

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06696

研究課題名(和文) PIK3CAの活性化変異を有する細胞に選択的なメトホルミンの作用機序の解明

研究課題名(英文) Selective effects of metformin on the cells with PIK3CA activating mutations

研究代表者

鈴木 康予 (Suzuki, Yasuyo)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・主任研究員

研究者番号：60416188

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)：PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) は近年提唱された疾患概念で、PIK3CAの活性化変異で発症し、出生時より皮下脂肪や下肢などに肥大が認められる過成長症候群である。我々は、メトホルミンがPROS患者由来の皮膚線維芽細胞の増殖を選択的に抑制することを初めて明らかにした。メトホルミンは小児に発症するPROSの有効な治療薬と考えられるが、その作用機序は不明である。そこで、本研究ではメトホルミンの作用機序を明らかにするため、PROS患者と同じくPIK3CA遺伝子にc.3140A>G変異を有する細胞を用いて生化学的および分子生物学的な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々が発見した「PIK3CAの活性化変異を有する細胞の増殖を選択的に抑制するメトホルミンの作用」という、これまでにない新しい観点から行った研究である。細胞内のシグナル伝達や代謝に及ぼすメトホルミンの作用には、未だ不明な点が多い。本研究により、メトホルミンの新たな作用機序を明らかにすることは、PROSの病態に関する新たな知見が得られるだけでなく、治療につながる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Recently, mosaic or segmental overgrowth, a clinical condition caused by heterozygous somatic activating mutations in PIK3CA, was established as PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). PROS is caused by activating mutations in PIK3CA encoding the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA, also known as p100). We have shown that metformin selectively inhibits the proliferation of fibroblasts from PROS patients, but not healthy fibroblasts. Since PROS is a developmental disorder in children, metformin is a candidate drug for treating PROS. However, the mechanism that metformin selectively inhibits cell proliferation of PROS cells is unclear. In this study, to determine the effect of metformin on cells with activating mutations in PIK3CA, biochemical and molecular biological analyses were performed using human breast cancer MDA-MB-453 cells with the heterozygous PIK3CA mutation (c.3140A>G).

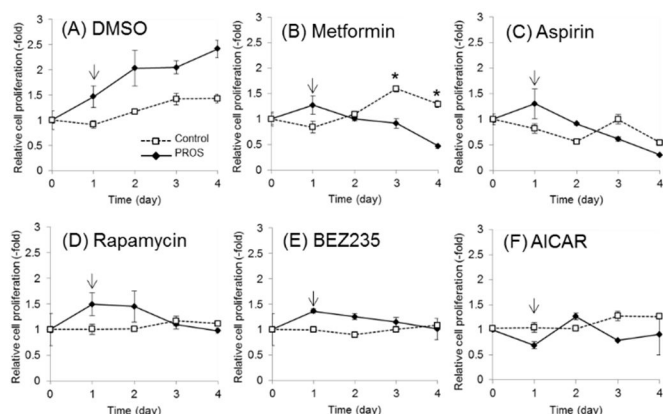
研究分野：細胞生物学

キーワード：過成長症候群 PROS PIK3CA メトホルミン

## 1. 研究開始当初の背景

過成長症候群は、出生時あるいは出生直後より著明な体重増加や頭部・四肢・体幹などに局所的な肥大をきたす先天性疾患群の総称である。近年提唱された *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) という疾患概念は [Keppler-Noreuil et al. 2015]、PI3K の触媒サブユニットをコードする *PIK3CA* 遺伝子の突然変異 (活性化変異) で発症し、出生時あるいは出生直後より脂肪組織や骨格などにモザイク性の肥大 (増殖) が認められる過成長症候群のひとつである。

我々は、出生時より下肢及び趾の肥大と合指症、下肢長差を呈する PROS 症例を経験した。本症例は、成長とともに脂肪組織の増殖を認め、3歳4か月時に3度目の外科的治療として皮下組織切除及び下肢縮小術が実施された。我々は治療の際に除去された病変組織より *PIK3CA* のヘテロ接合性モザイク変異 (c.3140A>G, [p.H1047R]) を同定し、臨床所見と合わせて本症例は PROS と診断された。このように、PROS は *PIK3CA* の塩基配列を解析することで確定診断が可能である。しかし、根本的な治療方法がなく、現時点で可能な処置は過成長の患部に対する減量術などの外科的治療と下肢長の左右差に対する装具などを使用した保存的治療といった対症療法のみである。これまでに報告された文献から、PROS は出生時から少なくとも思春期までは過成長が続くことが示唆されており、過成長を抑制する治療方法の開発は急務である。そこで、我々は治療方法の開発のため、PROS の疾患モデルとして病変部の皮膚組織から皮膚線維芽細胞株を樹立した。PROS 患者由来線維芽細胞 (以下、PROS 細胞) では、コントロールとして用いた健常者由来の線維芽細胞 (健常細胞) に比べて PI3K/AKT/mTOR シグナル経路の過剰な活性化が確認された。そこで、mTOR 阻害薬のラパマイシン、PI3K/mTOR 阻害薬の NVP-BEZ235、そして AMPK 活性化による mTOR 阻害作用が報告されているアスピリン、メトホルミン、AICAR をそれぞれの細胞に投与して細胞増殖抑制効果の解析を行った (図1)。メトホルミンは PROS 細胞の細胞増殖を抑制したが、健常細胞ではこれらの抑制効果は軽度であった。一方、アスピリン、AICAR、ラパマイシン、NVP-BEZ235 では PROS 細胞と健常細胞の両方で細胞増殖を抑制した。すなわち、メトホルミンは健常細胞に対する毒性が低く、*PIK3CA* の活性化変異を有する PROS 細胞の増殖を選択的に抑制することが明らかになった。この結果は、成長過程にある小児でもメトホルミンが使用可能な PROS の候補治療薬であることを示している。以上の研究成果は *Oncotarget* 誌で発表した [Suzuki et al. 2017]。



**図1. 薬剤投与による増殖抑制効果**  
PROS 細胞と健常細胞に薬剤を投与し、MTT 法で細胞増殖を測定した (n = 3)。平均値 ± SD で表し、矢印は薬剤を投与した時点を示す。

- (A) DMSO
- (B) 10 mM メトホルミン
- (C) 1 mM アスピリン
- (D) 1 nM ラパマイシン
- (E) 100 nM NVP-BEZ235
- (F) 1 mM AICAR

Suzuki et al. (2017) 改変

メトホルミンの作用に関して多くの研究がなされているが、細胞内のシグナル伝達や代謝に及ぼす影響には未だ不明な点が多い。最も知られているメトホルミンの作用は、mTOR シグナル伝達の抑制を引き起こす AMPK の活性化である [Viollet et al. 2012]。しかし、我々の研究では、メトホルミンによる AMPK のリン酸化は健常細胞と PROS 細胞で差が見られなかった。さらに、AMPK 活性化剤である AICAR を細胞に投与すると、PROS 細胞だけでなく健常細胞の増殖も抑制された (図1F)。従って、メトホルミンの作用機序は AICAR とは異なると考えられ、メトホ

ルミンが PROS 細胞の増殖を選択的に抑制する機構は、AMPK の活性化以外にあると予想された。すなわち、メトホルミンの細胞増殖抑制機構には未知のシグナル伝達経路あるいは代謝経路が関係している可能性が高いと考えられた。

## 2 . 研究の目的

本研究では、我々が発見したメトホルミンが *PIK3CA* の活性化変異を有する細胞の増殖を選択的に抑制するメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究の成果は、PROS の病態が明らかになるばかりでなく、治療につながる可能性も高い。*PIK3CA* 遺伝子に c.3140A>G 変異を有する細胞にメトホルミンを投与し、変動の見られるタンパク質を解析することによって、メトホルミンが影響を及ぼすシグナル伝達経路あるいは代謝経路を明らかにする。

## 3 . 研究の方法

### (1) MDA-MB-453 細胞へのメトホルミン投与

MDA-MB-453 細胞 (ATCC<sup>®</sup> HTB-131<sup>TM</sup>) は ATCC から購入した。MDA-MB-453 細胞は 10% FBS を添加した Leibovitz's L-15 medium を使用し、37°C の大気雰囲気条件下で培養を行った。細胞には、終濃度 10 mM となるようにメトホルミン塩酸塩 (Sigma- Aldrich) を投与した。

細胞の増殖能の測定は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用いた。細胞を  $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 96-well culture plate に撒き、測定する well に MTT solution (5 mg/mL in PBS) を 10  $\mu$ L 添加して 37°C で 2 時間インキュベートした後、生成されたホルマザンを 200  $\mu$ L MTT solvent (40 mM HCl in isopropanol) で溶解して 570 nm の吸光度を測定した。

生化学的・分子生物学的な解析には、 $1.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 35-mm ディッシュに撒いた細胞を用いた。培養開始から 24 時間後にメトホルミンを投与し、2 日間培養した細胞を回収して、ウエスタンブロット、二次元電気泳動、RNA-seq に用いた。

### (2) ウエスタンブロット解析

回収した細胞は、PBS でウォッシュしたのちに SDS サンプルバッファーで調製し、11% SDS ポリアクリルアミドゲルで分離した後、ウェット式ブロッティング装置で PVDF 膜に転写した。転写された PVDF 膜は 5% BSA でブロッキングした。一次抗体は anti-pan-AKT、anti-phospho-AKT (Ser473)、anti-pan-S6、anti-phospho-S6 (Ser235/236) (Cell Signaling Technologies) と内在性コントロールとして anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich) を用い、HRP 標識二次抗体で標識して、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) で検出した。

### (3) 二次元電気泳動によるタンパク質の分離

回収した細胞は、PBS でウォッシュしたのちに pH 未調整の 20 mM Tris 溶液で懸濁し、超音波破碎した。細胞破碎液は、100,000 x g で 60 分間遠心し、上清を可溶性画分とした。可溶性画分は膨潤サンプルバッファーで希釈し、ブロードレンジ IPG ストリップ (11 cm、pH 3 - 10 ノンリニア; Bio-rad) に In-Gel Rehydration 法でアプライし、プロテイン IEF セル (Bio-rad) で等電点電気泳動を行った。IPG ストリップは平衡化バッファ I、II で SDS 化・平衡化して 11% SDS ポリアクリルアミドゲルにロードし、SDS-PAGE を行った。二次元電気泳動で展開したタンパク質は銀染色 MS キット (Wako) で可視化し、メトホルミンの投与によって変動が認められたタンパク質のスポットを単離した。

### (4) 質量分析によるタンパク質の同定

メトホルミンの投与によって変動が認められたタンパク質の二次元電気泳動スポットはトリプシンを用いた In Gel Digestion によりフラグメント化し、UltiMate3000 RSLCnano LC system (Dionex) と連結した Q Exactive mass spectrometer (ThermoFisher Scientific) を用いた LC-MS によっ

て分析した。LC-MS の分析プロファイルから Mascot サーチを用いたペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析によってタンパク質を同定した。本解析は、名古屋大学大学院医学系研究科附属医学教育研究支援センター 分析機器部門 分子構造解析研究室の委託分析によって実施した。

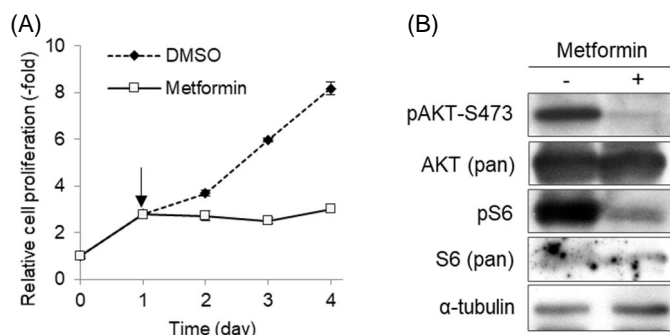
#### (5) RNA-seq 解析

回収した細胞から、NucleoSpin RNA plus (Takara bio) で RNA を抽出し、次世代シーケンサー (HiSeq/NovaSeq; Illumina) で RNA-seq 解析を行った。本解析は、2020 年度第 2 回先進ゲノム支援 (PAGS) による支援を受けて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) MDA-MB-453 細胞へのメトホルミン投与の効果

当初の計画では、PROS 患者由来皮膚線維芽細胞を用いて研究計画を進める予定であったが、細胞の継代培養を重ねることで形態や増殖速度などに変化が生じてきたため、継続したデータ収集が困難であると判断した。そこで、発端者と同じ *PIK3CA* のヘテロ接合性変異(c.3140A>G)を有するヒト乳がん由来の MDA-MB-453 細胞の使用を検討した。MDA-MB-453 細胞は、PROS 患者由来皮膚線維芽細胞と同様に、メトホルミンを投与することによって細胞増殖が抑制された(図 2A)。さらに、メトホルミンは、MDA-MB-453 細胞でもリン酸化 AKT およびリン酸化 S6 の減少、すなわち PI3K/AKT/mTOR シグナル経路を抑制することが確認できた(図 2B)。以上のように、PROS 患者由来皮膚線維芽細胞で見られたメトホルミンの効果が MDA-MB-453 細胞でも確認されたため、当初の研究計画に沿った解析を MDA-MB-453 細胞で行うことにした。

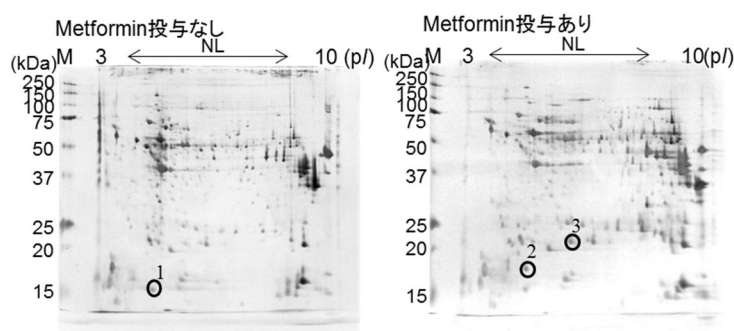


**図 2. メトホルミン投与による MDA-MB-453 細胞への影響**

(A) 培養 1 日目からメトホルミンを投与し、MTT 法で細胞増殖能を測定した (n=3)。グラフは平均値±SD で表し、矢印は投与した時点を示す。  
(B) メトホルミンを 2 日間投与した細胞と投与しなかった細胞を回収し、ウエスタンブロット解析によって PI3K/AKT/mTOR シグナル経路への影響を調べた。

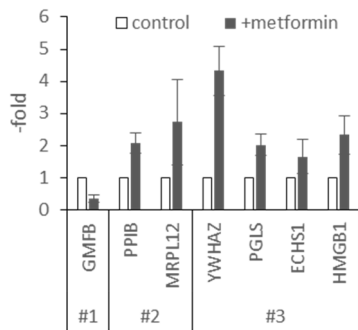
#### (2) メトホルミンを投与した MDA-MB-453 細胞でのタンパク質の動態変化

メトホルミンが *PIK3CA* 活性化変異を有する細胞の増殖を選択的に抑制するメカニズムを明らかにするため、MDA-MB-453 細胞から可溶性画分を調製し、二次元電気泳動による解析を行い、メトホルミンを投与した MDA-MB-453 細胞で動態の変動するタンパク質を同定した。複数回の解析の結果、メトホルミン投与によって減少するスポット(図 3、No. 1)と増加するスポット(図 3、No. 2, 3)を特定した。各スポットは LC-MS 分析の後に Mascot 解析を行い、いくつかのタンパク質の候補が得られた。MDA-MB-453 細胞へのメトホルミンの投与により、各候補分子の発現変動を Real-time RT-PCR で確認したところ、7 つの候補が想定した動態を示すことが分かった(図 4)。



**図 3. メトホルミン投与によるタンパク質の動態変動**

MDA-MB-453 細胞の可溶性画分を二次元展開(一次元: 等電点、二次元: SDS-PAGE)した。○印はメトホルミン投与によって変動したタンパク質のスポットを示す。

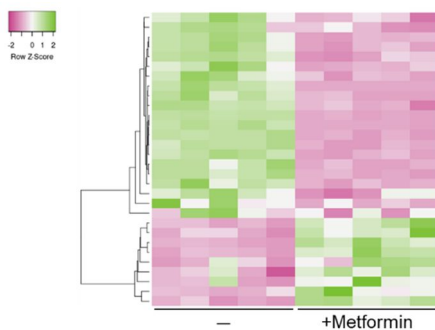


**図 4. メトホルミン投与による動態変動候補タンパク質の発現解析**

MDA-MB453 細胞へのメトホルミンの投与によって、動態変動が見られた二次元電気泳動スポットから同定された候補タンパク質の遺伝子発現を Real-time PCR で解析した。タンパク質の動態(図 3)と合致したもののだけを示してある。

### (3) メトホルミンを投与した MDA-MB-453 細胞での遺伝子発現変動

二次元電気泳動による解析から、メトホルミンを MDA-MB-453 細胞に投与することによって引き起こされる新規のタンパク質の発現変動を同定することができたが、これらの因子と PI3K/AKT/mTOR シグナル経路との関係は不明なままであった。PIK3CA の活性化変異を持つ細胞に選択的なメトホルミンの作用機序を解明するためには、まだデータが不十分であると考えられた。そこで、メトホルミンを投与した MDA-MB-453 細胞と投与していない細胞からそれぞれ 5 サンプルずつ RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。その結果、PI3K/AKT/mTOR シグナル経路に関連する遺伝子群の発現は、メトホルミン投与の影響を受けることが示唆された(図 5)。また、発現変動遺伝子に対するパスウェイ解析では、メトホルミンが PI3K/AKT/mTOR シグナル経路の上流に位置する受容体の発現に影響を及ぼしている可能性が見出された。



**図5. PI3K/AKT/mTOR シグナル経路の関連遺伝子のヒートマップ**

RNA-seq データから PI3K/AKT/mTOR シグナル経路に関連する 30 の遺伝子を解析した。

MDA-MB-453 細胞は、PIK3CA 以外の遺伝子にも変異が確認されているため、メトホルミン投与による遺伝子発現変動が PIK3CA 活性化変異以外の影響である可能性も否定できない。そこで、ゲノム編集によって健常者由来の皮膚線維芽細胞に PIK3CA c.3140A>G および c.3140A>T の導入を試みた結果、変異の出現頻度が高い c.3140A>T 変異をヘテロまたはホモで持つ細胞が得られた。今後は、本研究の RNA-seq 解析で得られた結果の再現性を確認するため、ゲノム編集で得られた PIK3CA c.3140A>T 細胞を用いて Real-time PCR 法により個々の遺伝子の発現変動を検証する。

### < 引用文献 >

Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, Alomari A, Ezaki M, Dobyns W, Biesscker LG. (2015) PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. Am J Med Genet A, 167:287–295.

Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N (2017) The effect of rapamycin, NVP-BEZ235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). Oncotarget, 8:45470–45483.

Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci, 122:253–270.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木康予
2. 発表標題 PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) : 症例の解析とPI3K/AKT/ mTORシグナル阻害剤の治療効果
3. 学会等名 第1回藤田医大疾患モデル科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター 発達障害研究所 遺伝子医療研究部門 <a href="https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/department/index3.html">https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/department/index3.html</a>
--

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

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