

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670694

研究課題名(和文)PCOS治療におけるメトホルミンの弱点(内膜抑制作用)克服に向けた研究

研究課題名(英文)Effects of metformin on endometrial cell in PCOS patients

## 研究代表者

生水 真紀夫 (SHOZU, Makio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30226302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メトホルミンは、排卵障害に投与されるが排卵率に比し着床率が低い。そこで、メトホルミンは内膜細胞の増殖および関連シグナルを変化させることで着床不全をもたらすとの仮説を立てて検証した。メトホルミンは、子宮内膜癌細胞株の細胞増殖と関連シグナルを抑制したが、正常子宮内膜上皮由来株(EME6E7TER-ER)には影響を与えなかった。次に、met服用者の子宮内膜組織について、メトホルミンの影響を検討した。メトホルミンは、癌組織のERK・mTOR経路の抑制・増殖マーカーを低下させたが、正常内膜には影響を与えなかった。以上より、メトホルミンは正常内膜細胞の増殖シグナルと増殖に影響を与えないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Metformin (met) has been used for ovulation induction. The conception rate of met is not, however, as high as would be expected from its higher ovulation rate. We tested the hypothesis that met inhibits cell proliferation and the signal pathways for implantation, thus inhibiting embryo implantation. We examined the met actions on EME6E7TER-ER cells that were derived from normal endometrial (EM) cells. Met did not affect the cell proliferation, whereas it inhibited proliferation and signals in EM cancer cells. Next we examined the effect of met in vivo. Tissue specimens were obtained from EM cancer patients and patients with PCOS who took met. Non-cancerous EM cells showed no change after met intake, whereas EM cancer cells showed a decreased proliferation and related signals. Our results suggest that EM cells are less sensitive to the suppressive action of met and, thus the inhibition of the proliferation signal is not the mechanism of the relatively low conception rate of met.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：産婦人科学 生殖医学 メトホルミン

## 1. 研究開始当初の背景

PCOS の治療は、不妊症の重要な課題である。クロミフェン無効例に、FSH 投与や卵巣多孔術などが行われているが、OHSS や多胎・手術にともなう負担などの問題がある。

最近では、インスリン抵抗性のある PCOS にメトホルミンが試みられる。メトホルミンは、排卵率を有意に上昇させるが、妊娠率の上昇は有意でないことがメタ解析で明らかにされている。メトホルミンによる排卵が妊娠に結びつきにくい理由については、これまで不明であった。われわれは、メトホルミン投与が子宮体がん患者の再発抑制に有効であることを報告してきた。この研究過程で、メトホルミンが内膜(がん)の細胞増生を強く抑制することを発見した。MAPK および mTOR-S6K などの内膜増殖関連のシグナル系も抑制されていた。

この観察から、メトホルミン投与が正常内膜の増殖を抑制するとともに、胚着床により誘導されるべきシグナルカスケードの不活化をもたらすことが、メトホルミン投与における着床率低下に結びついている可能性があると考えらるにいたった。

## 2. 研究の目的

PCOS 患者に排卵誘発の目的で用いられつつあるメトホルミンは、排卵率を上昇させるが、妊娠率の上昇に必ずしも結びついていない。この原因として、メトホルミンが子宮内膜の増生を強く抑制すること、着床誘導に必要なシグナルカスケードを抑制しているとの仮説を立てて、検証することを目的とした。

メトホルミンの内膜抑制作用は、不妊治療には欠点であるが、PCOS に合併しやすい内膜がん予防という観点からは長所である。本研究成果は、不妊と内膜がんの両方の問題を

抱える PCOS 患者の管理に新たな視点を拓く。

われわれの仮説が正しければ、メトホルミン投与下に採卵し一旦凍結保存した後に、メトホルミン投与中断中に胚移植を行うことにより妊娠率の上昇を計ることができる可能性がある。

## 3. 研究の方法

今回の研究では、in vitro と in vivo の系で正常内膜細胞に対するメトホルミンの作用を検討する。これまでの研究にもとづき、その効果を癌細胞と比較することで、メトホルミンに対する反応性が評価できる。In vitro の系では、正常内膜の代用として正常内膜より E6E7 抗原およびテロメラーゼを導入して不死化した細胞にエストロゲン受容体を共発現させた細胞 (EME6E7TERT-ER $\alpha$ ) を用いる。また、in vivo の検討には、子宮がんて摘出された子宮内膜のうち正常内膜が標本中に認められた患者の手術検体を用いる。また、PCOS 患者のうち、抗インスリン血症や高 BMI の改善をめざして行われるメトホルミン投与試験に参加する患者のうち、子宮内膜生検標本(がんではない)が得られ研究に同意が得られた患者についても、同様の内膜抑制効果を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) In vitro での検討

#### 細胞増殖に及ぼす効果

子宮内膜初代培養細胞の確保は困難であったことから、正常子宮内膜上皮由来不死化細胞株 EME6E7TERT-ER $\alpha$  を用い子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa, HEC) との比較を行った。

その結果、メトホルミンの添加により

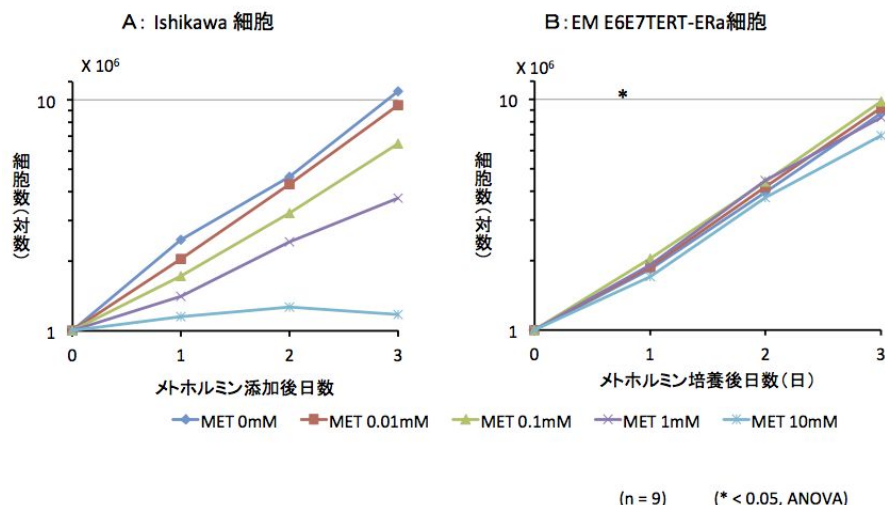


図1 EM E6E7TERT-ER $\alpha$ 細胞の細胞増殖におよぼすメトホルミンの影響

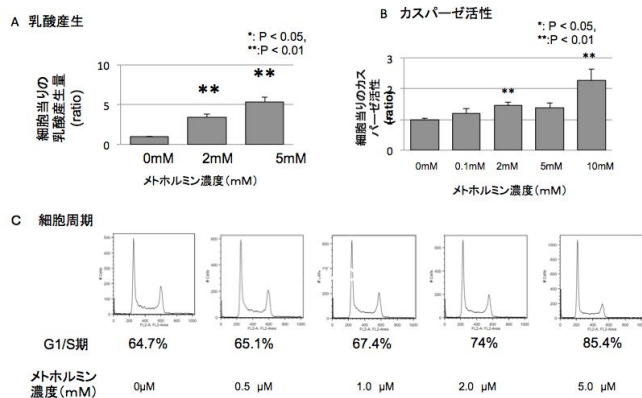


図2 細胞活性におよぼすメトホルミンの効果 (Ishikawa細胞)

Ishikawa 細胞では容量依存性の細胞増殖抑制が認められた(図 1A)。このメトホルミン添加による無添加との細胞増殖数の差は、低酸素処理により消失したことから、培地内に著明な乳酸蓄積が見られたこと(図 2)などから、メトホルミンはミトコンドリアによる酸素依存性エネルギー産生を抑制することによるものと考えられた。そこで、ミトコンドリアを Mito Tracher で染色して観察したところ、メトホルミンによりミトコンドリアの長さが短くなること、面積あたりの染色性の低下が認められることが明らかとなった(図 3)。フローサイトメトリーおよびカスパーゼ活性の変化を検討した結果、メトホルミンの細胞増殖抑制は、主として G1/S 停止でありアポトーシスの亢進の関与はわずかであることが明らかとなった。

そこで、次に正常子宮内膜細胞での効果を検討した。正常子宮内膜細胞の代用として EME6E7TERT-ER $\alpha$ (正常子宮内膜細胞に E6, E7, TERT, Era を導入して不死化した細胞)を用いて同様の検討を行った。その結果、メトホルミン 10 mM の添加で僅かに増殖が抑制されたものの、癌細胞とは異なり細胞増殖はメトホルミンの影響をほとんど受けないことが明らかとなった(図 1B)。

### カドヘリン発現に及ぼす効果

次に、癌細胞との違いを明らかにする目的で、カドヘリン発現への影響を検討した。これは、メトホルミンは肺がん細胞で E-cadherin の増加をもたらすと報告があ

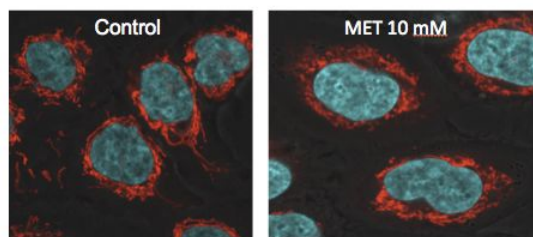


図3 メトホルミンのミトコンドリア携帯の変化(Ishikawa 細胞)

り、メトホルミンの投与が内膜細胞の組織構造を変化させて初期胚の着床などに影響を及ぼす可能性があると考えられたからである。図 4 に示すように、Ishikawa 細胞では細胞表面に明瞭な E-cadherin 発現が認められた。この染色性はメトホルミン 10mM の添加によってほとんど変化しないかむしろやや減弱した。これに対し、EME6E7TER-ER $\alpha$  では、E-cadherin の細胞表面への集積は認められず、細胞も大型で非接着性の間質細胞様の形態を示すことが明らかとなった。メトホルミン 10mM の添加により細胞全体の染色性の亢進と、ごくわずかな細胞表面への集積性の増加が認められた。細胞の接着性も僅かに亢進しているように思われた。

### (2) In vivo での検討

細胞培養による成績は、癌細胞がメトホルミンによる影響を強く受けて増殖性が低下するのに対して、正常内膜細胞ではその影響を余り受けないことを示唆する。これは、非がん患者(PCOS患者など)に対するメトホルミン投与が内膜機能を傷害し、着床障害などに働く可能性が低いことを意味している。しかしながら、カドヘリン発現の検討生成期や細胞形態観察からは、EME6E7TERT-ER $\alpha$  が上皮としての特徴を失いつつあることが示唆され、細胞増殖での結果もこれと関連した結果であることが否定できない。そこで、できるかぎり生理的に近い内膜での検討を行った。

研究材料は、子宮内膜癌で術前に内膜生

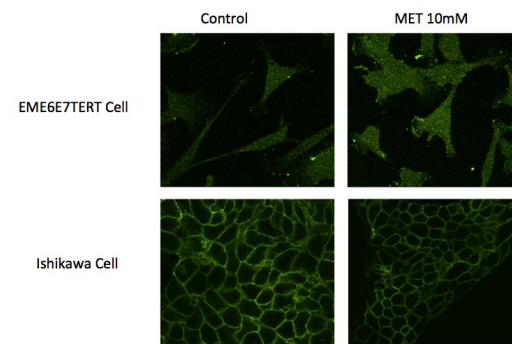


図4 E-cadherin 発現に及ぼすメトホルミンの効果

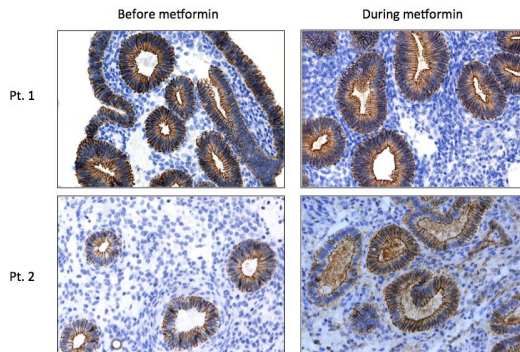


図5 正常内膜のカドヘリン発現におよぼすメトホルミン影響

検が行われ、その後メトホルミンをおよそ4週間投与し、子宮摘出術が施行された患者のうち、術後の子宮検体の検索により非癌内膜組織が確認できた症例(n=5)、PCOSと肥満や内膜増殖症など、内膜癌のハイリスクと考えられた患者でメトホルミン投与による代謝改善効果を評価する研究に参加した患者のうち、メトホルミン投与前後の内膜細胞の得られた患者(n=2)である。HE染色のほか、Ki67, Topoisomerase II およびMPAK-cyclin D-Rb および mTOR-S6K シグナル分子による免疫染色を行って非癌内膜組織の細胞増殖性とそのシグナルをメトホルミン投与前後で比較した。さらに、内膜癌患者では、癌組織におけるメトホルミン反応性とも比較検討した。

その結果、癌組織ではメトホルミン服用前に認められたMPAK-cyclin D-Rb および mTOR-S6K シグナルの亢進が、服用後に低下してKi67の染色性の低下が認められた。これに対して、正常組織では、投与前後でほとんど増殖性マーカー、シグナル分子の変化が認められなかった。非癌患者においても正常内膜にメトホルミン投与後の有意の変化は見られなかった。図5にカドヘリン染色の比較を示す。これらの成績は、メトホルミンはインスリン抵抗性のない患者に投与しても、インスリン値や血糖値など内分泌環境に影響を与えないことと一致した所見と考えられた。

### (3) ダグラス窩異所性子宮内膜の同定

一連の研究過程で、婦人科疾患で摘出された子宮標本の観察を子細に行った。その際、ダグラス窩腹膜に高率(子宮頸癌: 6/30例、子宮体癌: 12/41例)に子宮内膜類似組織が存在していることを発見した(図6)。

この組織は、正常内膜に近い細胞であることからメトホルミン作用の評価に使える可能性がある。また、この部位の腺管は深部子宮内膜症の起源である可能性が示唆され、今後検討する価値が十分にある所見と考えられた。

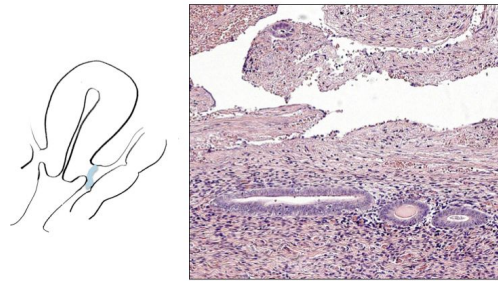


図6 ダグラス窩深部組織内の内膜腺類似構造(子宮癌患者摘出標本)

### (4) まとめ

メトホルミンが正常子宮内膜に及ぼす影響をin vivoおよびin vitroの系で検討した。その結果、正常内膜細胞は癌細胞と異なり、メトホルミンによる細胞増殖抑制を受けないものと考えられた。したがって、少なくとも細胞増殖の面でメトホルミン投与が不妊治療に不利益をもたらすことはないと推定された。これは、メトホルミンが高血糖の是正をもたらすが血糖正常者に低血糖をもたらすことがないのと類似している。

### 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19件)

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 May 5. Doi: 10.3892/ijo.2015.2986. [Epub ahead of print] (査読有)

Nishikimi K, Kiyokawa T, Tate S, Iwamoto M, Shozu M. ARID1A Expression in Ovarian Clear Cell Carcinoma with an Adenofibromatous Component. *Histopathology*. 2015 Apr 23. Doi: 10.1111/his.12721. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25913291. (査読有)

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 Mar 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25811592. (査読有)

Uehara T, Mitsuhashi A, Tsuruoka N, Shozu M. Metformin potentiates the

anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro. *Oncol Rep*. 2015 Feb ; 33(2):744-50. Doi: 10.3892/or.2014.3611. ( 査読有 )

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 Aug 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25144265. ( 査読有 )

Shozu M, Fukami M, Ogata T. Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for clinical diagnosis. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2014 Jul; 9(4):397-409. Doi: 10.1586/17446651.2014.926810( 査読有 )

Mitsuhashi A, Kiyokawa T, Sato Y, Shozu M. Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: A preoperative prospective trial. *Cancer*. 2014 Jun 10; 120 (19): 2986-95. DOI: 10.1002/cncr.28853. ( 査読有 )

Wang G, Ishikawa H, Sone K, Kobayashi T, Kim JJ, Kurita T, Shozu M. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2014 May ; 101(5): 1485-1492.e3. DOI:10.1016/j.fertnstert.2014.01.054 ( 査読有 )

Fukami M, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, Ogata T. Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014 Mar;11(3):298-305. Review. PubMed PMID: 24716396. ( 査読有 )

Fukami M, Tsuchiya T, Vollach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, Shihara D, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination-and Replication-Mediated Rearrangements Leading to CYP19A1 Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Dec. ; 98 (12) E2013-21. DOI: 10.1210/jc.2013-2520. ( 査読有 )

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 Dec; 43(6):1855-63. doi: 10.3892/ijo.2013.2145. Epub 2013 Oct 18. PubMed PMID: 24141696; PubMed Central PMCID: PMC3834344. ( 査読有 )

Shozu M, Kobayashi T. Organization, Function, and Relationship of Aromatase Promoters. *アンドロロジー学会ニュースレター2013-7* ( 査読無 )

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2013 May; 42(5):1523-32. Doi: 10.3892/ijo.2013.1851. ( 査読有 )

Tatsuno I, Terano T, Nakamura M, Suzuki K, Kubota K, Yamaguchi J, Yoshida T, Suzuki S, Tanaka T, Shozu M. Lifestyle and osteoporosis in middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. *Endocr J*. 2013 May; 60(5):643-50. Epub 2013 Jan 18. PubMed PMID: 23327841. ( 査読有 )

Fukami M, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S. Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene CYP19A1 in breast cancer. *Breast Cancer* 2013 ; Published online 30 April, 2013. DOI: 10.1007/s12282-013-0471-5. ( 査読有 )

[学会発表](計 28 件)

Ishikawa H, Gui Wen Wang, Kobayashi T, Kawarai Y and Shozu M. Subrenal xenograft model for human uterine leiomyoma in non obese diabetic severe combined immunodeficient mice. American Society of Reproductive Medicine (ASRM) 2014 Annual Meeting( October 18 ~ 22, Honolulu, USA )

生水真紀夫. 特別講演: エストロゲンとその合成酵素の働き - 卵を育て、性を育み、骨を作る. 第 16 回更年期と加齢のヘルスケア学会神奈川支部 ( 2013.12.8、三菱重工横浜ビル、神奈川県横浜市 )

Toshiyuki Kakinuma, Matthew Dyson, Mary Ellen Pavone, Diana Monsivais,

Serdar E Bulun, Makio Shozu. DNA methyltransferase and Ten-Eleven-Translocation Expression in The Human Endometrium: Regulation by Progesterone and Estrogen. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (2013 November 14, 神戸国際会議場、兵庫県神戸市)

Toshiyuki Kakinuma, Matthew Dyson, Mary Ellen Pavone, Diana Monsivais, Serdar E Bulun, Makio Shozu. DNA methyltransferase and Ten-Eleven-Translocation Expression in The Human Endometrium. 18th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI) (2013 October 24~27, Vienna, Austria)

生水真紀夫. 特別講演：がん予防薬：メトホルミン. 第 27 回日本臨床細胞学会関東連合学術集会 (2013.9.7、京葉銀行文化プラザ、千葉県千葉市)

生水真紀夫. 特別講演：女性のライフスタイルとエストロゲン - アロマトラーゼの関与 -. 第 15 回更年期と加齢のヘルスケア学会神奈川支部 (2013.7.28、三菱重工横浜ビル、神奈川県横浜市)

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 (2013.7.19 ~ 21、ホテルブランドパシフィック Le Daiba、東京都港区)

Segawa T, Teramoto S, Miyauchi O, Watanabe Y, Hayashi T, Ohkubo T, Onda N, Ueno T, Tsuchiyama S, Shinohara K, Yelian F, Ishikawa H, Shozu M. Oocyte retrieval from collateral follicles improves outcomes of natural or low ovarian stimulus cycle IVF. European Society of Human Reproduction and Embryology Annual Meeting (2013 July 7 ~ 10, London, U.K)

生水真紀夫. シンポジウム：加齢に伴う卵子の変化. 第 12 回生殖バイオロジー東京シンポジウム (2013.6.23、都市センターホテル、東京都千代田区)

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 (2013.5.10 ~ 12、ロイトン札幌他、北海道札幌市)

Makio Shozu and Tatsuya Kobayashi. Symposium 2 Non-androgenic steroids in the male: Organisation, function and relationship of aromatase promoters.

10th International Congress of Andrology (ICA) (2013 年 2 月 23 日 ~ 26 日、メルボルン、オーストラリア)

〔図書〕(計 1 件)

Hiroshi Ishikawa and Makio Shozu. Chapter 11 Aromatase Expression in Endometriosis and Its Significance. Endometriosis Pathogenesis and Treatment (Harada Ed.), Springer, 2014: 155-178

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)  
なし

取得状況 (計 件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

なし ( )