 免疫組織化学染色

上記のパラフィン切片をキシレンに 10 分 $\times$ 3 回浸し、続いて 100%エタノール、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノール、50%

エタノールの順に各 20 秒浸し水洗した後に、メタノール 150ml に 30%過酸化水素水 1.5ml を加えた溶液に 10 分間浸し脱パラフィンを行った。水洗し、脱パラフィンされているか確認した後、PBS 溶液に 5 分 $\times$ 3 回浸した。次に蒸留水 475ml にクエン酸緩衝液 pH6.0 を 25ml 加えた溶液に浸してマイクロウェーブによるクエン酸処理にて抗原を賦活化した。その後、20 分間水道水で冷却し PBS 溶液に 5 分間浸した。次に希釈液 1%BSA/0.1%Tween20/PBS を用いて 30 分間ブロッキングを行い、再び PBS 溶液に 5 分間浸した。そして IMMUNO SHOT (コスモバイオ株式会社) と一次抗体として SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 社の VEGF ( A-20 ) :sc-152 を 200:1 の希釈倍率で混合したものを 200 $\mu$ l を半数の切片に滴下し、残り半数の切片には、IMMUNO SHOT と abcam 社の抗 CD34 抗体 ( EP373Y ) を 200:1 で希釈したものを 200 $\mu$ l を滴下した。滴下後すぐにパラフィルムを被せ、湿潤箱内で 4 の条件下にて 12 時間反応させた。次に PBS 溶液に 5 分 $\times$ 3 回浸した後、ヒストファイン・シンプルステイン MAX-PO (MULT1) (株式会社ニチレイバイオサイエンス) にて二次抗体反応を室温で 30 分間行った。PBS 溶液に 5 分 $\times$ 3 回浸した後、シンプルステイン DAB 溶液 (株式会社ニチレイバイオサイエンス) にて 7 分間染色を行った。切片を水洗後、ヘマトキシリン液に 1 分間浸して対比染色を行い、100%エタノールに 2 分 $\times$ 2 回、キシレンに 3 分 $\times$ 4 回浸し、カバーガラスを被せて封入し顕鏡を行った。また、対比染色として同部位の HE 染色を行った。その後、キーエンス社のオールインワン蛍光顕微鏡 BX-X700 用いて撮影した。

また、CD34 による正常ネフロン血管染色強度を internal control として 200 倍視野にて腫瘍内血管数をカウントし、ソフト内スケールバーより単位面積 ( mm<sup>2</sup> ) を求め、腫瘍全体をカウントし血管数を面積で除して micro-vessel density を算出した。

統計解析は JMP ver10 (SAS institute, CA) を用いて Student t 検定を行い  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

各細胞株にてエベロリムス、アキシチニブ、メトホルミンはそれぞれ濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示した ( 図 2 )。

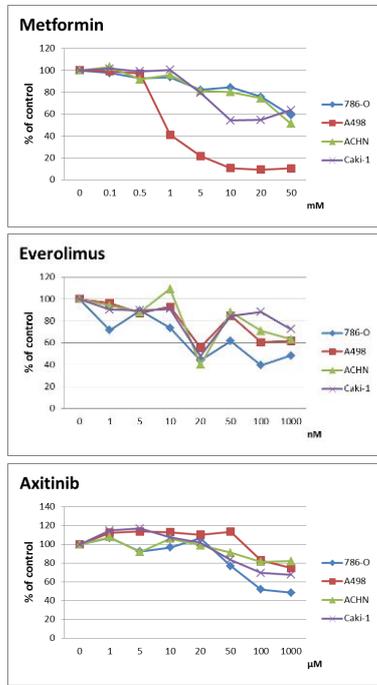


図 2. 各種薬剤における濃度依存性腫瘍抑制効果

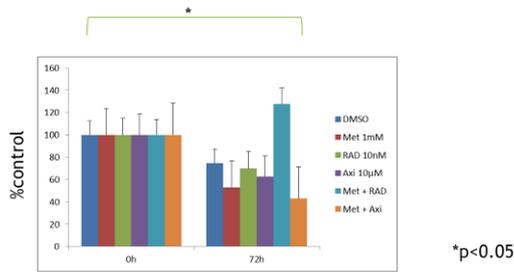


図 3. メトホルミンとエベロリムスまたはアキシチニブとの併用による増殖抑制効果

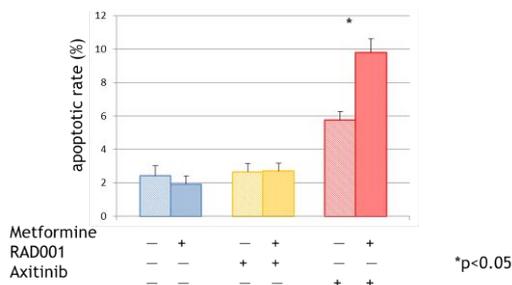


図 4. FACS での薬剤併用に伴うアポトーシス相乗効果

特に A498 においてメトホルミンの増殖抑制効果は高く、アキシチニブとの併用で相乗効果を認めた (図 3)。また、アキシチニブ、メトホルミン単剤に対して併用投与は有意にアポトーシス増強効果を示した (図 4)。

また、A498 にて薬剤投与後の AMPK シグナル経路のタンパク発現変化について検討した。DMSO に比較しメトホルミン投与によって AMPK の発現が増加していた。エベロリ

ムス投与においては mTOR の発現は抑制されていたが、メトホルミンとの併用では mTOR のリン酸化と発現がともに回復しており、p70S6K の発現も上昇していた。アキシチニブ単剤では AMPK の発現は低下していたがリン酸化は亢進していた。また mTOR の発現は抑制されていなかった。しかしメトホルミンとの併用にて AMPK の発現回復とリン酸化の亢進、mTOR の発現抑制、p70S6K の強い発現低下を認めた。メトホルミンとアキシチニブ併用では REDD1 タンパク発現が抑制されていた (図 5)。

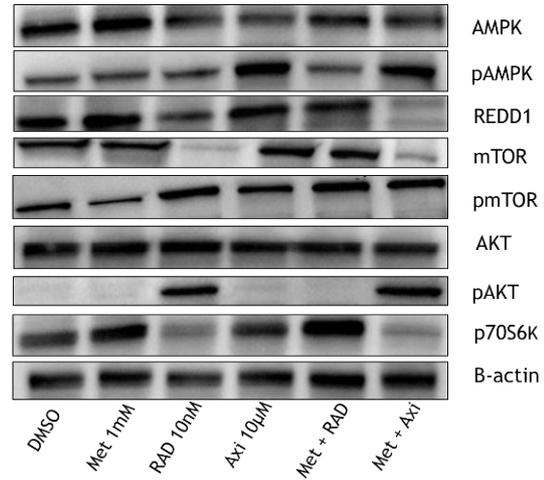
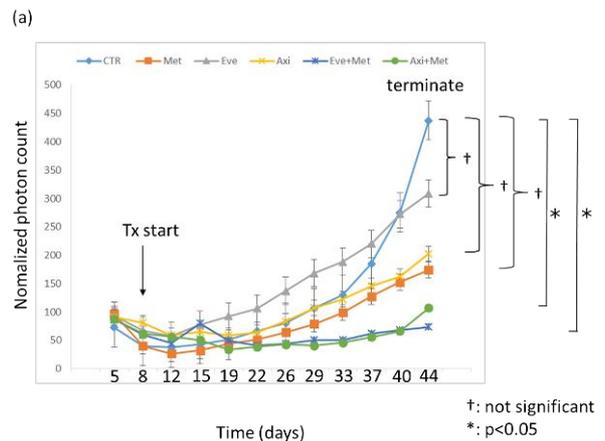


図 5. ウェスタンブロットによる標的タンパク発現

次にマウスモデルでの結果を示す。コントロール群、メトホルミン投与群、エベロリムス投与群、アキシチニブ投与群、メトホルミン+エベロリムス併用療法群、メトホルミン+アキシチニブ併用療法群の腫瘍増殖曲線である。腫瘍体積の代替としてルシフェリンによる代謝発光を IVIS で測定し、平均値を時間経過とともにプロットした。相対的な腫瘍発光強度はコントロール群、薬剤単独投与群と比較してメトホルミンとエベロリムスもしくはアキシチニブ併用群で有意に低く、相乗的な腫瘍増殖抑制効果が示された (図 6a)。



†: not significant  
\*: p<0.05

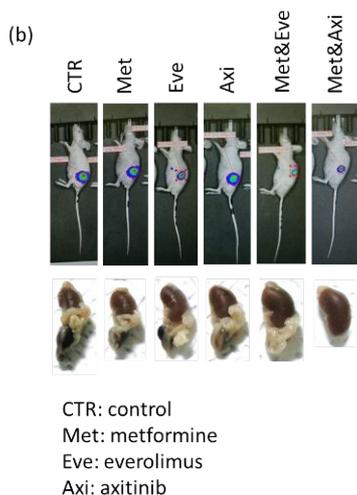


図 6 . 腎がん細胞株のマウス同所移植モデルにおける薬剤併用による抗腫瘍効果

- (a) 継時的に発光強度を測定し腫瘍増殖抑制効果をグラフ化した。併用群では有意に腫瘍増殖抑制が認められた。
- (b) 治療各群での代表的な腫瘍発光強度と摘出腫瘍の比較。

また体重を毎日測定したが、各群間で治療中の体重変化には有意差は認めなかった。腫瘍発光強度と摘出腫瘍の比較でもコントロール群、薬剤単独投与群と比較してメトホルミンとエベロリムスまたはアキシチニブ併用療法群において腫瘍増殖抑制効果が確認された(図 6b)。

最後に摘出腫瘍の免疫染色による治療各群間での代表的な結果を示す。やはり、コントロール群、薬剤単独投与群に比べ、併用療法群で有意に VEGF、CD34 の両者とも発現低下しており、腎腫瘍における血管新生抑制効果が示唆された(図 7)。また、CD34 にて計測される新生血管密度においても各群に比し併用療法群では有意な減少が確認された(図 8)。

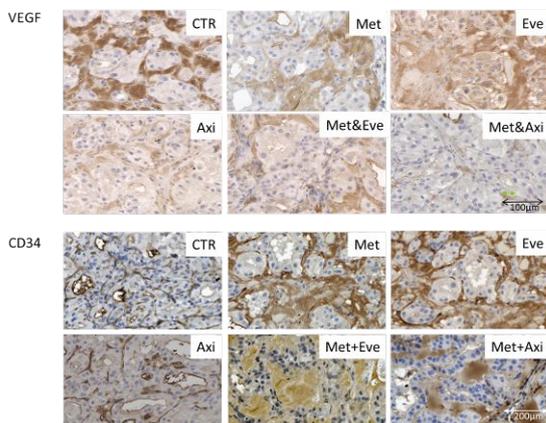


図 7 摘出腫瘍の免疫染色による VEGF、CD34 の発現

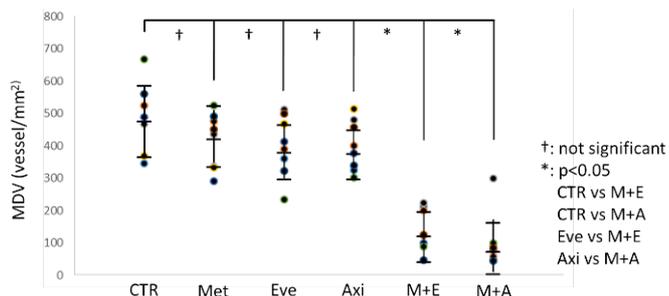


図 8 . 摘出腫瘍組織内における新生血管密度の比較

CD34 による正常ネフロン血管染色強度を internal control として 200 倍視野にて腫瘍内血管数をカウントし、ソフト内スケールバーより単位面積 (mm<sup>2</sup>) を求め、腫瘍全体をカウントし血管数を面積で除して micro-vessel density を算出した。

\*CTR: control, Met: metformin, Eve: everolimus, Axi: axitinib, M+E: metformin+everolimus, M+A: metformin+axitinib

### 結論と展望

メトホルミンは腎癌細胞においても細胞増殖抑制効果を示し、AMPK 活性化を介した新たな癌治療戦略の一つとして期待できると思われた。とくにメトホルミンとアキシチニブの併用は臨床応用可能で有望な治療法であることが示唆された。

### 引用文献

- [1] Luo Z. et al. TRENDS in Pharmacological Sciences 2005; 26: 69-76.
- [2] Jalving M. et al. Eur J Cancer. 2010; 46: 2369-80.
- [3] Giovannucci E. et al. CA Cancer J Clin 2010; 60: 207-221.
- [4] Bowker SL. et al. Diabetes Care 2006; 29: 254-258.
- [5] Libby G. et al. Diabetes Care 2009; 32: 1620-1625.
- [6] Cufi S et al. cell cycle.2010;4461-68.
- [7] Matsumoto H et al. Cancer Res 2013; 73: 5206-5217.
- [8] Gleave ME et al. Urology. 2001;58:39-49.

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

松本 洋明

メトホルミンによる腎細胞がん分子標的治療薬の耐性克服と相乗効果の検討  
第54回日本癌治療学会 2016年10月20日  
～22日 神奈川県・横浜市 パシフィコ横浜  
(発表確定)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 洋明 (MATSUMOTO, Hiroaki)  
山口大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60610673

(2)研究分担者

松山 豪泰 (MATSUYAMA, Hideyasu)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70209667

(3)連携研究者

なし