

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18430

研究課題名(和文)抗糖尿病薬Metforminの抗腫瘍効果とtarget miRNAの同定

研究課題名(英文)The effects of metformin therapy on the suppression of gastroenterological cancer and identification of Metformin's target microRNA

研究代表者

加藤 清仁(KATO, Kiyohito)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20596077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は抗糖尿病薬Metforminの膵臓癌などの難治性消化器癌に対する癌抑制効果を証明し、関連するmiRNAの同定を解析した。

in vitro, in vivoの検討で、いずれの癌種においてもMetformin投与群では、細胞増殖は時間濃度依存的に抑制され、癌細胞株をG1周期停止に導いていた。miRNAアレイの検討では減弱していた細胞周期関連蛋白をターゲットとするmiRNAが認められ、癌細胞抑制効果に対するmiRNAの関与が示唆された。これら結果から、Metforminは副作用も少なく、難治性消化器癌に癌抑制効果が期待される薬剤であると証明した。

研究成果の概要(英文)：The goal of the present study was to evaluate the effects of metformin on human gastrointestinal cancer cell proliferation in vitro and in vivo, and to study microRNAs (miRNAs) associated with metformin anti-tumor effect in vitro and in vivo. Metformin inhibited the proliferation of cancer cells in vitro. Metformin blocked the cell cycle in G0/G1 in vitro and in vivo. This blockade was accompanied by a strong decrease of G1 cyclins, especially in cyclin D1, Cdk4, and Cdk6, and by a decrease in Rb, EGFR and IGF-1R phosphorylation in vitro and in vivo. The miRNA expression was markedly altered by the treatment with metformin in vitro and in vivo. Our results revealed that metformin inhibits human gastrointestinal cancer cell proliferation and tumor growth, possibly by suppressing the cell cycle-related molecules via alteration of miRNAs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Metformin 消化器癌 膵臓癌 胆管癌 食道癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗糖尿病薬 Metformin が、前立腺癌や乳癌などの種々の癌種で発癌抑制効果を示すことが報告されている

(2) しかしながら、膵臓癌、胆道癌、食道癌などの多くの難治性消化器癌に対する抑制効果は示されていない。

(3) さらには、癌抑制効果のメカニズムや分子学的機序が詳細には判明していない。

2. 研究の目的

(1) 膵癌等の難治性消化器癌への Metformin の癌抑制効果を証明すること。

(2) 癌抑制効果として働く細胞周期関連タンパクの発現変化を検討すること。

(3) Metformin の難治性消化器癌への抗腫瘍効果に関連する microRNA を同定し、その効果を遺伝子変化からも検討すること。

3. 研究の方法

(1) **invitro** での Metformin の腫瘍増殖抑制効果：膵臓癌等の難治性消化器癌細胞株を3種類用意し Metformin 投与群と非投与群で処理時間ごとの MTT assay によって細胞増殖を測定、比較する。

(2) Metformin による消化器癌細胞の細胞周期関連分子である Cyclin D1 を抑制して G1 arrest を導くことの検証：消化器癌細胞に対して Metformin 投与群と非投与群の細胞周期関連タンパクを Western blotting 法、フローサイトメトリーを用いて比較する。

(3) **in vivo** での Metformin による消化器癌組織への腫瘍増殖抑制効果：ヌードマウスに消化器癌細胞株を皮下移植後、Metformin を腹腔内投与しコントロール群と腫瘍の大きさを時間経過で比較する。

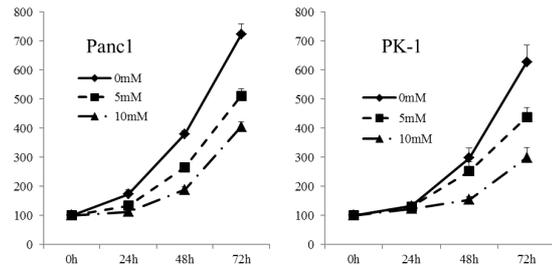
(4) 抗腫瘍効果に関連する microRNA の同定：Metformin の投与群と非投与群を消化器癌細胞株およびその皮下腫瘍から取り出した組織の RNA からチップを用いて microRNA の網羅的解析を行い、クラスター解析をする。その分析結果から Metformin の抗腫瘍効果に関連する microRNA を同定する。

(5) 上記(4)での結果の逆方視的検証：上記の結果より、抗腫瘍効果を有する microRNAs の数個の候補をクラスター解析から決定し、それを抑制するアンチセンス microRNA 発現ベクターを利用し、消化器癌細胞内に導入し、MTT assay によりベクターを含まないコントロール群と比較検討する。また、ベクターが導入された消化器癌細胞をヌードマウス内に皮下移植し、大きさを時間経

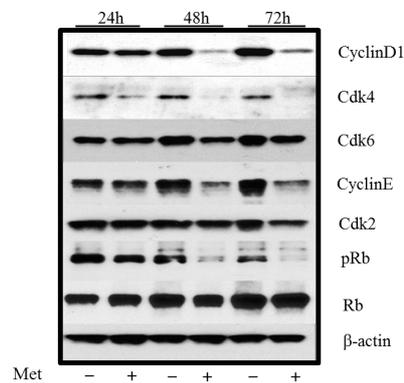
過で比較検討する。

4. 研究成果

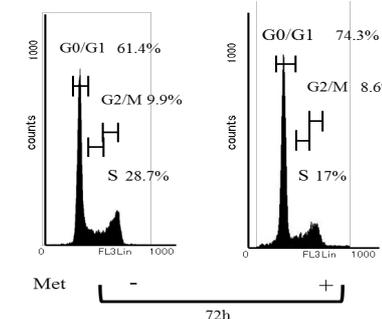
(1) **invitro** の系：各々の消化器癌細胞株を用いて Metformin 投与による細胞増殖を cell proliferation assay により検討した。Metformin 投与群は非投与群と比較して、全ての癌細胞株で増殖は抑制されていた。



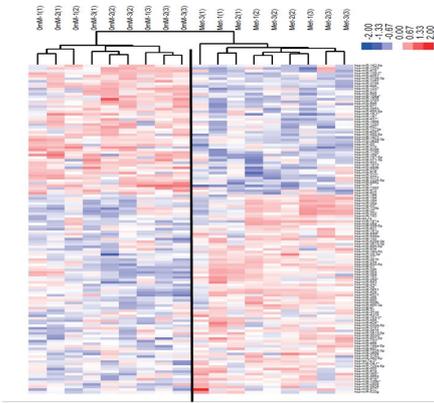
(2) 種々の細胞周期関連分子の発現動態は Western blot 法により検討、Metformin 投与群は非投与群と比較し、CyclinD1, Cdk4, Cdk6 などの細胞周期関連タンパクの発現、Rb, EGFR, IGF-1R などのリン酸化は抑制されていた。



フローサイトメトリーによる検討でも Metformin 投与は各種消化器癌細胞株を G1 停止に導いていた。

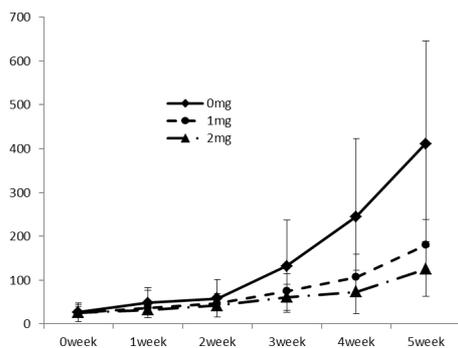


(3) Metformin 投与により、誘導される miRNAs を 1000 分子が搭載されたアレイを用いて網羅的に検討した。Metformin 投与により、miRNAs の発現動態が有意に変化し、癌抑制効果があるとして報告のある miRNAs の発現昂進も認められた。とくに多くの消化器癌において、Metformin 投与群で癌抑制遺伝子である hsa-let-7 family の上昇が認められた。

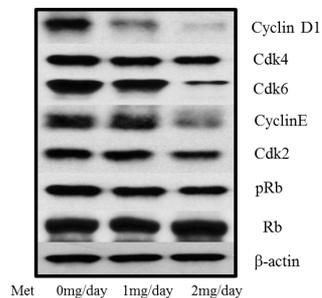


(4) in vivo の系 : 癌細胞株をヌードマウスに皮下移植し、Metformin が、in vivo においても増殖を抑制するかを検討し、Metformin 投与による細胞周期関連分子、miRNAs についても、in vitro の系と同様に検討した。Metformin 投与群では、その腫瘍体積を顕著に抑制し、さらに、細胞周期関連分子、miRNAs の動態変化も in vitro の系に類似部分を認めた。

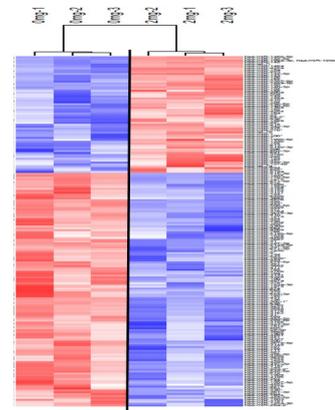
膵臓癌を皮下移植したヌードマウスに Metformin を 1mg および 2mg を 5 週間腹腔内投与しコントロール群と比較したところ有意差を持って Metformin 投与群が濃度依存的に腫瘍体積の増殖を抑制していた。



腫瘍組織から採取したタンパク組織に対して Western blotting による検討では in vitro での検討と同様に Metformin 投与群は非投与群と比較し、細胞周期関連タンパクの発現は抑制されていた。



Metformin 投与により、誘導される miRNAs を 1000 分子が搭載されたアレイを用いて網羅的に検討し、in vitro と類似部分ヲ認めた。



これら結果から、Metformin が消化器系悪性腫瘍に対し抗腫瘍効果を持つことを in vitro, in vivo の系において証明した。これら結果から、糖尿病罹患者及び癌発生リスクが増加する昨今の背景のもと、Metformin は糖尿病患者に対して非常に有効な治療薬であるとともに、化学療法への併用などの臨床応用の可能性も示唆された。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Kato K(1st), Iwama H, Masaki T and 6 others The anti-diabetic drug metformin inhibits pancreatic cancer cell proliferation in vitro and in vivo: Study of the microRNAs associated with the antitumor effect of metformin. *Oncol Rep.* 査読有 2016 Mar;35(3):1582-92. doi: 10.3892
2. Fujimori T, Kato K(2nd), Masaki T and 10 others Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma: In vitro and in vivo studies. *Oncol Rep.* 査読有 2015, Dec;34(6):2987-96. doi: 10.3892/or.2015.4284.
3. Kato K(5th), Masaki T and 18 others MicroRNA profiles in cisplatin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol.* 査読有 2015 Aug;47(2):535-42. doi: 10.3892/ijo.2015.3036.

[学会発表](計 6 件)

1. 山下拓磨、加藤清仁、他 5 名、胆嚢癌に対する抗糖尿病薬 Metformin の抗腫瘍効果の検討、日本消化器病学会 2017 年 4 月 22 日 東京都新宿区
2. 山下拓磨、加藤清仁、他 5 名、胆嚢癌に対する抗糖尿病薬 Metformin の抗腫瘍効果の検討、日本消化器病学会、2016 年 11 月 4 日 兵庫県神戸市
3. 藤森崇行、加藤清仁、他 4 名、抗糖尿病薬 Metformin による胆管癌細胞増殖の抑制機構

Metformin のターゲット microRNA の同定、
日本消化器病学会、2016 年 4 月 22 日、東京
都新宿区

4.加藤清仁、他 4 名、THE ANTI-DIABETIC
DRUG METFORMIN INHIBITS
PANCREATIC CANCER CELL
PROLIFERATION IN VITRO AND IN
VIVO:STUDY OF MICRORNAS
ASSOCIATED WITH THE ANTI-TUMOR
EFFECT OF METFORMIN、欧州消化器病
関連疾患週間、2015 年 10 月 26 日、スペ
イン、バルセロナ

〔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

加藤 清仁 (KATO, Kiyohito)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20596077

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

正木 勉 (MASAKI, Tsutomu)
岩間 久和 (IWAMA, Hisakazu)