

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08011

研究課題名(和文)メトホルミンによる膵がん化学予防の検討

研究課題名(英文)Chemoprevention of pancreatic cancer by metformin

研究代表者

細野 邦広 (HOSONO, Kunihiro)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：50537339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵がんは人口の高齢化と食生活の変化に伴い近年、罹患数は増加し続けているが、早期診断が困難であり今後有効な予防法の確立が求められている。今回の研究では膵がんにおけるメトホルミンの化学予防効果を、オルガノイド解析や膵発がんモデルマウスを用いた動物実験、および膵がん患者を対象とした臨床パイロット試験により検証し、遺伝子発現解析や蛋白解析を行うことによりメトホルミンの作用機序を解明し、メトホルミンの膵がん化学予防の実現化を目指すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、膵がんの新たな化学予防薬の実現化を目指すことにある。過去の膵がん化学予防の研究ではCOX-2選択的阻害剤などを用いて検討が行われていたが、重篤な心疾患などの副作用があり、他の安全な薬剤での検討が求められている。本研究で用いるメトホルミンについてはすでに50年以上にわたり抗糖尿病薬として臨床応用されており、コンプライアンスも高く、安価であり、副作用なども少なく、臨床応用へのハードルは低いといえる。そして得られた結果は膵がんハイリスク群への応用が可能であり、糖尿病治療薬として臨床的必要性の高い薬剤による難治性膵がん予防の実現化という点において本研究の臨床的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Although the number of pancreatic cancer cases has been increasing in recent years due to the aging of the population and changes in dietary habits, early diagnosis of pancreatic cancer is difficult and the establishment of effective preventive methods is required in the future. In this study, the chemopreventive effect of metformin in pancreatic cancer was examined by organoid analysis, animal experiments using mouse models of pancreatic carcinogenesis, and clinical pilot studies in pancreatic cancer patients. The aim is to elucidate the mechanism of action of metformin by conducting gene expression analysis and protein analysis, and to realize chemoprevention of pancreatic cancer by metformin.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 化学予防 メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

膵がんは難治性のがんであり、しかも多くは進行がんで発見され予後不良である。膵がんを可能な限り早く見つけるために、膵がんのリスク要因を有する集団から、いかに無症状の患者を拾い上げることができるかが喫緊の課題となっており、早期発見の診断方法や予防策の開発が急務である。すでに循環器、神経内科領域では疾病予防の取り組みとして生活習慣の変容のほか、心筋梗塞、脳梗塞のハイリスク群にはアスピリンなどの薬剤を用いて積極的に予防を行っているが今後、がん診療においても薬剤を用いた予防を講ずることが求められている。現在欧米を中心に、経口薬を内服することでがんを積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。過去の大規模疫学研究では、膵がんのリスクファクターとしては糖尿病、肥満などの生活習慣関連因子が考えられており、これらは化学予防を施すハイリスク群として注目される。特に糖尿病と膵がんの関連は近年報告が相次いでいるが、糖尿病治療薬のメトホルミン使用が膵がん発生を抑制するという報告がある (Li D, et al. *Gastroenterology*. 2009;137:482-8)。Li らは、膵がんの症例対照研究で糖尿病歴、治療歴などを比較し、糖尿病の治療としてメトホルミンを使用した群は使用しなかった群と比べて膵がんの危険度が低く (OR=0.38)、これに対してインスリン使用者は膵がんの発生頻度が高く、5年を超えるインスリン使用歴を有する群をインスリン非使用群とくらべると、OR が 2.78 であったと報告している。このように糖尿病患者でインスリン使用者は膵がんのハイリスク群になる可能性が示唆された。

メトホルミンの薬理作用のターゲットのひとつは AMP activated protein kinase (AMPK) の活性化であり、活性化された AMPK は下流の mTOR/S6K 経路を抑制することが報告されている。mTOR 経路が抑制されると、細胞増殖や蛋白合成が抑制され、発がん抑制につながると考えられている。メトホルミンはすでにがんの化学予防薬として、大腸がん、乳がん、腎がん、肺がんなどで注目されており、膵がんにおいても今後の研究が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵がんの新たな化学予防薬の実現化を目指すことにある。過去の膵がん化学予防の研究では COX-2 選択的阻害剤などを用いて検討が行われていたが、重篤な心疾患などの副作用があり、他の安全な薬剤での検討が求められている。臨床応用のための化学予防薬については求められる条件がいくつかあり、それはコンプライアンスが高いこと、安価であること、副作用が少ないこと、予防のメカニズムがわかっていることである。本研究で用いるメトホルミンについてはすでに 50 年以上にわたり抗糖尿病薬として臨床応用されており、コンプライアンスも高く、安価であり、副作用なども少ない。また化学予防のメカニズムについては研究代表者らの動物実験での研究成果 (Hosono K, et al. *Molecular Carcinogenesis*. 2010;49:662-671) により AMPK の活性化によることが示唆されており、メトホルミンは化学予防薬に求められるさきの条件を全て満たしているため、臨床応用へのハードルは低いといえる。そして得られた結果は膵がんハイリスク群への応用が可能であり、糖尿病治療薬として臨床的必要性の高い薬剤による難治性膵がん予防の実現化という点において本研究の臨床的意義は大きい。

メトホルミンの作用機序は AMPK を分子標的とした新しい化学予防のアプローチとして注目され、かつ長期投与においても安全性の確立している薬剤を用いた研究は他に類がなく独創的である。メトホルミンの化学予防作用は大腸がんなど他のがんで動物および臨床研究が進んでメカニズムが解明されたが、膵がんではいまだ明らかではなく、本研究は新規性がある。

3. 研究の方法

膵発がんモデルマウスを用いて、メトホルミンが発がんに与える影響を解析した。このモデルでは、ヒトの膵発がん前駆病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) が自然発症し、PanIN 1 から PanIN 3 へと経時的に悪性度が増し、浸潤がんを発症する。このモデルを用いて、メトホルミン投与による膵発がん抑制効果を検証した。まず、PanIN の進行に与える影響を解析するため、定量システムを確立。膵臓内に出現した PanIN は病理組織でしか確認できないため、定量は膵臓切片の HE 染色で行った。この際、検体間の誤差を最小限にするため、標本の作製時に十二指腸乳頭部と脾門部を結ぶ直線で膵臓を分割し、固定する。そして、この断面でパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色後に PanIN の数を測定した。さらに分子メカニズムを解明するため、メトホルミン投与による膵正常組織における遺伝子発現解析やタンパク解析を行った。遺伝子解析としては、リアルタイム PCR 法を用いて mTOR 下流の cyclin D1, c-myc などの解析を行った。蛋白解析はウエスタンブロット法を用いて、細胞増殖に必要な AMPK, mTOR, S6K, S6P などの解析を行った。PanIN 病変においても同様に遺伝子解析や蛋白解析のほか、免疫染色法などにより Ki67 などの腫瘍組織における増殖細胞を検出するマーカーを用いて、メトホルミンの腫瘍への作用を明らかにし、新しい分子標的の同定を目指した。

4. 研究成果

LSL-KrasG12D マウスの膵管上皮において 3 次元培養細胞（オルガノイド）にレンチウイルスで Cre-recombinase 遺伝子を導入し、体細胞変異を模写した条件で Kras 活性型変異アレルの発現を誘導したところ、ヌードマウス皮下に腺管をわずかに含む小さな腫瘍を形成した。さらに p16、p53、Smad4 などのがん抑制遺伝子に対する shRNA を追加導入するとより悪性度の高い組織になることが確認された。この実験モデルを用いて、膵管オルガノイドにメトホルミンを投与し細胞増殖能などへの影響を解析した。

また、本研究の臨床パイロット試験として、メトホルミン投与により膵正常組織と膵がん組織において、それぞれどのような変化をもたらすかを検証した。対象は、研究代表者が所属する附属病院において CT、腹部超音波検査などの画像検査で膵がんが疑われる患者とした。診断確定のため、超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）により膵病変の組織を病理検体として採取するが、FNA 検査前にメトホルミン群とプラセボ群に分け、一定期間投与する。FNA 検査時に、膵腫瘍組織と膵正常組織をそれぞれ採取し、細胞増殖能の変化やアポトーシス解析に加えて、AMPK/mTOR 経路の発現変化などを解析した。そして動物実験で明らかになった分子標的がメトホルミン投与により、正常上皮細胞もしくは腫瘍細胞においてそれぞれどのように活性が変化しているかを検証し、メトホルミンの化学予防効果の作用機序として、AMPK の活性化と下流の mTOR、S6K、S6P 経路の抑制を確認した。これらの結果は、メトホルミンの作用機序はメトホルミン投与により AMPK が活性化され、その下流の mTOR 経路が抑制され細胞増殖が抑制されたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasaki Akito, Kubota Kensuke, Kurita Yusuke, Hasegawa Sho, Fujita Yuji, Kagawa Koji, Kato Shingo, Sekino Yusuke, Hosono Kunihiro, Nakajima Atsushi	4. 巻 27
2. 論文標題 The placement of multiple plastic stents still has important roles in candidates for chemotherapy for unresectable perihilar cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 700～711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Sho, Kobayashi Noritoshi, Okubo Naoki, Tokuhisa Motohiko, Goto Ayumu, Kurita Yusuke, Sato Takamitsu, Hosono Kunihiro, Endo Itaru, Nakajima Atsushi, Ichikawa Yasushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Pathological Findings of the Host Immune Reaction in the Tumor Microenvironment of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 977～983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.5648-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細野 邦広 佐藤 高光 中島 淳
2. 発表標題 サルコペニアからみた高齢者のERCP関連偶発症の検討
3. 学会等名 JDDW 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kunihiro Hosono, Tetsuya matuura, Atsushi Nakajima
2. 発表標題 New diagnostic approach for biliary tract cancer using organoid culture
3. 学会等名 DDW 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細野邦広 松浦哲也 中島淳
2. 発表標題 胆汁オルガノイドを用いた胆道癌診療の新たな展開
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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