

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592504

研究課題名(和文)メトホルミンによる子宮内膜癌の発癌予防に関する研究

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

## 研究代表者

三橋 暁 (MITSUHASHI, Akira)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40302541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：メトホルミンの臨床使用量の短期投与で、子宮体癌組織でKi-67、topoisomerase II の発現低下を認め、増殖抑制効果が確認された。またメトホルミン投与で、血中インスリン、グルコース、IGF-1、レプチンの低下を認め、患者血清中の細胞増殖活性が低下していた。メトホルミン服用時の血中濃度、子宮内膜組織内濃度は、in vitroで効果が得られる濃度の1/400ほどで、in vivoで認められるメトホルミンの効果は直接作用ではなく間接効果と考えられた。また、メトホルミンは、脂肪から分泌されるアディポサイトカインを低下させ、間接的に細胞増殖抑制作用を示すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic doses of metformin decreased the Ki-67 and topoisomerase II labeling indices and inhibited the proliferative activity of endometrial cancer tissues. Preoperative use of metformin resulted in a significant decrease in the concentration of circulating factors, including insulin, glucose, insulin-like growth factor 1, and leptin. Moreover, metformin administration resulted in a significant decrease in the DNA synthesis-stimulating activity in patient sera. The concentration of metformin in the tissues was <1/400 times lower than the minimum concentration required to inhibit cell growth in vitro. Metformin inhibits cancer cell growth indirectly through changes in humoral factors such as adipocytokines (secreted by adipocytes). Therefore, metformin might confer a protective effect against endometrial cancer in women with obesity and insulin resistance.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 インスリン抵抗性 メトホルミン

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は最も肥満と関連した癌で、糖尿病・インスリン抵抗性・高インスリン血症が発癌リスクとされる。子宮内膜癌発癌リスクは、BMI 25以上の女性は、25未満の女性に比較して2-4倍高い。このような背景から、メタボリックシンドロームとも位置づけられている。また、子宮体癌は本邦でも近年増加傾向で、ここ20年で約5倍に増加した。そのため、代謝に関連した子宮内膜癌の化学予防の可能性について注目した。

メトホルミンは糖尿病治療薬として広く使用されている薬剤で、糖尿病リスクを有する症例に対し、糖尿病発症予防効果も報告されている。2005年にEvansらが、メトホルミン投与中の糖尿病患者に癌の発生が少ないことが報告し、疫学的に癌の発生予防効果が証明された。また、乳癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌培養細胞株で、メトホルミン投与による増殖抑制効果も報告された。我々もメトホルミンの子宮内膜癌への効果に注目し、子宮体癌培養細胞株で、増殖抑制効果を確認した。その作用機序として、AMPKの活性化によるmTORの抑制の他に、cyclin D1・Rbの抑制を介したG1停止を確認した。

また、我々は、若年性体癌の温存治療に酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)療法にメトホルミンを併用することで、MPA単独治療に比較して、再発の抑制を確認した。臨床投与量のメトホルミンが癌の予防効果を示す可能性がしめされた。

### 2. 研究の目的

メトホルミン服用中の糖尿病患者に癌の発生が少ないことが疫学的に証明されているが、その機序はあきらかではない。メトホルミンのin vitroでの効果は高濃度のメトホルミンの効果で、臨床投与量でのメトホルミンが生体内で効果を示すか疑問がある

子宮内膜癌は本邦でも近年増加傾向にあり、最も肥満と関連した癌である。インスリン抵抗性など代謝異常などから、メタボリックシンドロームとも位置づけられており、メトホルミンは糖尿病予防の他、子宮内膜癌の化学予防効果が期待される。メトホルミンの発癌予防効果を、マウス発癌モデルを用いて検証する。発癌過程における遺伝子変化・代謝プロファイル変化を解明することで、あらたな治療のターゲットを推定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) DES 子宮内膜癌発癌モデルでのメトホルミンの

### 発癌予防

C57BL/6J X FVB/N F1 hybrid mice 生後1-5日にDES (2 µg/day) を投与し、コントロール群(DES, メトホルミン非投与)、DES投与群、DES+メトホルミン服用群での発癌過程の違いを確認する。このモデルではPTEN発現の欠失が関与しているとされ、人のエストロゲン依存性癌と類似した遺伝子プロファイルが報告されている。

DES投与後12ヶ月で50-73%、18ヶ月で90-93%の子宮内膜癌の発生が報告されており12ヶ月時に子宮摘出する。A群:コントロール(DES, メトホルミン非投与)、B群:DES投与、C群:DES+メトホルミン投与群で病変の有無を組織学的に確認する。

コントロールと比較して、DES投与群、DES+メトホルミン服用群での内膜病変の出現率を検討する。症例数の設定:DES投与による子宮枚膜癌の発癌率は少なくとも50%以上と考え、メトホルミン投与群での発癌率が30%以下で有意差が確認できる各群20例と設定

#### (2) メトホルミンによるDES発癌の予防機序の解明

DES投与による遺伝子プロファイルを確認するため、コントロール群とDES投与群を比較、癌化の過程で変化する遺伝子をマイクロアレイで比較する。さらに、発癌の抑制機序の解明のため、DES投与群と、DES+メトホルミン服用群とをマイクロアレイで比較し、変化のある遺伝子を抽出する。DESにより異常を来した遺伝子異常が解除されていれば、発癌ステップの解明にもつながると考える。マイクロアレイは、Affymetrix社のhuman HG-U133A chipにより検索、差のある遺伝子にたいしreal-time PCR法で発現を確認、結果をもとにpathfinder softを使って、keyとなるシグナル分子を同定する

コントロール群とDES投与群、DES投与群とDES+メトホルミン服用群とをメタボローム解析により、代謝プロファイルの相違を同定する。近年、メタボローム解析で、DSS投与による炎症性腸疾患発症モデルに、乳酸菌での治療効果の検討がなされ、代謝分子プロファイルの相違が同定されている。同様の手法で作用部位の同定が可能と考える。(Arch Pharm Res 2010;33:1091-1101)

マイクロアレイ、メタボローム解析はいずれの群も、マウスの発情周期毎に5匹ずつ解析を行う。

#### (3) 子宮体癌患者に対する臨床投与量のメトホルミンの効果

子宮体癌患者の術前にメトホルミンを投与し、投与前後の組織・血液を採取する。投与前後で細胞周期蛋白(cyclin D1, p27, リン酸化 pRb)の発現やリン酸化 AMPK, リン酸化 S6、リン酸化 ERK 1/2 の発現を western blotting にて比較する。また、投与前後の組織を Ki-67 およびトポイソメラーゼ II 免疫染色を行い、それぞれの labeling index を比較する。メトホルミン 750mg 服用後 2 時間の血中、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。メトホルミン投与開始前と服用 5-9 週後の血清(2%)を用いて、子宮内膜癌培養細胞株 ISHIKAWA 株の培養を行い、thymidine の取り込みを比較して、細胞増殖活性の変化を確認する。投与前後の組織での miRNA 発現の変化を検討する

#### (4) 肥満細胞の子宮内膜増殖に関連する因子の探索

メトホルミンはインスリン・IGF-1・レプチンなどの減少から間接的に増殖を抑制していると考えられるが、詳細はわかっていない。脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン、炎症性サイトカインの子宮内膜へ及ぼす影響を検討する。マウス 3T3-L1 線維芽細胞から誘導された脂肪細胞では炎症性サイトカイン、アディポサイトカインの増加が報告されている。この細胞と子宮内膜細胞・子宮体癌培養細胞の共培養を行い、増殖に及ぼす影響を検討する。また、メトホルミン添加によりこの増殖活性が解除されるか検討する。

#### 4. 研究成果

- (1) DES 子宮内膜癌発癌モデルでのメトホルミンの発癌予防の検討は、当初の予定通り遂行できず、計画を変更して検討を行った。
- (2) 倫理委員会の承認のもと、同意の得られた子宮内膜がん(高・中分化型類内膜腺癌、1期相当)で手術予定患者 31 例に対し、術前にメトホルミン 750-2250mg/日投与し服用前後の組織・血液を採取した。まず、メトホルミン投与前後の組織を用いて Ki-67 およびトポイソメラーゼ II 免疫染色で増殖活性を比較したところ、メトホルミン投与後は有意に細胞増殖活性が低下していた。Ki-67 (mean proportional decrease, 44.2%; 95% confidence interval [95% CI], 35.4-53.0 [P<.001]) and topoisomerase II (mean proportional decrease, 36.4%; 95% CI, 26.7-46.0 [P<.001]) labeling indices.

また、メトホルミン投与後は、リン酸化 ERK 1/2 の発現低下(p=.002)、p27 発現の亢進(p=.02) など MAPK 経路の抑制が生じていた。さらに AMPK の活性化(p=.03)、rpS6 活性の低下(p=.002)を認め、mTOR 経路の抑制が確認された。このことから、臨床使用量のメトホルミン服用で、子宮体がん細胞の増殖が抑制されることが確認された。

- (3) メトホルミン投与前後の血清(2%)入りメディウムで子宮体癌培養細胞株の増殖能を検索し、メトホルミン投与後血清は、投与前血清に比較し有意に thymidine 取り込みが減弱することを確認した。以前の検討で、臨床投与量のメトホルミン投与時の、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 と確認している。この低濃度では in vitro での増殖抑制は確認できず、メトホルミンの増殖抑制効果は、間接的な効果の可能性がある。メトホルミンの術前投与により血清中のインスリン、IGF-1、レプチンが有意に低下しており、メトホルミンの増殖抑制効果は、これらの内分泌因子の低下による間接的な効果と考えられた。また、メトホルミンを 5-9 週服用後、75gOGTT 負荷後 2 時間の血清(グルコース、インスリンは増加)は、負荷前の血清と比較して thymidine の取り込みに変化がなかった。このことから、メトホルミンの効果は、インスリン以外の因子の低下を介している可能性が示唆された。

- (4) メトホルミン投与前後の組織より RNA を抽出し、投与前後での miRNA 発現を比較した。前後のペア組織中 4 検体で miR-19b, miR-454, miR-497 の発現が増加していた。メトホルミンの効果について、現在解析中。
- (5) マウス 3T3-L1 線維芽細胞から誘導された脂肪細胞培養上清、3T3-L1 線維芽細胞培養上清を conditioned medium とし、子宮体癌培養細胞株 ISHIKAWA 株の増殖をみたところ、脂肪細胞培養上清で 20%増殖が亢進していた。この培養上清中、C-Reactive protein, IGF-1, IL-6, Leptin, Lipocalin-2 などの adipokine の上昇を認めた。メトホルミン投与によるこれら adipokine の減少を現在確認中である。

#### 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 12 件)

1. Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyomaru T, Goto Y, Fukumoto I, Usui H, Mitsuhashi A, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2015 doi: 10.3892/ijo.2015.2986. (査読有)
2. Hanawa S, Mitsuhashi A, Usui H, Yamamoto N, Watanabe-Nemoto M, Nishikimi K, Uehara T, Tate S, Uno T, Shozu M. Daily Low-Dose Cisplatin-Based Concurrent Chemoradiotherapy for the Treatment of Cervical Cancer in Patients 70 Years or Older. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 in press (査読有)
3. Uehara T, Mitsuhashi A, Tsuruoka N, Shozu M. Metformin potentiates the anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro. *Oncol Rep*. 2015; 33(2):744-50. (査読有)
4. Mitsuhashi A, Usui H, Nishikimi K, Yamamoto N, Hanawa S, Tate S, Watanabe-Nemoto M, Uno T, Shozu M. The Efficacy of Palonosetron Plus Dexamethasone in Preventing Chemoradiotherapy-induced Nausea and Emesis in Patients Receiving Daily Low-dose Cisplatin-based Concurrent Chemoradiotherapy for Uterine Cervical Cancer: A Phase II Study. *Am J Clin Oncol*. 2014 in press (査読有)
5. Mitsuhashi A, Kiyokawa T, Sato Y, Shozu M. Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: A preoperative prospective trial. *Cancer*. 2014 ;120(19):2986-95. (査読有)
6. Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *Int J Clin Oncol*. 2013 18(6):1091-101. (査読有)
7. Mitsuhashi A, Uno T, Usui H, Nishikimi K, Yamamoto N, Watanabe M, Tate S, Hirashiki K, Kato K, Yamazawa K, Shozu M. Daily Low-Dose Cisplatin-Based Concurrent Chemoradiotherapy in Patients With Uterine Cervical Cancer With Emphasis on Elderly Patients: A Phase 2 Trial. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 23(8):1453-8 (査読有)
8. Akita S, Mitsukawa N, Rikihisa N, Kubota Y, Omori N, Mitsuhashi A, Tate S, Shozu M, Satoh K. Early diagnosis and risk factors for lymphedema following lymph node dissection for gynecologic cancer. *Plast Reconstr Surg*. 2013 131(2):283-90. (査読有)
9. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Itesako T, Fujimura L, Mitsuhashi A, Usui H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2013 43(6):1855-63 (査読有)
10. Inamine M, Nagai Y, Mitsuhashi A, Nagase S, Yaegashi N, Yoshikawa H, Aoki Y. Cigarette smoke stimulates VEGF-C expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 and 2 lesions. *Int J Clin Oncol*. 2012 17(5):498-504 (査読有)
11. Matsumoto K, Maeda H, Oki A, Takatsuka N, Yasugi T, Furuta R, Hirata R, Mitsuhashi A, Fujii T, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; for Japan HPV And Cervical Cancer (JHACC) Study Group. HLA class II DRB1\*1302 allele protects against progression to cervical intraepithelial neoplasia grade 3: a multicenter prospective cohort study. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 22(3):471-8. (査読有)
12. Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Japan HPV And Cervical Cancer (JHACC) Study Group. Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*. 2012 84(7):1128-34. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) 三橋 暁 他、メトホルミンはインスリン抵抗性改善による間接効果で子宮内膜癌の増殖を抑制する 第 88 回日本内分泌学会(ホテルニューオータニ東京、東京都千代田区、2015/4/23-25)
- 2) Mitsuhashi A, Hanawa S, Yamamoto N, Uehara T, Nishikimi K, Tate S, Usui H, Shozu M. Prospective evaluation of abnormal glucose metabolism and insulin resistance among patients with endometrial cancer and atypical endometrial hyperplasia.

- ESMO 2014 congress #P928, ( Madrid, Spain, 2014/9/26-30 )
- 3) Mitsuhashi A, Usui, H Satoh Y, Kiyokawa T, Shozu M. A phase II study of medroxyprogesterone acetate plus metformin as fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia. 2014 ASCO annual meeting #5592, ( Chicago, USA, 2014/5/30 )
  - 4) 三橋暁. インシュリン抵抗性をターゲットにした子宮内膜癌の治療戦略. 第 1281 回千葉医学会例会生殖医学(産科婦人科)分科会(千葉市文化センター、千葉県千葉市、2013/12/7 )
  - 5) 三橋暁, 植原貴史, 碓井宏和, 楯真一, 山本憲子, 錦見恭子, 生水真紀夫. メトホルミンは間接的に子宮内膜癌患者の増殖を抑制する. 第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会( ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京都港区 2013/7/19-21 )
  - 6) 三橋暁, 植原貴史, 碓井宏和, 楯真一, 山本憲子, 錦見拳子, 生水真紀夫. メトホルミンは間接的に子宮内膜癌患者の増殖を抑制する. 第 14 回ホルモンと癌研究会( 東京大学山上会館、東京都文京区 2013/7/13 )
  - 7) 植原貴史, 三橋暁, 鶴岡信栄, 碓井宏和, 石川博士, 生水真紀夫. メトホルミンは単独および抗がん薬との併用で子宮体癌細胞の増殖を抑制する. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会( ロイトン札幌、北海道札幌市、2013/5/10-12 )
  - 8) 三橋暁, 植原貴史, 碓井宏和, 楯真一, 山本憲子, 錦見恭子, 生水真紀夫. メトホルミンは間接的に子宮内膜癌患者の増殖を抑制する. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会( ロイトン札幌、北海道札幌市、2013/5/10-12 )
  - 9) Shozu M, Uehara T, Mitsuhashi A. Metformin, An Old Drug for a New Endocrine Therapy to Endometrial Cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer( 石川県立音楽堂、石川県金沢市、2012/11/15-17 )
  - 10) Mitsuhashi A, Usui H, Uehara T, Tate S, Nishikimi K, Yamamoto N, Shozu M. Metformin prevents recurrence after progestin therapy and improve insulin resistance for fertility-sparing treatment in young women with endometrial cancer or atypical endometrial hyperplasia. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer ( 石川県立音楽堂、石川県金沢市、2012/11/15-17 )
  - 11) Mitsuhashi A, Uehara T, Usui H, Yamazawa K,

Shozu M. Therapeutic Doses of Metformin Suppresses Cell Proliferation of Endometrial Cancer in vivo. 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS) ( Vancouver, Canada, 2012/10/15 )

- 12) 植原貴史, 三橋暁, 鶴岡信栄, 石川博士, 碓井宏和, 山澤功二, 生水真紀夫. 子宮体癌細胞株に対するメトホルミンと抗がん薬の増殖抑制効果. 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会( 大阪国際会議場、大阪府大阪市、2012/7/26-28 )
- 13) 三橋暁, 碓井宏和, 植原貴史, 錦見恭子, 山本憲子, 楯真一, 山澤功二, 生水真紀夫, 清川貴子. 子宮体癌・子宮内膜異型増殖症に対するメト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 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会( グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区、2012/7/19-21 )

〔図書〕(計 3 件)

三橋暁, 生水真紀夫. 糖尿病治療薬が子宮体がん に奏効する可能性. 産科と婦人科 82 , 2015, in press

三橋暁, 生水真紀夫. 「子宮体がん診療アップデート」子宮体がんの妊孕性温存療法. 婦人科産科 67:498-504, 2013

三橋暁, 生水真紀夫. 「ホルモン依存性悪性腫瘍-特徴と対処を考える-」子宮体がんでの妊孕性温存療法の新たな取り組み. 産婦人科の実際 62:1207-1213, 2013.

三橋暁, 生水真紀夫. 「ホルモン療法実践マニュアル」腫瘍分野 12.アロマターゼ阻害薬と婦人科がん. 産科と婦人科 第 80 巻増刊号 2012

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 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

錦見 恭子 (NISHIKIMI Kyoko)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00536302

山本 憲子 (YAMAMOTO Noriko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30586722

### (3)連携研究者

なし( )

研究者番号：