

## 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24年 5月 8日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592123

研究課題名（和文）子宮体癌に対するメトホルミンの増殖抑制効果：作用機序の特定と臨床応用にむけた研究

研究課題名（英文）To investigate of anti-neoplastic effect of metformin in endometrial cancer

研究代表者

三橋 暁 (MITSUHASHI AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40302541

研究成果の概要（和文）：

メトホルミンは、G1 停止により子宮体癌細胞の増殖を抑制した。この作用機序として、AMPK の活性化による mTOR 抑制に加えて、MAPK の抑制が関与している可能性がある。また、培養細胞で確認された AMPK 活性化、mTOR 抑制に加えて、MAPK の抑制も認められた。

メトホルミンの臨床使用量での短期投与で、子宮体癌組織で ki67 index の低下を認めた。In vivo でのメトホルミンの作用は間接作用の可能性も示唆される。

若年性体癌・異型内膜増殖症に対する MPA 療法にメトホルミンを併用することで、インスリン抵抗性を改善し、再発率も低下させた。子宮体癌患者に対するメトホルミン療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

1) The anti-neoplastic activity of metformin was observed *in vitro* and *in vivo* in endometrial cancer cell lines and in patients with endometrial cancer. Metformin appears to be a useful therapy in the prevention and treatment of patients with endometrial cancer.

2) The recurrence rate in our study was lower than that observed in the previous study. Metformin may inhibit endometrial cancer recurrence after MPA therapy. Metformin also improved insulin resistance in young endometrial cancer patients who were at risk of developing diabetes mellitus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、メトホルミン

### 1. 研究開始当初の背景

近年本邦では、子宮体癌（類内膜腺癌）が増加し、それに伴い妊孕性温存希望の若年性体癌も増加している。若年性体癌症例はPCOSやホルモン異常を伴い、背景に肥満やインスリン抵抗性などを有することが多い。若年性体癌の子宮温存療法として酢酸メドロキシプロゲステロン（MPA）療法が行われているが、奏成功率は高いものの、再発率が高いのが問題となっている。一方、メトホルミン（Met）は2型糖尿病治療薬であるが、Met服用中の糖尿病患者に癌の発生が少ないこと、乳癌術前化学療法の奏成功率が高いことが報告された。MetはPCOS症例の排卵誘発に有効性が証明されている薬剤でもあり、若年性体癌症例には不妊治療に対する効果も期待できる。また、乳癌、前立腺癌、大腸癌等種々の培養細胞株に対し、増殖抑制効果が報告された。作用機序として、AMPKの活性化を介したmTOR経路の抑制が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮体癌培養細胞株を用い、メトホルミンの抗腫瘍・増殖抑制効果を確認その作用機序を明らかにする。また、子宮体癌手術予定患者に投与し、in vivoでの効果も確認する。さらに子宮体癌MPA療法後のMet投与が、子宮体癌の再発を予防するか探索的研究を行い、臨床応用の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 若年性子宮体癌・異型内膜増殖症の温存

療法にMPA+Metの併用療法を行い、再発が抑制されるか検証する。40歳以下のAEHおよびEC（IaかつG1）で温存療法を希望した患者に、MPA（400mg/日、24週）とMet（2250mg/日）を併用投与した。MetはMPA終了後も継続投与した。効果判定は3ヶ月毎に全面掻爬術を行い、MPA投与により病変の消失したものをCR、病変は残存するがホルモン効果を認めるものをPRとした。悪性度が上昇した場合・9ヶ月でCRに達しない場合はホルモン治療を中止し根治手術を検討した。CR例のうち、挙児希望者には積極的な生殖補助医療を推奨し、それ以外の患者には低用量ピルを妊娠希望時まで投与した。また、治療前に、75g OGTTにより耐糖能・IRを評価した。

副次的に副作用、奏成功率、妊娠率も検討する。

#### 2) 子宮内膜癌培養細胞株 ISHIKAWA 株、HEC1B 株や初代培養細胞株を用いてメトホルミンの増殖抑制効果を確認する。

増殖抑制効果はMTT法で検出する。増殖抑制、抗腫瘍効果の効果を確認するために、Met投与後の細胞周期の変化やアポトーシスの有無をFACS解析で行う。また、Met添加前後のcyclin D1,p27, Rbの発現やphosphorylated AMPK, p70S6K1, S6Kの発現をwestern blottingにて比較する。

#### 3) 子宮体癌患者への短期的な投与で、Met投与前後の組織を比較し、細胞周期蛋白・ERK/AMPK-mTOR経路関連蛋白への作用をwestern blottingにて確認する。

Met投与前後の組織を比較し、免疫組織学的に、ki67 indexを比較する。臨床投与量のメトホルミン投与

後の血中、および組織内のメトホルミン濃度を測定し、子宮局所での作用を確認する。

#### 4. 研究成果

1) 子宮内膜異型増殖症 15 例、子宮体癌 15 例に MPA+Met 併用療法を行った。現在まで 25 例が MPA 投与終了、6 ヶ月で 18 例が CR (奏効率 72%)、9 ヶ月で 22 例が CR (奏効率 88%) となった。残り 3 例は PR でプロトコルから除外したが、MPA 追加投与 (3~6 ヶ月) で全例 CR となった。CR22 例中 3 例 (14%) に、再発を認めた。奏効率のうち再発率はそれぞれ 0%、23% と既報告にくらべ低い傾向が確認された。Met 服用による再発予防効果が示唆された。30 例の BMI 値は平均 31.2 (19-51) で、25 以上の肥満が 87% を占めた。75g OGTT では糖尿病型 6 例、境界型 8 例、23 例 (77%) に IR を認めた (HOMA-R 平均値 5.1 [0.9-20.7]、IRI 120 分値 157 [30-591]  $\mu$ U/ml)。若年性体癌症例の 77% にインスリン抵抗性を認めたが、治療後はインスリン抵抗性は有意に低下していた。

2) Met の添加は、培養細胞株の増殖を濃度依存性・時間依存性に抑制した。この増殖抑制は G1 停止によると考えられた。培養細胞株・手術患者いずれも、Met により cyclin D1 とリン酸化 Rb の発現が低下し、p27 の発現が亢進した。さらに AMPK 活性化・S6K1 活性低下のほか、リン酸化 ERK 1/2 の発現低下を認めた。

子宮体癌培養細胞株 Ishikawa 株を AMPK siRNA で抑制し、AMPK-mTOR 経路関連タンパクの発現、増殖抑制効果を検討した。AMPK 抑制にて、Met の増殖抑制効果が減弱したが、完全に抑制されなかった。AMPK 抑制により、Met による S6K1 の脱リン酸化は解除されたが、cyclinD、Rb、ERK は抑制された。Met の作用機序は AMPK を介する系と、AMPK を介さない細胞周期蛋白の制御が示唆され

た。

3) 同意の得られた子宮体癌患者の手術待機中に Met を投与し、投与前後の組織を採取し、AMPK-mTOR 経路関連タンパク、細胞周期蛋白の変化をウエスタンブロット法で検討、免疫染色にてリン酸化 S6、リン酸化 ERK1/2、ki67 の発現の変化を検討した。子宮体癌患者でも、培養細胞株と同様のシグナルの変化が確認された。免疫染色の結果、投与前後でリン酸化 ERK1/2・リン酸化 S6 の発現が減弱した。また、ki67 labeling index が有意に低下していた。Met は子宮体癌患者への短期間の投与で、増殖抑制効果が確認された

4) 臨床投与量の Met 投与時の、血中濃度・子宮内膜局所濃度を測定したところ、投与 2 時間で血中濃度は平均 1679 ng/ml、組織内濃度は平均 427 ng/g per wet weight であった。この濃度では in vitro での増殖抑制は見られないことから、Met の増殖抑制効果は、間接的な効果の可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 10 件)

1) 植原貴史、三橋 暁 他. 低濃度メトホルミンは、抗がん薬との併用で子宮体癌細胞に対し、相乗相加効果は示さない. 第 12 回関東ホルモンと癌研究会 (東京) 2012/1/19

2) Akira Mitsuhashi et al. Metformin prevents recurrence following discontinuation of progestin therapy for fertility-sparing treatment in young women with endometrial cancer or atypical endometrial hyperplasia. The 17<sup>th</sup> International Meeting of the European Society of Gynecological Oncology (ESGO) (イタリア・ミラノ) 2011/9/13

- 3) 三橋 暁 他. 子宮体癌に対するメドロキシプロゲステロン+メトホルミン併用妊孕性温存療法の前方視的試験. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 (大阪)2011/8/29
- 4) 三橋 暁 他. 子宮体癌に対するメドロキシプロゲステロン+メトホルミン併用妊孕性温存療法の前方視的試験. 第 50 回婦人科腫瘍学会 (札幌) 2011/7/22
- 5) 三橋 暁 他. 子宮体癌に対するメドロキシプロゲステロン+メトホルミン併用妊孕性温存療法の前方視的試験. 第 12 回ホルモンと癌研究会 (東京) 2011/7/15
- 6) Akira Mitsuhashi et al. The effect of metformin on cell proliferation in patients with endometrial cancer. 2011 ASCO Annual Meeting (アメリカ・シカゴ) 2011/6/3
- 7) 三橋 暁 他.子宮体癌に対する内分泌療法. 第11回関東ホルモンと癌研究会 (東京) 2011/1/29
- 8) Akira Mitsuhashi et al. Metformin directly inhibits cell proliferation in endometrial cancer. 14<sup>th</sup> international congress of HormonalSteroid and Hormones&Cancer (イギリス・エジンバラ) 2010/9/22
- 9) 三橋 暁 他. 子宮体癌に対するメトホルミンの効果：作用機序の検討と臨床応用.第 11 回ホルモンと癌研究会 (名古屋) 2010/7/30
- 10) 三橋 暁 他.子宮内膜癌に対するメトホルミンの抗腫瘍効果とその機序の検討. 第 48 回婦人科腫瘍学会 (札幌) 2010/7/22

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三橋 暁 (MITSUHASHI AKIRA)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：40302541

### (2)研究分担者

生水 真紀夫 (SHOZU MAKIO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：30226302

碓井 宏和 (USUI HIROKAZU)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：90375634

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：