

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591136

研究課題名(和文) 癌幹細胞をターゲットにした肺癌分子標的治療の開発

研究課題名(英文) A novel therapy for lung cancer targeting cancer stem cells.

研究代表者

瀧口 裕一 (Takiguchi, Yuichi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30272321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：メトホルミンは4つの肺癌細胞株すべてに抗腫瘍活性を示すが、作用に長期間を要すること、僅かにG0/G1集積を示すことからcytostaticな抗腫瘍活性が示唆された。In vivoでは既に一定の大きさに達した腫瘍に対しては効果を示さないが、ゲフィチニブで縮小した腫瘍の再増大を著しく抑制することが示された。ゲフィチニブ処理で残存した細胞はCD133およびCD24を強発現する細胞比率が高く、癌幹細胞である可能性を示唆する。メトホルミンはゲフィチニブ処理後の残存細胞に対しても抗腫瘍効果を保っており、メトホルミンの抗腫瘍メカニズム解明が、薬剤耐性を獲得した難治性癌の治療に関連することも期待される。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxicity of metformin was elucidated in 4 human lung cancer cell lines. Colony formation and cell proliferation were inhibited by metformin in all the cell lines only when the cells were exposed to the metformin for a long period, suggesting its cytostatic characteristics. The combined effects of metformin and gefitinib were examined. It did not suppress the growth of already established tumors, nor did it augment tumor shrinkage by gefitinib. However, it significantly suppressed the regrowth of the tumor after effective treatment with gefitinib, suggesting metformin's specific effect on the residual cells. Its cytotoxicity was characterized by the absence of apoptosis induction and unremarkable cell cycle shift. The residual cells were characterized by enriched cells with high expression of CD133 and CD24. Metformin was still effective on this specific cell population. Targeting residual cells after chemotherapy might represent an effective new strategy for curing cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：メトホルミン ゲフィチニブ 癌幹細胞 肺癌 細胞株 アポトーシス 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

全ての臓器同様、癌にも幹細胞 (SC) が存在するという概念 (癌幹細胞仮説)¹⁾ はさまざまな証拠のより一般的にも受け入れられ、体系としても確立しつつある。最近の研究では急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、肝癌、神経膠腫などにおける腫瘍特異的な癌幹細胞 (CSC) のマーカーも明らかにされつつあり、CSC 研究に大きな進歩をもたらした。現在のところ肺癌の CSC マーカーが明らかにされたとはいえないが、CD133 等が非小細胞肺癌・小細胞肺癌共通の CSC マーカー候補として注目されている²⁾。また一般に Hoechst33342 に対して高い排出能を示す side population (SP) 細胞も CSC の候補として有力である。CSC 研究の進歩は従来の癌治療の問題点をも明確にした。すなわち CSC は一般的に放射線照射、殺細胞性抗腫瘍薬 (cytotoxic agents) に対して耐性を示し³⁾、その機序としては DNA 損傷に引き続く細胞死に抵抗性があること、MDR1 高発現による多剤耐性などが明らかにされている。従って従来の放射線療法、化学療法によって死滅する主な細胞は非癌幹細胞 (non-CSC) に過ぎず、治療後も残存する CSC の増殖によって間もなく腫瘍再増殖をきたし、治療の失敗につながると考えられる。ここでもし CSC 特異的に細胞毒性をきたす薬剤が存在すれば、放射線療法、化学療法と併用することにより治癒、ないしは長期寛解を得ることが期待できる⁴⁾。近年、非小細胞肺癌においては上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) による治療成績の向上が目覚ましい。しかし EGFR に sensitive mutation を有する細胞株においてすら、in vitro においてゲフィチニブ、エルロチニブ処理後も少数の薬剤耐性細胞集団が残存し、これらは CD133 マーカーを有することが示され、CSC は EGFR-TKI に対しても耐性であることが示唆された⁵⁾。これら一連の事実は、CSC 特異的治療法の開発は、放射線・化学療法の効果を増強させるだけでなく、放射線・化学療法に対する抵抗性克服にも発展する可能性を示唆すると考えられる。

一方、メトホルミンはピグアナイド系経口血糖降下薬として日本を含む世界各国で 2 型糖尿病治療に対して広く用いられており、正常血糖は下げないことから比較的大量投与が可能な薬剤である。スコットランドにおける 2 型糖尿病患者の疫学研究から、メトホルミンを投与されている患者はそれ以外の血糖降下薬を投与されている患者に比べ癌発生リスクを有意に低下させ、しかもその効果は用量・期間依存性である傾向を示した⁶⁾、また膵癌発生リスクを有意に低下させ⁷⁾、乳癌の化学療法後の完全寛解率を有意に向上させること⁸⁾ が示された。最近になってメトホルミンは AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路を刺激する⁹⁾ ことが明らかにされ、さらに in vitro、in vivo においてメトホ

ルミンと cytotoxic agents の併用により、乳癌細胞株に対する顕著な実験的治療効果の増強が示され、その際メトホルミンは CSC 特異的に抗腫瘍効果を示すことが示唆された¹⁰⁾。

- 1) Reya T, et al. Nature 414: 105-111, 2001
- 2) Eramo A, et al. Cell Death Differ 15: 504-514, 2008
- 3) Abbott A, Nature 442: 742-743, 2006
- 4) Eyler CE, et al. JCO 26: 2839-2845, 2008
- 5) Sharma SV, et al. Cell 141: 69-80, 2010
- 6) Evans JM, et al. BMJ 330: 1304-1305
- 7) Li D, et al. Gastroenterol 137: 482-488, 2009
- 8) Jiralerspong S, et al. JCO 27: 3297-3302, 2009
- 9) Shaw RJ, et al. Science 310: 1642-1646, 2005
- 10) Hirsch HA, et al. Cancer Res 69: 7507-7511, 2009

2. 研究の目的

数種類のヒト肺癌細胞株を用い、メトホルミンによって殺される腫瘍細胞の特徴を明らかにし、それが肺癌の癌幹細胞 (Cancer Stem Cells) である可能性を検討する。さらに、メトホルミン処理による癌幹細胞と非癌幹細胞における遺伝子発現の変化を検討することにより、同薬が癌幹細胞を殺すメカニズムを探索する。殺細胞性抗腫瘍薬、上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬との併用効果を in vitro、in vivo で確認後、肺癌幹細胞をターゲットとした分子標的治療の臨床試験プロトコール作成を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 5 つの細胞株に対する、メトホルミン、cytotoxic agents (シスプラチンなど)、ゲフィチニブ (EGFR-TKI) による抗腫瘍活性を細胞増殖曲線、colonogenic assay により解析する。

細胞増殖曲線: 培養 dish に一定数の細胞を播種し、経時的に細胞数の推移を調べる。

Colonogenic assay: 培養 dish に 100 ~ 1,000 個/dish 程度の細胞を播種し、コロニー形成率を調べる。コントロール群と薬剤処理群の細胞について、CSC のマーカー候補である、CD133、CD24 などの抗体を用いた western blot、および FACS によるソーティングで分離することにより、それぞれの薬剤が、CSC と

non-CSC に対しそれぞれの程度障害しているか調べる。

- (2) In vitro におけるメトホルミン + cytotoxic agents、メトホルミン + ゲフィチニブ併用実験 (EGFR 遺伝子変異を有する PC-9 に対して) を行う。
- (3) A549 細胞、PC-9 についてはシスプラチンの低用量反復曝露により、耐性亜株を樹立している。薬剤耐性株を用い、メトホルミンによる CSC 障害により、薬剤耐性が克服可能かどうか予備的検討を行う。
- (4) 上記 in vitro の結果に基づき、in vivo での併用実験をヌードマウス (または SCID マウス) を用いた xenograft モデルを用いて行うことにより、cytotoxic agents によりいったん腫瘍縮小した後、再増大するモデルにおいて、メトホルミンを併用することによる再増大抑制効果を検討する。

4. 研究成果

- (1) 腺癌 (A549)、扁平上皮癌 (RERF-LC-AI)、小細胞癌 (WA-hT)、大細胞癌 (IA-5) の 4 つのヒト肺癌細胞株を用いた、コロニー形成、細胞増殖は 4 つのヒト肺癌細胞株にて抑制されたが、癌細胞だけでなくヒト中皮細胞やマウス線維芽細胞もコロニー形成が抑制された。コロニー形成はメトホルミンの 10 日曝露でのみ抑制され、1 時間、24 時間の短時間曝露では抑制されなかった。細胞増殖の抑制は生存率で 0.1 から 0.3 でプラトーに達しており、増殖抑制効果は主に細胞分裂の停止によることが示唆される。アポトーシスは小細胞肺癌株のみで認められ、細胞周期は 4 つの細胞株で G0/G1 で停止する傾向を認めた。メトホルミンとシスプラチンとの併用では、シスプラチンの増殖抑制効果はメトホルミンに拮抗され、腺癌株を除いた 3 つの細胞株では増殖抑制効果が減弱されていた。
- (2) In vivo のマウスモデルでは、メトホルミンは既に樹立した腫瘍を縮小させることはなく、ゲフィチニブと同時投与しても、ゲフィチニブの抗腫瘍効果を増強することもなかった。しかしゲフィチニブでいったん縮小した腫瘍に対してはその再増大を著明に抑制し、ゲフィチニブによる残存細胞に効果を示している可能性が示唆された。この現象を確認するため種々の in vitro 実験を追加した。メトホルミンは PS9 細胞に対するアポトーシス、細胞周期変動効果は僅かであった。一方、ゲフィチニブ処理後の細胞は CD133、CD24 を強発現しており、癌幹細胞性を示唆したが、メトホルミンはこれらの細胞に対しても抗腫瘍効果を保っていた。
- (3) 以上より、メトホルミンの抗腫瘍効果は cytostatic な特徴をもち、他の抗腫瘍薬による残存細胞に効果を示すことが示唆された。この残存細胞とは薬剤耐性を獲得

した癌幹細胞の特徴を有している可能性がある。メトホルミンの抗腫瘍効果機序をさらに解析することにより、癌化学療法後の残存細胞を標的とする新たな分子標的治療法の開発につながる可能性がある。

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)

Saito T, Chiba T, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Tada M, Kanai F, Takiguchi Y, Iwama A, Yokosuka O. Metformin, a Diabetes Drug, Eliminates Tumor-Initiating Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS one*. 2013;8(7):e70010. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0070010

Li Q, Kawamura K, Yang S, Okamoto S, Kobayashi H, Tada Y, Sekine I, Takiguchi Y, Shingyouji M, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Interferon- Produces Synergistic Combinatory Anti-Tumor Effects with Cisplatin or Pemetrexed on Mesothelioma Cells. *PLoS one*. 2013;8(8):e72709-e72709. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0072709

Kurahashi I, Fujita Y, Arai T, Kurata T, Koh Y, Sakai K, Matsumoto K, Tanioka M, Takeda K, Takiguchi Y, Yamamoto N, Tsuya A, Matsubara N, Mukai H, Minami H, Chayahara N, Yamanaka Y, Miwa K, Takahashi S, Takahashi S, Nakagawa K, Nishio K. A microarray-based gene expression analysis to identify diagnostic biomarkers for unknown primary cancer. *PLoS one*. 2013;8(5):e63249. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0063249

Kitazono, S, Takiguchi Y, Ashinuma, H, Saito-Kitazono, M, Kitamura, A, Chiba, T, Sakaida, E, Sekine, I, Tada Y, Kurosu K, Sakao S, Tanabe N, Iwama, A, Yokosuka, O, Tatsumi K. Effect of metformin on residual cells after chemotherapy in a human lung adenocarcinoma cell line. *International Journal of Oncology*. 2013;43(6):1846-1854. 査読有.

DOI: 10.3892/ijo.2013.2120.

Kitazono-Saitoh, M, Takiguchi Y, Kitazono, S, Ashinuma, H, Kitamura, A, Tada Y, Kurosu K, Sakaida, E, Sekine, I, Tanabe N, Tagawa, M, Tatsumi K. Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant

pleural mesothelioma cell lines. *Oncology Reports*. 2012;28(1):33-40. 査読有.

DOI:10.3892/or.2012.1799.

Ashinuma, H, Takiguchi, Y, Kitazono, S, Kitazono-Saitoh, M, Kitamura, A, Chiba, T, Tada, Y, Kurosu, K, Sakaida, E, Sekine, I, Tanabe, N, Iwama, A, Yokosuka, O, Tatsumi, K. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncology Reports*. 2012;28(1):8-14. 査読有.

DOI: 10.3892/or.2012.1763.

〔学会発表〕(計 6件)

Baird A, Jennings C, McDonagh L, Flynn L, O'Donnell E, Barr M, Santoni-rugiu E, Hanse F, Kurz T, Takiguchi Y, Thomas W, Zimling Z, O'Byrne, K, Gray S. Targeting HDACs to overcome cisplatin resistance in malignant plural mesothelioma. Paper presented at: 15th World Conference on Lung Cancer; 10.27-30, 2013; Sydney , Australia.

Tagawa M, Chai K, Jiang Y, Kawamura K, Yang S, Ogino A, Yamaguchi N, Kato K, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Kubo S. Anti-tumor effects of Ad-p53 on INK4A/ARF-defective mesothelioma are influenced positively by small G protein inhibitors but negatively by heat shock protein 90 inhibitors. Paper presented at: American Society of Gene & Cell Therapy. 16th Annual Meeting. 2013; 5.15-18, 2013; Salt Lake, Utah, USA.

Sekine I, Kitazono-Saitoh M, Kurimoto R, Sakaida E, Tada Y, Kurosu K, Tatsumi K, Takiguchi Y. Genome-wide cDNA microarray screening of genes related to pemetrexed resistance in mesothelioma cell lines. Paper presented at: 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference (APLCC); 11.25-28, 2012; Fukuoka.

Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, et al. Anti-proliferative action of metformin on various types of human lung cancer cell lines. Paper presented at: AACR Annual Meeting 2012; 3.31-4.4, 2012; Chicago, USA. Kitazono M, Takiguchi Y, Kitazono S, et al. Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. Paper

presented at: AACR Annual Meeting 2012; 3.31-4.4, 2012; Chicago, USA. Kitazono S, Takiguchi Y, Ashinuma H, et al. Effects of metformin on a non-small cell lung cancer cell line with an EGFR mutation. Paper presented at: AACR Annual Meeting 2012; 3.31-4.4, 2012; Chicago, USA.

〔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: 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 裕一 (Takiguchi, Yuichi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 30272321

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

黒須 克志 (Kurosu, Katsushi)
千葉大学・大学院医学研究院・講師(退職)
研究者番号: 20291106

多田 裕司 (Tada, Yuji)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 50344990

田邊 信宏 (Tanabe, Nobuhiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 40292700

巽 浩一郎 (Tatsumi, Koichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10207061

坂尾 誠一郎 (Sakao, Seiichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 80431740