

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10402

研究課題名（和文）新規に同定したメトホルミン結合タンパク質に基づく、がん予防効果の全貌解明

研究課題名（英文）Mechanistic elucidation of chemopreventive effects of metformin through analyzing novel identified metformin-binding proteins

研究代表者

飯泉 陽介（IIZUMI, Yosuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：20533178

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）：糖尿病治療薬メトホルミンが発揮するがん予防効果について、これまでに同定していた新規メトホルミン結合タンパク質AとBに着目した詳細な解析を行った。その結果、大腸がん細胞において、メトホルミンが結合タンパク質Aを増加させることで、大腸がんの発生に大きく寄与している β -cateninタンパク質を減少させることを明らかにした。また、結合タンパク質Bが発現制御することが報告されている糖新生抑制タンパク質を、メトホルミンが増加させることも明らかにしたが、その程度は小さく、がん予防効果への寄与は小さいものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メトホルミンの標的タンパク質としては、メトホルミンによる糖新生阻害を説明しうる、ミトコンドリアのグリセロリン酸脱水素酵素が報告されていた（Nature, 2014）。本研究により新たに結合タンパク質Aが見出され、結合タンパク質Aを介したメトホルミンによる大腸がんの予防効果の詳細な分子メカニズムが明らかになってきた。結合タンパク質Aとメトホルミンの関係の更なる解析により、メトホルミンによって大腸がんの予防効果が期待できる集団の特定や、結合タンパク質Aを介したより強力ながんの予防法の開発が可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：We investigated the chemopreventive effects of the anti-diabetic agent metformin in detail by focusing on our previously identified metformin-binding proteins A and B. The results showed that metformin downregulated β -catenin protein, which is important in the development of colon cancer, by upregulating metformin-binding protein A in colon cancer cells. Metformin was also found to upregulate a gluconeogenesis-suppressive protein, which was reported to be regulated by metformin-binding protein B. However, this upregulation was so small that it was unlikely to contribute to the chemopreventive effects of metformin.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：結合タンパク質 がん予防 ケミカルバイオロジー ナノ磁性ビーズ β -catenin 糖新生抑制タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性新生物(がん)の罹患率は、我が国においても年々上昇しており、効果的ながんの予防法の確立が必要である。これまでの疫学研究から、複数の医薬品ががんの予防効果が期待されている。シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるアスピリンについては、がんの化学予防剤候補として我が国でも大規模臨床試験が行われている。しかし、アスピリンには長期投与による胃腸障害や出血のリスクがあるため、次いで期待されている医薬品が糖尿病治療薬メトホルミンである。メトホルミンは、ミトコンドリアのグリセロリン酸脱水素酵素を直接の標的として糖新生を阻害し、抗糖尿病効果を発揮する(Nature, 2014; 510: 542-546)。これまでの疫学研究により、メトホルミンの服用によって、全がんの発生率が有意に減少することが明確になってきた(PLoS One, 2012; 7: e33411)。さらに、横浜市立大学のグループから、大腸ポリープ切除後の新規ポリープの発生に対して、メトホルミンが抑制効果を示したことが報告され、大きな注目を集めた(Lancet Oncol., 2016; 17: 475-483)。ポリープの発生に対して再発予防効果があったことから、メトホルミンの有する血糖降下作用だけでは、メトホルミンによるがん予防効果が説明できないことが明らかになってきた。

(2) メトホルミンは比較的安全で、健常者の常用も許容されることから、がんの予防剤としても期待されている。しかし、「メトホルミンがどのような分子メカニズムにより、がんの予防効果を発揮しているか」に関しては、アスピリンのように明確ではない。メトホルミンの直接の標的タンパク質(作用点)が見出せれば、そこから新規がん予防法を考察、提案することも可能になる。

(3) これまでに私達は、ナノ磁性ビーズ(FG beads)へのメトホルミンの固定化法を確立し、メトホルミン固定化ビーズを用いて、メトホルミン結合タンパク質を精製し、MALDI-TOF型質量分析計を用いて、10種の新規メトホルミン結合タンパク質を同定していた。それらの中には、大腸がんの発生に大きく寄与しているWnt経路の β -cateninを発現制御することが示唆されている結合タンパク質Aと、糖新生抑制タンパク質の発現量を増加させることで糖新生を阻害することが示唆されている結合タンパク質Bがあった。組換えのMyc-DDKタグ付きタンパク質A、Bそれぞれとメトホルミン固定化ビーズを用いた結合実験により、メトホルミンとタンパク質A、Bが直接結合することを明らかにしていた。また、正常肝細胞株のNCTC-1469細胞にメトホルミンを添加すると、結合タンパク質Bが発現制御することが示唆されている糖新生抑制タンパク質の発現量が増加することを明らかにしていた。

2. 研究の目的

糖尿病治療薬メトホルミンは、がんの化学予防剤の候補として期待されているが、「どのようにして、がんを予防するか」については明らかになっていない。これまでに私達は、ナノ磁性ビーズと質量分析計を用いて、メトホルミンが結合するヒトタンパク質を網羅的に同定することに成功している。新規に同定したメトホルミン結合タンパク質である、 β -cateninの制御が示唆されている結合タンパク質Aと糖新生の制御が示唆されている結合タンパク質Bに着目した解析を行うことで、メトホルミンによるがんの予防効果の詳細な分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) ナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化

以前に開発したナノ磁性ビーズへのメトホルミンの固定化法は、まだ論文として発表していないため、ここには初めに検証し開発した固定化法の基礎となった方法を記載する。2 mgのカルボキシ基を表面に有したナノ磁性ビーズ(FG beads)をジオキサンで3回洗浄し、ジオキサン中に分散させて、HOSuを0.023 gとEDC・HClを0.0384 g加えた。室温においてシェーカーで混合しながら、ナノ磁性ビーズを2時間反応させて、カルボキシ基を活性化させた。その後、ジメチルホルムアミドで3回洗浄し、活性化したナノ磁性ビーズとジメチルホルムアミドに溶解したメトホルミンを混合し室温で一晩反応させた。反応後のビーズに、ジメチルホルムアミドに1Mで溶解した2-アミノエタノールを加え室温で4時間反応させて、残存していた活性化したカルボキシ基をマスクした。その後、50%メタノール水溶液で3回、超純水で2回洗浄し、超純水に懸濁した状態でナノ磁性ビーズを4℃で保存した。

(2) 組換えタンパク質を用いた、メトホルミンと結合タンパク質Bとの直接結合の検証

マウス及びヒトの結合タンパク質Bは、OriGene Technologies Inc.からC末端にMycタグと

DDK タグを付した組換えタンパク質を購入した。Myc-DDK タグ付きマウス及びヒトの組換えタンパク質 B をそれぞれ、NP-40 binding buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に 5 ng/ μ l で希釈した。これらをメトホルミン固定化ビーズと混ぜ、冷蔵庫内でローテーターを用いて混合しながら、メトホルミン固定化ビーズと 4 時間反応させた。その後、磁気スタンドを用いて、反応後のメトホルミン固定化ビーズを回収し、NP-40 binding buffer で 3 回洗浄した。洗浄したビーズに SDS サンプルバッファーを加え 98 °C で 5 分間加熱することで、結合したタンパク質 B をビーズから剥がし、SDS サンプルバッファー中に溶解した。精製されたタンパク質 B は、SDS-PAGE により分離後、DDK タグに対する抗体 (OriGene Technologies Inc. TA50011-100) を用いたウエスタンブロットティングにより検出した。

(3) siRNA を用いた結合タンパク質 A のノックダウン

ヒトの結合タンパク質 A に特異的に設計された Stealth RNAi™ siRNA を、Thermo Fisher Scientific Inc. から購入した。Lipofectamine™ RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、添付の説明書に従い、大腸がん細胞株の SW480 細胞に siRNA を導入した。

(4) ウエスタンブロットティングによるタンパク質発現の解析

ヒト肝細胞がん株の Hep G2 細胞やヒト大腸がん細胞株の SW480 細胞にメトホルミンを添加したり、(3)の方法で siRNA を導入したりして、所定の時間、37 °C で培養した。培養後の細胞をスクレーパーで培養皿から剥がし、遠心分離 (2,000 rpm, 4 , 5 分) により回収した。そこに RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) を加え懸濁し、ローテーターを用いて冷蔵庫内で 30 分間混合し細胞を溶解した。遠心分離 (15,000 rpm, 4 , 10 分) により不溶性画分を沈降させ、上清を細胞抽出液として回収した。この細胞抽出液を SDS-PAGE により分離し、各タンパク質に対する抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、各タンパク質の発現量の変化を解析した。

(5) RT-qPCR による mRNA 発現の解析

SW480 細胞にメトホルミンを添加し、6 または 24 時間後に細胞をスクレーパーで回収した。回収した細胞を Sepasol®-RNA I Super G (ナカライテスク株式会社) に溶解し、total RNA を抽出した。ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行い、抽出した total RNA から cDNA を合成した。そして、TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific Inc.) と TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) にて qPCR 反応を行い、ヒト β -catenin と GAPDH の mRNA 量を測定した。

4. 研究成果

(1) メトホルミンは、マウスよりヒトの結合タンパク質 B に強く結合する

糖新生抑制タンパク質を増加させることで糖新生を阻害することが示唆されている結合タンパク質 B について、組換えのヒトまたはマウスの結合タンパク質 B それぞれとメトホルミン固定化ビーズを混合し、メトホルミンに対する結合タンパク質を精製することで、結合実験を行った。その結果、ヒト及びマウスの結合タンパク質 B とメトホルミンの直接結合が確認できた。また、マウスよりもヒトの結合タンパク質 B が多く精製されてきたことから、メトホルミンはヒトの結合タンパク質 B により強く結合することが明らかになった。

(2) ヒト肝細胞がんも用いた糖新生抑制タンパク質の詳細な解析

これまでの解析より、マウス由来の正常肝細胞株の NCTC-1469 細胞にメトホルミンを添加すると、糖新生抑制タンパク質の発現が弱いながらも増加することが明らかになっていた。(1)の結果より、ヒトの結合タンパク質 B により強くメトホルミンが結合したことから、ヒトの肝細胞がん株の Hep G2 細胞も用いて解析を行った。Hep G2 細胞にメトホルミンを添加し反応後、回収し細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロットティングにて解析した。その結果、Hep G2 細胞においても、メトホルミンが糖新生抑制タンパク質の発現を増加させることが明らかになった。しかし、メトホルミンの添加濃度や時間を検討したが、その発現増加の程度は 2 倍未満であった。なので、メトホルミンのがん予防効果においては、結合タンパク質 B の関与は小さいものと考えられたので、以降、結合タンパク質 A の解析に注力した。

(3) ヒト大腸がん細胞において、メトホルミンは β -catenin タンパク質を減少させる

メトホルミンと結合タンパク質 A との関係を調べるために、ウエスタンブロットティングで β -catenin タンパク質の発現が見やすい大腸がん細胞株を探し、SW480 細胞が適していることが分かった。そして、SW480 細胞にメトホルミンを添加し、24 時間後に回収し細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロットティングによって解析すると、濃度依存的に細胞内の β -catenin タンパク質が減少することが明らかになった。

(4) ヒト大腸がん細胞において、メトホルミンは結合タンパク質 A を増加させる

続いて、メトホルミンと結合タンパク質 A の関係を調べるために、SW480 細胞にメトホルミンを添加し、24 時間後に回収し細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロッティングによって解析すると、 β -catenin タンパク質の減少とは逆に、メトホルミンにより結合タンパク質 A の発現が増加することが明らかになった。

(5) 結合タンパク質 A のノックダウンにより、メトホルミンによる β -catenin タンパク質の減少が抑制される

メトホルミンによる結合タンパク質 A の増加の重要性を調べるために、SW480 細胞に結合タンパク質 A に特異的に設計された siRNA を導入し、結合タンパク質 A のノックダウンを行った。そして、siRNA を導入して 48 時間後にメトホルミンを添加し、その 24 時間後に細胞を回収し細胞抽出液を作製して、ウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、結合タンパク質 A のノックダウンによって、メトホルミンによる β -catenin タンパク質の減少が抑制された。これより、メトホルミンが結合タンパク質 A を増加させることで、 β -catenin タンパク質を減少させるといふがん予防の新規分子メカニズムが明らかになってきた。

(6) メトホルミンの β -catenin mRNA への影響の解析

結合タンパク質 A と β -catenin タンパク質の発現の関係について詳しく知るため、メトホルミンによる β -catenin タンパク質の減少が、mRNA レベルからの減少か否かを調べた。SW480 細胞にメトホルミンを添加し 24 時間後に細胞を溶解し、total RNA を抽出し逆転写後、qPCR により β -catenin の mRNA 量を測定した。その結果、メトホルミンが β -catenin をタンパク質レベルでしっかりと減少させる濃度及び時間において、mRNA レベルでの減少は 1~2 割程度と小さいものであった。メトホルミン添加後 6 時間でも解析してみたが、メトホルミンによる β -catenin mRNA の減少は認められなかった。よって、メトホルミンは β -catenin をタンパク質レベルで減少させていることが明らかになった。

(7) 翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いた、 β -catenin タンパク質と結合タンパク質 A の安定性に対する評価

(6)の結果を受け、メトホルミンが β -catenin タンパク質を不安定化し分解を誘導しているのか否かを、翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いて解析している。SW480 細胞に対するシクロヘキシミドの処理濃度及び処理時間を検討することで、メトホルミンによって β -catenin タンパク質が不安定化する傾向が認められているが、再現性を含め更なる詳細な解析が必要である。また、シクロヘキシミドを用いて、結合タンパク質 A の安定性へのメトホルミンの影響も解析しているが、 β -catenin タンパク質に比べて結合タンパク質 A が細胞内で安定であることから、現在の処理時間などでは、メトホルミンが結合タンパク質 A を安定化するか否かを評価できていない。現在、これらのシクロヘキシミドを用いた実験を継続して行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iizumi Yosuke, Sowa Yoshihiro, Goi Wakana, Aono Yuichi, Watanabe Motoki, Kurumida Yoichi, Kameda Tomoshi, Akaji Kenichi, Kitagawa Masatoshi, Sakai Toshiyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Stabilization of CDK6 by ribosomal protein uS7, a target protein of the natural product fucoxanthinol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03522-6	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 -

1. 著者名 Watanabe Motoki, Boku Shogen, Kobayashi Kaito, Kurumida Yoichi, Sukeno Mamiko, Masuda Mitsuharu, Mizushima Katsura, Kato Chikage, Iizumi Yosuke, Hirota Kiichi, Naito Yuji, Mutoh Michihiro, Kameda Tomoshi, Sakai Toshiyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 A chemoproteoinformatics approach demonstrates that aspirin increases sensitivity to MEK inhibition by directly binding to RPS5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac059	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 -

1. 著者名 Imai Ayaka, Horinaka Mano, Aono Yuichi, Iizumi Yosuke, Takakura Hideki, Ono Hisako, Yasuda Shusuke, Taniguchi Keiko, Nishimoto Emi, Ishikawa Hideki, Mutoh Michihiro, Sakai Toshiyuki	4. 巻 628
2. 論文標題 Salicylic acid directly binds to ribosomal protein S3 and suppresses CDK4 expression in colorectal cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 110-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.082	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------