

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791686

研究課題名(和文) 子宮体癌に対するメトホルミンと抗がん剤併用効果の検討

研究課題名(英文) Effects of metformin in combination with chemotherapeutic agents on endometrial carcinoma cells

研究代表者

植原 貴史 (Uehara, Takashi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70568659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌に対するメトホルミンと抗がん薬(シスプラチン)併用の効果を、子宮体癌細胞株を用いて検討した。メトホルミンは、単独添加で子宮体癌細胞株の増殖を抑制し、シスプラチンとの併用により、シスプラチンの増殖抑制作用を増強させた。このシスプラチンの細胞増殖抑制作用に対するメトホルミンの増強作用は、低酸素下で減弱したが拮抗することはなかった。シスプラチン投与中のメトホルミン投与は、シスプラチンの作用に特に影響を及ぼさないが、シスプラチン投与間欠期のメトホルミンは単独で細胞増殖を抑制する。従って、実際に子宮体癌の化学療法時のメトホルミン投与は、治療効果を高める可能性があるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：We assessed the anti-cancer effect of metformin in combination with chemotherapeutic agent (cisplatin) on endometrial cancer cell line. Metformin inhibited endometrial cancer cell proliferation, and potentiated the anti-cancer effect of cisplatin on endometrial cancer cell line. These effects were attenuated under hypoxic condition compared to normoxic condition, though were not antagonized. Administration of metformin with cisplatin does not affect the efficacy of cisplatin, and metformin without cisplatin inhibits cancer cell proliferation. Administration of metformin in combination with cisplatin on the treatment of endometrial cancer probably enhances the therapeutic effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍 子宮体癌 メトホルミン 抗がん薬

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病治療に用いられる経口血糖降下剤であるメトホルミンを服用している患者には癌の発生が少ないことが相次いで報告されている。メトホルミンは、AMPK を活性化することで血糖低下に関わっていることが示されており、また AMPK を活性化する以外の作用も抗がん治療に対して、有効性を示す可能性があると期待され、各がん腫で研究が進んでいる。子宮体癌細胞株においてメトホルミンがアポトーシスを誘導することや、AMPK 活性化を介した細胞増殖因子による癌細胞の増殖抑制効果が示されている。子宮体癌では肥満の頻度が高く、耐糖能異常を示す患者が多いことが知られ、当科ではメトホルミンを用いて、この耐糖能異常を是正することで若年性子宮体癌の予後が改善するかどうかを研究中である。

一般に抗がん剤を併用して用いる場合は、併用する薬剤による相乗効果を期待し、異なる作用機序を有し、しかも各がん腫に対し単剤で抗がん作用を示す薬剤を併用する。抗がん剤は細胞周期に影響を与えることで癌細胞治療に効果を示す。進行子宮体癌に対する世界的に標準的な術後補助療法は、抗がん剤のシスプラチンとドキシソルピシンを併用した化学療法である。しかし、これらの薬剤を併用して用いた治療成績は残念ながら高いものではなく、さらに有効な治療方法が望まれている。以上のようなことから、我々は抗がん剤とは異なった作用機序を持ち、しかも単剤でも子宮体癌に対して細胞増殖抑制効果を示し、かつ使用経験が長く安価なメトホルミンを、現在の標準治療である抗がん剤と併用し、抗がん作用が増強するかどうかを調べる研究を計画した。

2. 研究の目的

進行子宮体癌に対して、シスプラチン・ドキシソルピシン・パクリタキセルなどを用いた化学療法が行われている。しかし、これらの併用療法でも、治療成績は高いものではなく、さらに有効な治療方法が望まれている。われわれは、子宮体癌細胞株である Ishikawa 細胞において、糖尿病治療薬であるメトホルミンの細胞増殖抑制効果を確認した。本研究では、メトホルミンと抗がん剤を併用し、子宮体癌培養細胞株での増殖抑制効果を検証す

る。

3. 研究の方法

子宮体癌培養細胞株である Ishikawa 細胞を用いて実験を行った。Ishikawa 細胞に対し、メトホルミン (0 - 10 mM) およびシスプラチン (0 - 5 μ M) 単独投与時の増殖抑制効果を、血球計数盤を用いた細胞数カウント、テトラゾリウム環を有する化合物を用いた比色分析法 (WST 法・MTT 法) 放射性同位元素を用いた 3 [H]-サイミジン取り込み法で評価し、各測定法の相違を検討した。メトホルミンおよびシスプラチン暴露時の細胞の大きさは光学顕微鏡で観察した。また、メトホルミンがミトコンドリアの形態に与える影響を Mito Tracker 染色で、ミトコンドリアの機能に与える影響を培地の乳酸濃度測定により検討した。

メトホルミンとシスプラチン併用時の増殖抑制効果は細胞数カウントならびに 3 [H]-サイミジン取り込み法で観察した。メトホルミンとシスプラチン併用時の細胞周期に対する影響はフローサイトメトリー法で検討し、アポトーシスへの影響はカスパーゼ活性法で検討した。また、 3 [H]-サイミジン取り込み法を通常酸素 (21%酸素) および低酸素 (1%酸素) 条件で行い、培養酸素状態による変化を評価した。

4. 研究成果

メトホルミンおよびシスプラチンは、Ishikawa 細胞の細胞数を濃度依存性に減少させた。WST 法・MTT 法は、細胞数カウントや 3 [H]-サイミジン取り込み法と比べ、細胞増殖抑制効果を有意に低く判定していた (Figure 1A, 1B)。

Figure 1A.

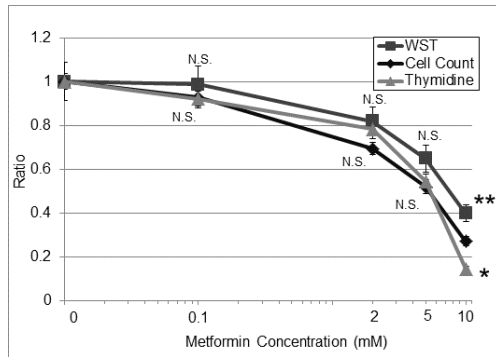
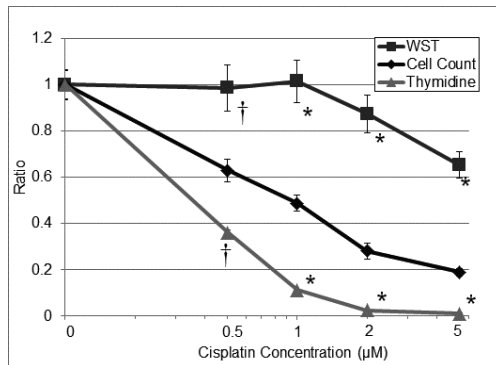


Figure 1B.



(*: $P < 0.001$, **: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$)

この乖離の原因を明らかにする目的で、メトホルミンの Ishikawa 細胞の細胞径に及ぼす影響を検討した。細胞径はメトホルミン投与により、有意に減少し、シスプラチン暴露により増大した。(Table 1.)

Table 1. Cell area after exposure to metformin or cisplatin

	Cell Area (Ratio)	P value
Control	1 ± 0.11	
CDDP 0.5 μM	1.33 ± 0.11	$P = 0.04$
CDDP 2 μM	2.41 ± 0.15	$P < 0.001$
MET 2 mM	0.80 ± 0.06	$P = 0.134$
MET 10 mM	0.59 ± 0.04	$P = 0.02$

WST 法・MTT 法では、一定時間に還元されたテトラゾリウム塩の吸光度を測定し、細胞あたりの平均の吸光度で割ることにより細胞数を推定している。したがって、WST 法・MTT 法における作用の見かけ上の減弱に細胞サイズの縮小が関与しているものと考

えられた。

メトホルミン (2 mM) 併用は、シスプラチン単独に比べ、細胞数および ^3H -サイミジン取り込み量をそれぞれ有意に低下させた。しかし、メトホルミン (0.1 mM) 併用では、シスプラチン単独に比べ有意な差を認めなかった。一方で、メトホルミン (2 mM) 併用により、カスパーゼ活性が亢進する傾向および G1/S 期で停止する細胞割合が増加する傾向を認めた。

通常酸素下では、メトホルミン (2–5 mM) 併用はシスプラチン単独に比べ、 ^3H -サイミジン取り込み量を有意に減少させた (Figure 2A)。しかし、低酸素下では、メトホルミン (2–5 mM) 併用による ^3H -サイミジン取り込み量の減少効果が、通常酸素下に比べ減弱した (Figure 2B)。一方で、メトホルミンは、シスプラチンの抗腫瘍効果に対し拮抗作用を示さなかった。

Figure 2A,

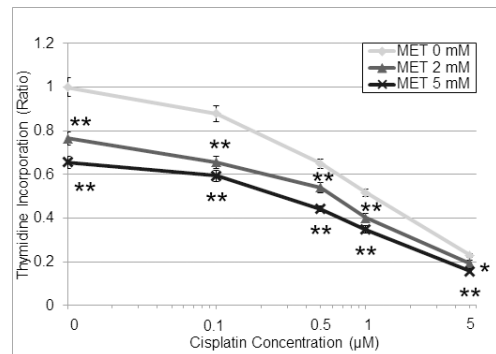
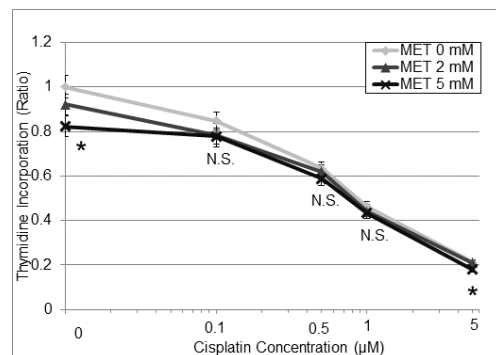


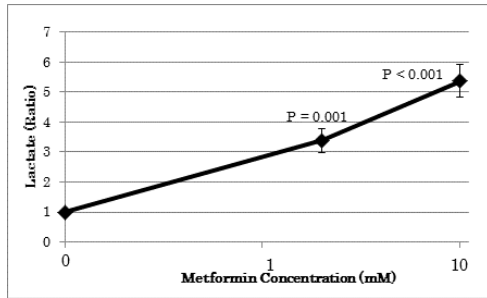
Figure 2B.



(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

メトホルミンは、48 時間曝露で Mito Tracker によるミトコンドリア染色量を濃度依存性に低下させ、8 時間曝露でもミトコンドリア染色量を低下させた。メトホルミンは培地中乳酸濃度を濃度依存性に増加させた (Figure 3.)。

Figure 3.



以上から、シスプラチン投与中のメトホルミン投与はシスプラチンの作用に影響しないが、シスプラチン投与の間欠期に投与されるメトホルミンは単独で細胞増殖を抑制することができる。子宮体癌に対する抗がん薬治療時にメトホルミンを併用することで、治療効果が高まる可能性があると考えられた。

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 3 件)

Sakaida Emiko, Sekine Ikuo, Iwasawa Shunichiro, Kurimoto Ryota, Uehara Takashi, Ooka Yoshihiko, Akanuma Naoki, Tada Yuji, Imai Chiaki, Oku Tomoko, Takiguchi Yuichi. Incidence, Risk Factors and Treatment Outcomes of Extravasation of Cytotoxic Agents in an Outpatient Chemotherapy Clinic. Jpn J Clin Oncol. 2014 Feb;44(2):168-71 査読有り

Uehara Takashi, Kiyokawa Takako, Tate

Shinichi, Usui Hirokazu, Shozu Makio.

“Numerous psammoma bodies in cervical cytology of high-grade endocervical adenocarcinoma.” Cytopathology, in press 査読有り

Uehara Takashi, Onda Takashi, Togami Shinichi, Amano Tsukuru, Tanikawa Michihiro, Sawada Morio, Ikeda Shun-ichi, Kato Tomoyasu, Kasamatsu Takahiro. “Prognostic impact of the history of breast cancer and of hormone therapy in uterine carcinosarcoma.” International Journal of Gynecological Cancer, 2012, 22: 280-285. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

2013 年 5 月 10 日～12 日、札幌、第 65 回 日本産科婦人科学会学術講演会

「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」

植原貴史、三橋暁、鶴岡信栄、石川博士、碓井宏和、生水真紀夫

2012 年 11 月 15 日～17 日、金沢、15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer

“Metformin Combination with Cytotoxic Chemotherapeutic Agents in Endometrial Cancer Cell Lines”

Takashi Uehara, Akira Mitsuhashi, Nobuhide Tsuruoka, Hiroshi Ishikawa, Hirokazu Usui, Makio Shozu

2012 年 7 月 26 日～28 日、大阪、第 10 回 日本臨床腫瘍学会

「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」

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

〔図書〕(計 1 件)

- **植原貴史**、「悪性腫瘍の病態生理、症状、治療について概説できる」、スタンダード薬学シリーズ 6、日本薬学会編、薬と疾病、III. 薬物治療(2)および薬物治療に役立つ情報、第2版、東京化学同人、東京、2012年 査読なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/staff/staff_t_uehara.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

植原 貴史 (Uehara Takashi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70568659

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：