The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	糖尿病治療薬メトホルミンに抗腫瘍効果はあるのか？
Author(s)	横山, 晴香
Citation	平成30年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2019
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/71947
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　薬学部　採択番号　No.1

平成３０年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏　　名	よこやま　はるか 横山　晴香	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	３年
ふりがな 共　同 研究者氏名	おくざわ　まさき 奥澤　正樹	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	３年
	とだ　はるか 戸田　明伽		薬学部 薬学科		３年
	みやもと　まゆ 宮本　真由		薬学部 薬学科		３年
	よしだ　まり 吉田　茉莉		薬学部 薬学科		３年
アドバイザー教員 氏名	前田　真一郎	所属	薬学研究科		
研 究 課 題 名	糖尿病治療薬メトホルミンに抗腫瘍効果はあるのか？				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				

【研究背景】

私たちは薬理学や薬物治療について学ぶなかで、古典的な糖尿病治療薬であるビグアナイト系薬メトホルミンが近年見直されてきていることを知り、特に、メトホルミンを服用した癌患者さんの予後が良好であることに興味を持った。文献調査を行ったところ、肺癌において、上皮成長因子受容体（EGFR）変異陰性の肺癌細胞には本来 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の治療効果は得られにくいにも関わらず、メトホルミンとの併用によって EGFR-TKI の感受性が亢進するとの興味深い報告がなされていた[1]。私たちの研究室では、EGFR 変異陽性ヒト肺癌細胞由来の EGFR-TKI 耐性株が樹立されており、本耐性株におけるメトホルミンの効果及び併用効果のメカニズムを解明する目的で本研究を行うこととした。

【研究目的】

本研究では全癌種の中でも最も死亡率の高い肺癌に着目し、癌細胞におけるメトホルミンの効果を明らかにするために以下の目的を設定した。

（１）メトホルミンの細胞障害性及びメトホルミンと EGFR-TKI の併用効果を検証する。

（２）メトホルミンの抗腫瘍メカニズムを解明する。

【研究方法】

本研究では EGFR の exon19 欠失変異（del E746-A750）を有するヒト肺腺癌細胞 PC9 と、本研究室で樹立したエルロチニブ耐性株 PC9ER を用いることにした。

（１）PC9 と PC9ER にメトホルミンや EGFR-TKI（エルロチニブ）を添加し、MTT アッセイ法を用いてメトホルミン感受性の評価及びエルロチニブとの併用効果の検証を行った。

（２）PC9 と PC9ER にメトホルミンやエルロチニブを添加し、各条件における生存シグナルをウエスタンブロット法で検出して、抗腫瘍メカニズムの解明を試みた。

【研究結果】

（１）メトホルミンは PC9、PC9ER の両方に対して細胞障害性を示した

PC9 及び PC9ER にメトホルミン（1mM）のみ、エルロチニブ（5μM）のみ、またはその両方を添加して培養した。3 日後 MTT アッセイ法を用いて各条件での細胞生存率を測定した（図１）。エルロチニブ単独では、PC9 に比べて PC9ER の生存率が有意に高いことから、PC9ER がエルロチニブ耐性を獲得していることが確認できた。また、いずれの細胞においても、メトホルミン単独処置によって生存率が低下し、メトホルミンの細胞障害性が得られた。特に PC9ER において、エルロチニブ単独添加時に比べ、メトホルミンとエルロチニブ併用によって生存率がより低下する傾向にあった。このことから、メトホルミン自体が抗腫瘍効果を持つことに加え、メトホルミンがエルロチニブ効果を増強している可能性も考えられた。

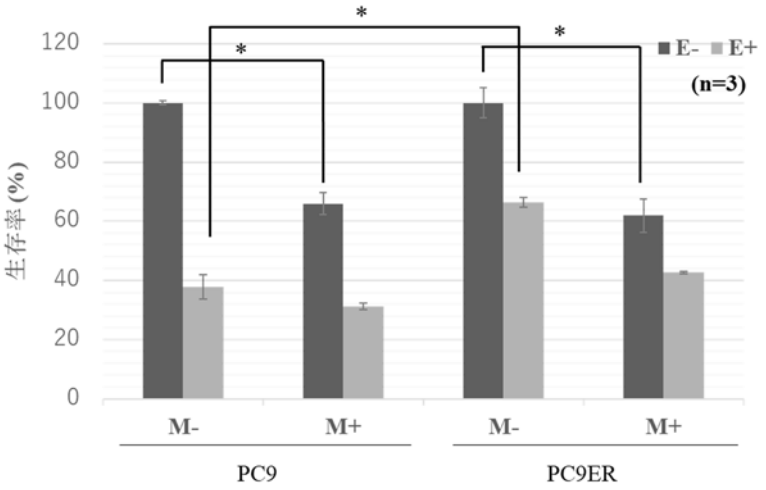

図１　メトホルミンやエルロチニブ添加後の PC9、PC9ER 生存率
PC9、PC9ER にメトホルミン（M と表記、1mM）やエルロチニブ（E、5μM）を添加したのち、3 日後に MTT アッセイ法を用いて生存率を算出。*p<0.05、Tukey 検定

（２）メトホルミンは MAPK/Erk 経路を阻害することにより細胞増殖を抑制する

次に、PC9 や PC9ER の培地にメトホルミン（5mM）及びエルロチニブ（5μM）を添加して 3 時間後にタンパクを回収し、各条件下での生存シグナルをウエスタンブロット法で検出した（図 2）。

◆　PC9 と PC9ER ともに、エルロチニブ添加によって p-EGFR は明らかに減少した。EGFR は成長因子 EGF の結合を受けて活性化するチロシンキナーゼ型受容体で、細胞増殖などのシグナルを伝達する。エルロチニブは EGFR の ATP 結合部位に結合することでリン酸化を抑制し、細胞増殖を抑えるチロシンキナーゼ阻害剤であるため、この結果から、両細胞に対してエルロチニブが正常に作用していることが確認できた。なお、PC9ER のエルロチニブ耐性は、EGFR 自体の安定化といった機序ではないことが示唆された。

◆　メトホルミンは、インスリンを介さずに血糖を降下させるビグアナイド系経口血糖降下剤であり、2 型糖尿病の治療薬として用いられる。AMP キナーゼ（AMPK）の活性化を介して糖新生や脂肪合成を阻害し、筋肉へのブドウ糖の取り込みを促進して消化管でのグルコース吸収を抑制する。PC9、PC9ER にメトホルミンを添加すると、AMPK のリン酸化の亢進が認められた。これより、両細胞においてメトホルミンの作用発現が確認された。

◆　続いて、EGFR-TKI 耐性に関連する各種シグナル（p-Erk、p-Akt）、及び受容体（p-Met）について検討を行った。EGFR シグナル伝達の一環として、EGFR のリン酸化により MAPK/Erk 経路が

活性化することが知られている。エルロチニブは EGFR のリン酸化を阻害することから、エルロチニブの添加により p-Erk は減少すると予想した。実際、PC9 においてはその傾向を認めたが、PC9ER は Erk のリン酸化が著明に増大しており、エルロチニブ投与の影響を受けなかった。これは P-Erk が PC9ER のエルロチニブ耐性に関与している可能性が考えられる。さらに、メトホルミン添加は PC9ER における p-Erk の上昇を抑制した。これより、メトホルミンは PC9ER に対して、MAPK/Erk 経路を阻害することにより細胞障害性を持つと考えられる。なお、Akt や Met も PC9ER においてリン酸化の増大を認めたが、メトホルミンの効果は得られなかった。

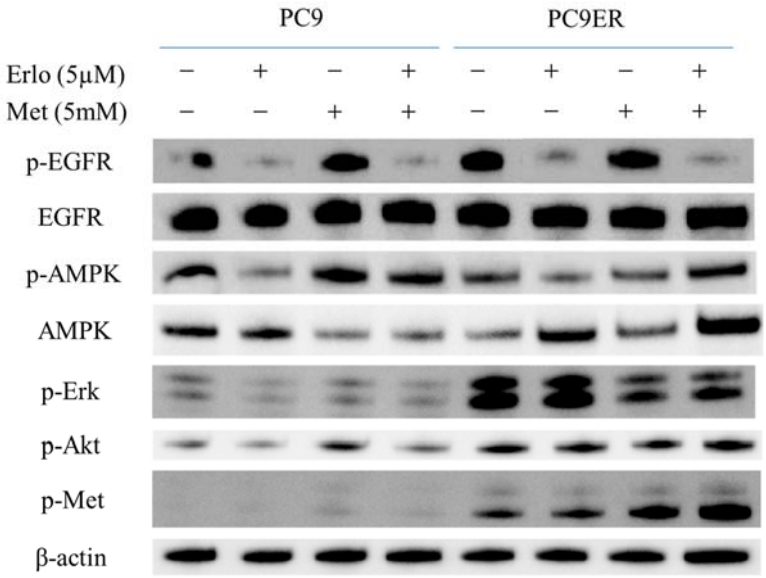

図２　メトホルミンやエルロチニブを添加し培養した PC9、PC9ER の生存シグナル
PC9、PC9ER をメトホルミン（Met と表記、5mM、3h）やエルロチニブ（Erlo、5μM、3h）の条件下で培養し、生存シグナル p-EGFR、p-AMPK、p-Erk、p-Akt、p-Met をウエスタンブロット法で検出。

【考察・今後の展望】

本研究より、EGFR 変異陽性のヒト肺癌細胞 PC9 に対してメトホルミンが細胞障害性を持つことが明らかとなった。また、EGFR 変異陽性の EGFR-TKI 耐性肺癌細胞 PC9ER に対しても、メトホルミンと EGFR-TKI の併用が有効であることが明らかになった。そのメカニズムとして、メトホルミンがエルロチニブ耐性の原因の一つとされる MAPK/Erk 経路の活性化[2]を阻害することが考えられる。MAPK/Erk シグナル経路は細胞増殖や分化に関わる経路であり、低分子 GTP 結合タンパク質などを介して活性化された Erk は、標的タンパク質を制御して、遺伝子発現に関わる転写因子をリン酸化する。メトホルミンあるいは AMPK と MAPK/Erk との関連性は詳細には解明されておらず[3]、メトホルミンの抗腫瘍効果については今後さらなる検討が必要である。本研究が、メトホルミンを用いた新たな癌治療法を生み出す一助となることが期待される。

【参考文献】

1．Xiaofei Wang, Keqiang Chen, Ying Yu, Yi Xiang, Jae Hong Kim, Wanghua Gong, Jiaqiang Huang, Guochao Shi, Qingyun Li, Min Zhou, Thomas Sayers, Poonam Tewary, Beili Gao and Ji Ming Wang. Metformin sensitizes lung cancer cells to treatment by the tyrosine kinase inhibitor erlotinib. Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 65), pp: 109068-109078

2．Zhang L, Huang Y, Zhuo W, Zhu Y, Zhu B, Chen Z.　Fisetin, a dietary phytochemical, overcomes Erlotinib-resistance of lung adenocarcinoma cells through inhibition of MAPK and AKT pathways. Am J Transl Res. 2016 Nov 15;8(11):4857-4868. eCollection 2016.

3．Carminia Maria Della Corte, Vincenza Ciaramella, Concetta Di Mauro, Maria Domenica Castellone, Federica Papaccio, Morena Fasano, Ferdinando Carlo Sasso, Erika Martinelli, Teresa Troiani, Ferdinando De Vita, Michele Orditura, Roberto Bianco, Fortunato Ciardiello, Floriana Morgillo. Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitors through GLI1 downregulation in LKB1 positive human NSCLC cancer cells. Oncotarget. 2016; 7:4265-4278.