

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860540

研究課題名(和文)メトフォルミンの抗腫瘍効果の基礎的研究

研究課題名(英文)The antidiabetic drug metformin inhibits esophageal adenocarcinoma cell proliferation in vitro and in vivo.

研究代表者

小林 三善 (KOBAYASHI, Mitsuyoshi)

香川大学・医学部附属病院・協力研究員

研究者番号：70423431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道腺癌細胞株において、メトフォルミンを投与により細胞増殖抑制効果を確認した。細胞周期関連分子の解析ではメトフォルミン投与は非投与群と比較しCyclinD1, Cdk4, Cdk6の発現が抑制されRbのリン酸化の低下を確認した。RTK array を用いた解析ではEGFR, IGF-Rなどが抑制されていた。また30種類のmiRNAsの発現動態が有意に変化し、様々な癌関連のmiRNAsの変化も認められた。また、移植食道腺癌における実験としてヌードマウスの皮下に移植したバレット食道腺癌組織に対するメトフォルミン投与による癌細胞抑制の解析を行いメトフォルミンの腫瘍増殖抑制効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：Metformin inhibited the proliferation of the esophageal adenocarcinoma cell lines OE19, OE33, SK-GT4 and OACM 5.1C, blocking the G0 to G1 transition in the cell cycle. This was accompanied by strong reductions in G1 cyclins, especially cyclin D1, cyclin-dependent kinase (Cdk)4, and Cdk6, and decreases in retinoblastoma protein phosphorylation. In addition, metformin reduced the phosphorylation of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor and insulin-like growth factor-1 receptor, as well as angiogenesis-related proteins, such as vascular endothelial growth factor, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, and TIMP-2. Metformin also markedly altered microRNA expression. Treatment with metformin of athymic nude mice bearing xenograft tumors reduced tumor proliferation. These findings suggest that metformin may have clinical use in the treatment of esophageal adenocarcinoma.

研究分野：消化器内科学

キーワード：マイクロRNA 癌増殖抑制 メトフォルミン バレット食道腺癌

研究開始当初の背景

1. 欧米の最近の統計では食道癌の約半数を腺癌が占めるようになってきており、その多くがバレット食道腺癌であるとされている。本邦では食道癌の 90% 以上は扁平上皮癌であり、腺癌は 1~2% を占めるに過ぎない。しかし、食生活・体格の欧米化およびヘリコバクター・ピロリ菌感染率の低下に伴い、今後バレット食道腺癌が増えてくることが予想されている。食道がん治療においては、内視鏡治療、手術療法、化学療法、放射線療法など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。このような情勢から、現在の内科的、外科的治療に加えて患者にとって優しい(身体的・経済的負担の少ない)治療法が急務である。すなわち副作用の少ない、臨床応用の可能性の高い、安価なバレット食道腺癌に対する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 億からタンパク翻訳に使用される遺伝子は 1.5% に過ぎず、タンパク数にして 2 万 2 千を規定しているに過ぎないということが判明した。さらに意外なことにゲノム DNA の 70% が RNA に転写されており、細胞内の膨大な未知の 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・進展に関与しているのではないかと推測されている。

我々はこれまで、マイクロ RNA の変化、細胞周期の破綻、レセプター型チロシンキナーゼの増強、癌遺伝子の活性化について検討し、肝癌、胃癌等の分子機構について研究を続け、それらの癌において、消化器癌の新たな治療標的分子の基礎研究を推し進めてきたが、今後、増加が予想される食道腺癌においても同様の手法を用いて研究を開始した。

2. 研究の目的

バレット食道腺癌におけるインスリン抵抗性改善薬(メトフォルミン)の抗腫瘍効果の基礎的研究。メトフォルミンの癌細胞増殖抑制に関連する標的マイクロ RNA の同定を目指して

メトフォルミンのバレット食道腺癌に対する抗腫瘍効果について研究し、治療薬につながるかどうかを検討する。また、メトフォルミンの癌抑制メカニズムを、細胞周期分子、

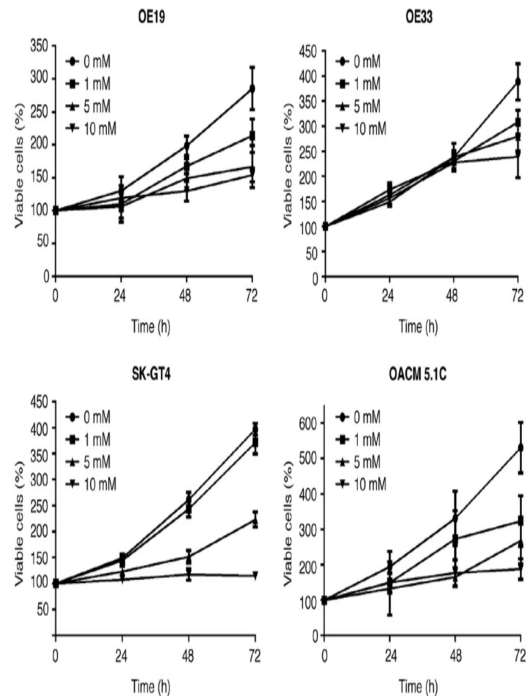
アポトーシス関連分子、血管新生分子、チロシンキナーゼレセプター分子、マイクロ RNA の網羅的に解析し、抗腫瘍効果に関連する分子群を拾い上げ、診断・治療に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vitro の系: 食道腺癌株として、OE19, OE33, SK-GT4, OACM5.1-C の 4 種類を使用した。メトフォルミン投与による細胞増殖を cell proliferation assay で、種々の細胞周期関連分子動態は Western blot 法により検討した。またメトフォルミン投与により、誘導される miRNA についてアレイを用いて網羅的に検討した。(2) In vivo の系: OE19 細胞をヌードマウスに皮下移植し、メトフォルミンが in vivo においても増殖抑制するかを検討し、関連する miRNAs についても in vitro 同様に検討した。

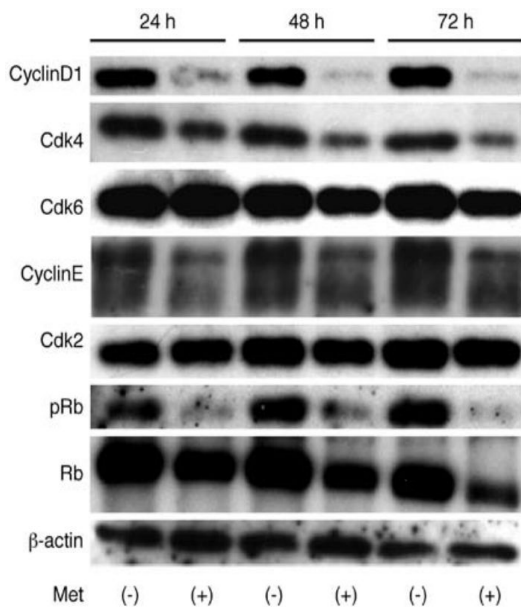
4. 研究成果

(1) In vitro の系: cell proliferation assay において、メトフォルミンが全ての食道腺癌株において濃度依存的に細胞増殖抑制効果があった。



フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析から、メトフォルミン投与により食道腺癌細胞を G1 アレストに導いていた。

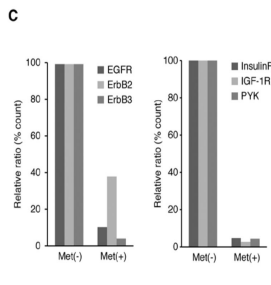
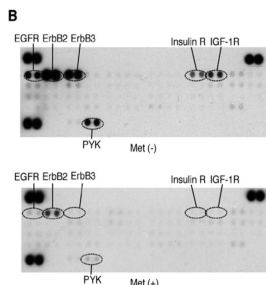
メトフォルミンの細胞増殖抑制効果は、ウエスタンブロット解析から細胞周期関連分子である CyclinD1, Cdk4, Cdk6 の発現が抑制され Rb のリン酸化は低下していた、



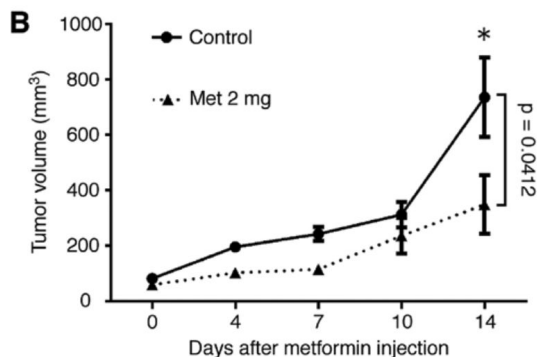
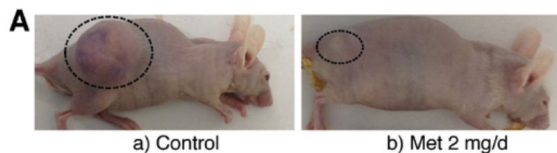
RTK array を用いた解析ではメトフォルミンは EGFR, IGF-R などの活性を抑制していた。

A

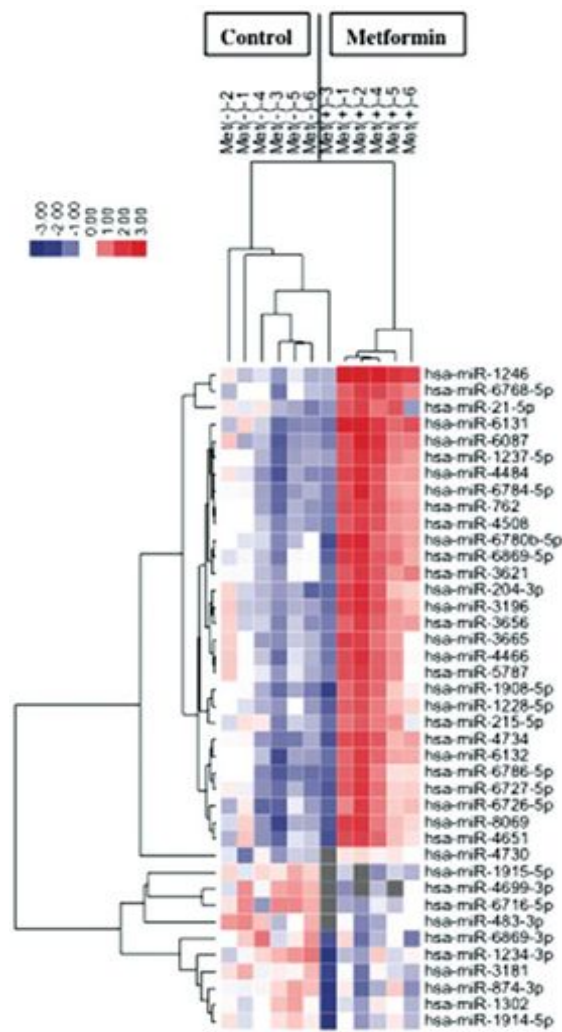
Reference Spots	EGF R	ErbB2	ErbB3	ErbB4	FGF R1	FGFR2	FGF R3	FGF R4	Insulin R	IGF-1 R	Axl	Reference Spots
Mer	HGF R	MSP R	PDGFR α	PDGFR β	SCF R	Flt-3	M-CSF R	C-Ret	ROR1	ROR2	Tie-1	Dlk
Tie-2	TrkA	TrkB	TrkC	VEGF R1	VEGF R2	VEGF R3	MuSK	EphA1	EphA2	EphA3	EphA4	
EphA6	EphA7	EphB1	EphB2	EphB4	EphB6	ALK	DDR1	DDR2	EphA5	EphA10		
Reference Spots		EphB3										PBS



(2) In vivo の系 : 0E19 細胞を ノードマウスに皮下移植し、メトフォルミン投与群と非投与群を比較したところメトフォルミン投与群で、腫瘍の増殖を抑制していた。



また、腫瘍細胞においてメトフォルミン投与群と非投与群において多くの miRNA が変化しており様々な癌関連の miRNAs の変化も認められた、



以上の結果からメトフォルミンは食道腺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、ノードマウスにおいて食道腺癌の皮下移植モデルにおいても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 1 件)

Fujihara S, Kato K, Morishita A, Iwama H, Nishioka T, Chiyo T, Nishiyama N, Miyoshi H, Kobayashi M, Kobara H, Mori H, Okano K, Suzuki Y, Masaki T. Antidiabetic drug metformin inhibits esophageal adenocarcinoma cell proliferation in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 46(5):2172-80. 2015

DOI: 10.3892/ijo.2015.2903 (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

日本消化器病学会総会 シンポジウム発表
2015/4/23 仙台国際センター (宮城県仙台市)

S1-6 インスリン抵抗性改善薬 Metformin による食道腺癌に対する細胞増殖抑制 (香川大学消化器・神経内科) 藤原新太郎, 加藤清仁, 小原 英幹

〔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

小林 三善 (Kobayashi Mitsuyoshi)

香川大学・医学部附属病院・協力研究員

研究者番号: 70423431