

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861288

研究課題名(和文)膀胱癌における新規抗癌療法：抗酸化ストレスとメチル化阻害剤による抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文)The synergic effect of metformin and 5-aza-CdR for bladder cancer

研究代表者

羅 奕(Lou, Yi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30633797

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)：1)細胞内のAGEsを変化させ、5-aza-CdRによる抗腫瘍効果とp16のメチル化頻度を検討した。低AGEs濃度下では5-aza-CdR処理により増殖は抑制し、p16のメチル化頻度の低下を認めた。2)膀胱癌症例対象とした。CMLH3K27とp16の発現は、高悪性度症例においてCMLH3K27の発現は上昇し、p16の発現は低下した。p16のメチル化は高悪性度癌で上昇した。3)ヌードマウスxenograftモデルを用いてメトホルミン、5-aza処理による抗腫瘍効果を検討した。5-aza処理による抗腫瘍効果は認められたが、メトホルミン併用による抗腫瘍効果は単剤と比較し有意差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I elucidated anti-tumor effects of the combination, which were 5-aza-CdR and metformin against urothelial cancer. AGEs accumulate in the cells which are exposed long term oxidant stress. I presented a hypothesis that the AGEs bind the DNA histone tails and close chromatin structures might results inhibit tumor suppressor genes such as p16 through epigenetic regulation. DNMT inhibitor, 5-aza-CdR showed anti-tumor effect for urothelial cancer in both in vivo and in vitro clearly, however the combination of 5-aza-CdR and metformin, which are inhibitor of AGEs formation did not show synergic effect. On the other hand, metformin progressed the re-expression of p16 through epigenetic regulation, that are open the chromatin.

研究分野：病理学

キーワード：尿路上皮癌 DNAメチル化 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

1)背景：加齢や炎症により組織に蓄積される酸化ストレスは血管障害や発癌の原因になることが知られている。長期的な酸化ストレス存在下では、メイラード反応により糖と蛋白質から細胞内に AGEs(advanced glycation end products)が生成される。過剰に蓄積された AGEs は AGE レセプター (RAGE)を介して種々の代謝異常やシグナル異常を引き起こし、神経変性疾患、糖尿病血管合併症、腫瘍の増殖、転移等の直接的な原因となる。腫瘍の増殖に關与する AGE-RAGE 系下流のシグナルとして p21Ras 系、MAPK、NF- B 系等が活性化されることが報告されている(図1)。申請者らは RAGE のリガンドの一つである HMGB1(High mobility group box 1)に注目し、胃癌、大腸癌、前立腺癌で RAGE と MGB1 の発現が癌の進行・転移、あるいは再発・予後と關することを報告してきた(Kuniyasu et al. Int J Cancer 2003、Oncol Rep. 2003、J Pathol. 2002)。

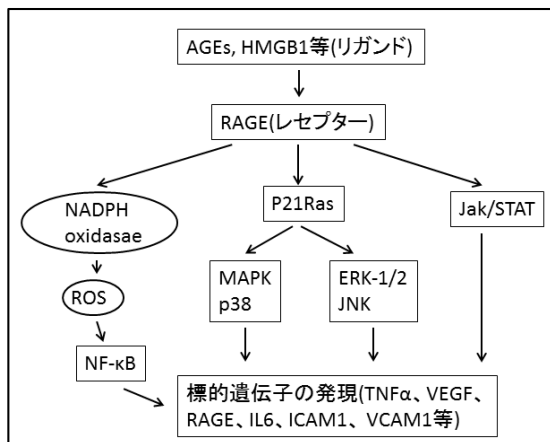


図1 . AGE-RAGE シグナル経路

2)着想に至った経緯：上述のメイラード反応は半減期の長い蛋白質に生じるため、DNA を形成するヒストン蛋白は AGEs 形成の標的になる。ヒストン蛋白上に形成された AGEs はヒストンテールのアミノ酸残基と強固に結合し、AGEs 修飾ヒストンが形成されることが報告されている。AGEs 修飾ヒストンはエピジェネティクス変化をもたらす、種々の遺伝子発現を増加または減少させることが知られているが、その機序は明らかになっていない。申請者は、ヒストンテールに結合した AGEs は活性クロマチンに必要なアセチル化や H3K4 トリメチル化を阻害し、遺伝子発現を不活化するという仮説を立てた(図 2)。アセチル基を失ったヒストンテールは DNMTs をリクルートし、DNA メチル化を促進し、さらに遺伝子不活化を助長する。すなわち、癌細胞において AGEs は RAGE を介して増殖シグナルを活性化させるのみならず

エピジェネティクスを介した遺伝子発現抑制に關与すると考えられる。

DNMTs 阻害剤は不活化遺伝子プロモーター領域を脱メチル化し、遺伝子発現を回復させる機序が知られ、本邦でも骨髄増殖性疾患に対する新規抗癌剤として承認された薬剤である。一方、固型癌に対しては従来の抗癌剤に比し有効とする報告はない。しかしながら、膀胱癌においても、DNA メチル化異常による遺伝子発現異常が報告されており、本薬剤は新規抗癌剤としての有効性が充分期待できると考えた。

以上より、申請者は抗 AGEs 作用を有するメトホルミンと DNMTs 阻害剤である 5-aza-CdR の併用によるエピジェネティクスを介した不活化遺伝子の再発現および抗腫瘍効果の相乗効果を検討するという着想に至った。

先行研究として、膀胱癌細胞(T24)を用いて、メトホルミン、5-aza-CdR 処理によるヒストン修飾と細胞増殖能、膀胱癌における癌抑制遺伝子

の一つである p16 遺伝子発現の定量解析を行った。メトホルミン、5-aza-CdR の単独処理ではアセチル化ヒストン 3 は増加し、p16 遺伝子発現の軽度回復を認めた。また細胞増殖能も軽度に低下した。両薬剤を併用すると単独処理による効果よりも優れた相乗効果を認めた。以上の膀胱癌細胞における結果から、メトホルミンと 5-aza-CdR の併用が膀胱癌に対する新規の有効な抗癌治療法として有望であることが示された。

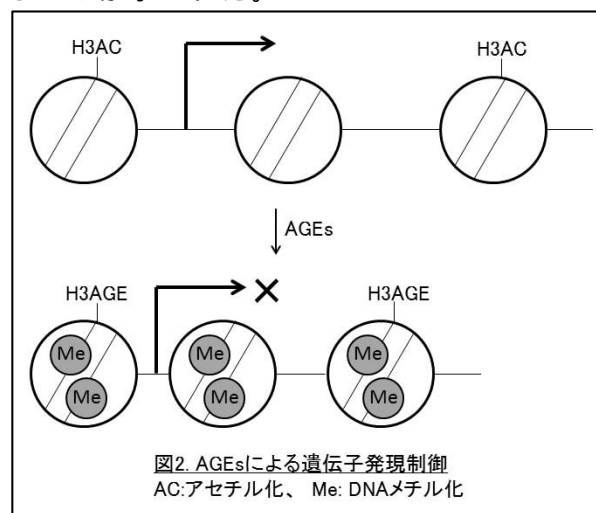


図2. AGEsによる遺伝子発現制御  
AC:アセチル化、Me: DNAメチル化

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は未だ解明されていない AGEs のエピジェネティクス遺伝子制御機構への関与を明らかにし、膀胱癌に対する新規抗癌療法を臨床応用するための基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかに

する。1)メトホルミン処理による細胞内 AGEs 量の変化。2)メトホルミン、5-aza-CdR 処理によるエピジェネティクス変化と遺伝子発現変化。3)膀胱癌において AGEs の標的となる遺伝子の同定 4) *in vitro* および *in vivo* での両薬剤の抗腫瘍効果 5)膀胱癌組織における AGE の発現と臨床病理学的因子の関連

膀胱癌は転移症例に対しては有効な治療法が確立されていない。メトホルミンの抗腫瘍効果の機序は明らかになっておらず、エピジェネティクスを介した遺伝子発現制御機構からのアプローチはこれまで報告がない。本研究でこの作用機序を明らかにすることで、メトホルミン、5-aza-CdR の併用が膀胱癌に対する新規抗腫瘍療法となる可能性を探索する。経口血糖降下剤としてのメトホルミンは重篤な副作用の頻度が低いため、5-aza-CdR との相乗効果が明らかになれば 5-aza-CdR を低用量とし、副作用を減じることが可能である。さらに、本研究は膀胱癌に対する新規抗腫瘍療法を探索するのみならず、酸化ストレスによるクロマチン構造の変化とエピジェネティクスによる遺伝子発現制御の機序の解明にもつながるものであり、医学・生物学に与えるインパクトは極めて大きいものと確信する。

### 3. 研究の方法

1)ヒストン H3K27 特異的に結合する AGE に対する抗体：抗 CMLH3K27 抗体の作成

エピジェネティクス遺伝子発現制御において、ヒストン 3 テール 27 番リジン残基 (H3K27) はメチル化、アセチル化のヒストン修飾によりクロマチンの開放および閉鎖を司り、直接的に遺伝子発現を制御することが知られている。また、カルボキシメチルリジン (CML) は長期的な酸化ストレスの指標となる AGE であることから、H3K27 特異的に結合する CML (CMLH3K27) に対するポリクローナル抗体を委託により作成する。抗 CMLH3K27 を以降の解析に用いることで、H3K27 におけるヒストン修飾の状態とクロマチン構造の変化、DNA メチル化および遺伝子発現を直接的に比較検討可能である。したがって、抗 CMLH3K27 抗体をウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法および免疫染色に使用できる至適条件の検討を進める。

2)メトホルミン、5-aza-CdR 処理によるクロマチン構造の変化と遺伝子発現の比較検討：AGEs によるクロマチン構造の変化および遺伝子発現と、メトホルミン、5-aza-CdR 処理により、クロマチン構造と遺伝子発現がどのように変化するかを申請者の仮説 (図 2) に従って *in vitro* で検討する。基本的な検討項目は表 1 の通りである。解析対象の細胞株は T24 (高悪性癌)、J112 (低悪性癌)、

処理	CML H3K27	H3K27修飾	クロマチン	DNA メチル化	遺伝子 発現
グリオキサール H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	上昇	⇒ CML結合	⇒ Close	⇒ 高メチル	⇒ なし
メトホルミン	減少	⇒ アセチル化	⇒ Open	⇒ 低メチル	⇒ あり

表 1. 図 2 の仮説に従った検討項目 HB/EpC (尿路上皮) とする。

処理：細胞内に酸化ストレス刺激 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を加える、あるいはメイラード反応の基質であるグリオキサールを加えることで細胞内 CML が上昇する。また、メトホルミン処理により CML は減少する。これらの処理に 5-aza-CdR 単独処理群とメトホルミン / 5-aza-CdR 併用群を作製し、以後の検討に使用する。

CMLH3K27 定量： の処理による CMLH3K27 の変化をウエスタンブロッティング法で定量する。CML の変化に伴うヒストン全体の変化をみるために、アセチル化ヒストン 3、およびヒストン 3 をウエスタンブロッティング法で同時に定量する。この検討により、AGE の変化に伴うアセチル化ヒストンの変化を明らかにできる。

H3K27 修飾：H3K27 特異的に生じるヒストン修飾をみる。H3K27 に生じるヒストン修飾の因子として、クロマチンを開放するアセチル化とモノメチル化、クロマチンを閉鎖するジ・トリメチル化をウエスタンブロッティング法で検討する。クロマチン閉鎖は CML の結合だけでなく、メチル化によっても生じるため、AGE によってクロマチン調節に関わる因子を総合的に検討する。

クロマチン開放/閉鎖：AGE とエピジェネティクスにより発現制御をうける遺伝子群、すなわち図 1 に示すシグナル経路上の遺伝子と、膀胱癌においてエピジェネティクス遺伝子発現制御を受けることが知られている *p16*、*PTEN*、*p53* 等の癌抑制遺伝子を対象とする。これらの遺伝子のプロモータ領域について、MNase 処理によるヌクレオソームの切断後、サザンブロッティング法でヌクレオソーム連鎖の状態を検出する。またこれらの遺伝子についてクロマチン免疫沈降法を用いて、アセチル化、メチル化等の修飾を受けた H3K27 に結合しているプロモータ領域を定量する。

DNA メチル化状態： の遺伝子群の DNA メチル化状態をパイロシーケンス法を用いて定量解析する。

遺伝子発現： の遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量する。

これらの検討により AGE によるクロマチン構造の変化と遺伝子発現の変化が明らかになり、メトホルミン、5-aza-CdR 処理により、それらがどのように変化するかが明らかになる。

3) *in vitro* におけるメトホルミン、5-aza-CdR 処理による抗腫瘍効果の検討：膀胱癌細胞株を用いて、メトホルミン、5-aza-CdR 処理による細胞増殖能の変化を MTT アッセイを用いて評価する。また、5-aza-CdR 単独処理と比較し、メトホルミン併用により低用量 5-aza-CdR の抗腫瘍効果を検討する。

4) *in vivo* におけるメトホルミン、5-aza-CdR 処理による抗腫瘍効果の検討：3)と同様に、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを作製し、*in vivo* での検討を行う。

5) 膀胱癌における CMLH3K27 の発現と臨床病理学的因子の検討：膀胱癌手術症例のパラフィン包埋切片を抗 CMLH3K27 抗体で免疫染色し、CML 発現と病理学的悪性度、予後との比較検討を行う。この検討により、AGE による遺伝子発現の変化が膀胱癌の臨床病理学的因子とどのような関連があるかが明らかとなる。

#### 4. 研究成果

平成 26 年度

1) 抗 CMLH3K27 抗体の作成：ヒストンテール 3 テール 27 番リジン残基に特異的に結合するカルボキシメチルリジン (CMLH3K27) のポリクローナル抗体を作成した。この抗体のウエスタンブロッティング、免疫染色、クロマチン免疫沈降法での至適条件を検討し、以降の実験に使用した。

2) メトホルミン、5-aza-CdR 処理によるクロマチン構造の変化：膀胱癌細胞株 T24 (高悪性癌)、J112 (低悪性癌) および尿路上皮細胞 (HB/EpC) を用い、p16 遺伝子のクロマチン構造と遺伝子発現を評価した。グリオキサール処理で AGE の濃度を上昇させると、3 種の細胞すべてで CMLH3K27 は上昇した。しかし H3K27 アセチル化は未処理と比較し、変化なく、5-aza-CdR 処理を加えても p16 遺伝子の発現に変化を認めなかった。一方、メトホルミン処理により CMLH3K27 は 3 種の細胞で変化しなかった。H3K27 アセチル化も未処理と比較し、変化なかった。5-aza-CdR 処理により、p16 遺伝子の DNA メチル化は約 30% 脱メチル化され、とくに T24 においては p16 遺伝子の発現上昇を認めた。細胞増殖能は 5-aza-CdR 単独と比較し、メトホルミン併用群で著明に抑制された。これらの結果より、メトホルミンはヒストン修飾を変化させるのではなく、直接的に DNA メチル化を低下させる作用を有することが推察される。また、*in vitro* ではメトホルミン単独での抗腫瘍効果はほとんど認めないが、固形腫瘍細胞に対しても 5-aza-CdR との併用で抗腫瘍効果が相乗することが示された。

平成 27 年度

平成 26 年度に作成した抗 CMLH3K27 抗体を用いて臨床試料の解析を行った。

1) 経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行した膀胱癌

80 例を対象とした。パラフィンブロックを用いて抗 CMLH3K27 抗体による免疫染色を行った。Ta (n=25)、T1 (n=50)、T2< (n=5) の比較検討では、高ステージの症例で有意に CMLH3K27 の発現が上昇した。また、グレード別の比較検討でも、高グレードの症例では発現は有意に高い結果となった。2) p16 遺伝子発現を免疫染色にて検討した。高ステージ、高グレードの主要で p16 遺伝子の発現は有意に低下した。また CMLH3K27 と p16 の発現は有意に逆相関した。3) さらに、ヒストン修飾と p16 遺伝子発現の相関を検索する目的で、抗 H3K9m3 抗体を用いた免疫染色を行った。上記結果と同様に、H3K9m3 の発現は高ステージ、高グレードの腫瘍で低下し、また H3K9m3 の発現は CMLH3K27 と有意に相関し、p16 遺伝子の発現とは有意に逆相関した。4) 上記症例の腫瘍組織より DNA を抽出し、p16 遺伝子の DNA メチル化レベルを定量解析した。P16 遺伝子の DNA メチル化レベルは高ステージ、高グレードの腫瘍で有意に低下し、免疫染色による発現と相関した。これらの結果より、臨床試料においては高ステージ、高グレードの膀胱癌組織で CMLH3K27、p16 発現、p16 の DNA メチル化レベルの変化が相関することが示された。

平成 28 年度

1) *in vivo* での検討：ヌードマウス xenograft モデルを用いてメトホルミン、5-aza-CdR 処理による抗腫瘍効果の検討を行った。5-aza-CdR 処理による抗腫瘍効果は認めしたが、メトホルミン併用による抗腫瘍効果は 5-aza-CdR と比較し有意差は認めなかった。

#### 5. 主な発表論文等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 羅奕 (Ra I)

奈良県立医科大学・分子病理学・博士研究員  
研究者番号: 30633797