

氏 名	高橋 顕雅
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第730号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. (メトホルミンは細胞周期の停止およびオートファジーとアポトーシスの作用により子宮内膜癌細胞株の増殖を抑制する)
審査委員	主査 教授 河内 明宏 副査 教授 村田 喜代史 副査 教授 依馬 正次

論文内容要旨

※整理番号	737	(ふりがな) 氏名	たかはし あきまさ 高橋 顕雅
学位論文題目	Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis (メトホルミンは細胞周期の停止およびオートファジーとアポトーシスの作用により子宮内膜癌細胞株の増殖を抑制する)		
<p>【背景と目的】</p> <p>近年、食生活の欧米化に伴い、子宮内膜癌の発生頻度は、欧米諸国と同様に日本においても年々増加傾向にある。子宮内膜癌患者の3~14%は40歳以下と報告されており、特徴としては肥満、2型糖尿病、多嚢胞性卵巣症候群などが挙げられる。比較的早期癌患者が多く、子宮全摘出術を施行することによりほとんどの症例において治癒が可能であるが、一方で、挙児希望を持つ患者も多く、妊孕性温存を考慮した治療の選択が必要である。現在、妊孕性温存治療として、酢酸メドロキシプロゲステロンを使用しているが、肥満患者も多く、肺塞栓症のリスクが上昇することもあり、使用を控えなければならないことも多く、また、奏効率も50%程度とそれほど高くなく、更なる奏効率の高い、安全な治療法の開発が待たれる。</p> <p>2型糖尿病治療薬であるメトホルミンは、他の癌腫において腫瘍抑制効果を認めると報告されており、子宮内膜癌においても、AMPK-mTOR経路を介してアポトーシスを誘導することにより腫瘍増殖抑制効果を発揮することが知られている。しかし、そのメカニズムについては不明な所も多い。近年、細胞の自食作用であるオートファジーが腫瘍細胞増殖抑制メカニズムとして注目されている。そこで、われわれはメトホルミンによる子宮内膜癌増殖抑制効果を若年子宮内膜癌細胞株で検討し、腫瘍増殖抑制メカニズムとしてのオートファジーの役割を検討することとした。</p> <p>【方法】</p> <p>子宮内膜癌の類内膜腺癌 Grade1 である Ishikawa 細胞株を用いた。Ishikawa 細胞株にメトホルミンを各種濃度で添加し、WST-8 assay、colony forming assay により細胞増殖抑制効果を検討した。Flow cytometry で細胞周期、アポトーシス、ミトコンドリア膜電位、acidic vesicular organelle の解析を行った。細胞周期 (p53、p21)、アポトーシス (Bax、Bcl-2)、オートファジー (LC3B、p62、Beclin-1) 関連タンパクの発現変化を western blotting 法で検討した。caspase-3/7、-8、-9 は ELISA 法にて検討した。また 3-methyladenine (3MA)、chloroquine (CQ) と併用処理、あるいはオートファジー主要調節因子の beclin-1 を siRNA で発現抑制し、オートファジーを抑制し、増殖抑制効果、アポトーシスの解析を行った。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

【結果】

メトホルミンは濃度依存的、時間依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。48 時間での IC50 値は 6.78mM であった。細胞周期解析を行ったところ濃度依存的に S 期の低下、G2/M 期の増加を認めた。p21 の上昇、p53 の低下を認めた。p53 非依存的に細胞周期の停止が起こっていることを示した。また、メトホルミンは濃度依存的に AnnexinV 陽性細胞の増加を認め、ミトコンドリアの膜電位の低下が認められた。Bax/Bcl-2 比は上昇しており、Caspase-3/7、-8、-9 すべてにおいて濃度依存的に活性が上昇していたことから、extrinsic および intrinsic pathway においてアポトーシスを誘導することがわかった。

次にメトホルミンは濃度依存的に赤色/緑色比の上昇を呈し、Western blotting 法においても濃度依存的に LC3BII/LC3BI の増加、p62 の低下を認めていた。オートファジーを誘導していることを証明した。オートファジー阻害剤である 3MA と CQ を添加することにより Cell viability の上昇、AnnexinV 陽性細胞数の低下、Caspase3/7 活性の低下、CleavedPARP の発現低下を認めた。オートファジーの主要調節因子である Beclin-1 をノックダウンしても同様の結果が得られた。以上よりメトホルミンにおける子宮内膜癌細胞株に対するオートファジーの作用は殺細胞的であることが示唆された。

【考察】

2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンが様々な癌腫で抗腫瘍効果を認めるという報告がされ、オートファジーとの関連についても議論されている。しかし、オートファジーの効果は、細胞保護的、あるいは殺細胞的と相反する作用を持ち合わせており、子宮内膜癌に関しては検討されていなかった。本研究において、メトホルミンの子宮内膜癌細胞株に対する抗腫瘍効果を発揮するメカニズムは、細胞周期の停止、アポトーシスによる殺細胞効果と合わせて、オートファジーが関与していることを示し、さらにオートファジーがアポトーシスを増強することによって、殺細胞的に作用していることを示した。多嚢胞性卵巣症候群において、メトホルミンが排卵を改善させるということはすでにわかっており、卵巣機能を低下させることなく、抗腫瘍効果を発揮することができる有力な薬剤になると考えられる。

今回の検討は *in vitro* での検討であり、*in vivo* での検討を今後加える必要がある。

【結論】

Ishikawa 細胞株において、メトホルミンは G2/M 期において細胞周期の停止をし、オートファジーとアポトーシスの両者を誘導することにより細胞増殖を抑制していることを示した。メトホルミンが子宮内膜癌に対する有効な治療薬になりうるとともに、オートファジーを誘導することが子宮内膜癌の有効な治療になる可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	737	氏名	高橋 顕雅
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンが早期子宮体癌細胞株に対して増殖抑制効果を示すことは過去の報告ではわかっていたが、その作用機序におけるオートファジーの関与について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) メトホルミンは WST8 assay、Colony formation assay を用い、時間依存性、濃度依存性に増殖抑制効果を示した。</p> <p>2) メトホルミンは 10mM 以上でカスパーゼ-3/7、-8、-9 の上昇を認め、内因系および外因系経路の両方を介し、アポトーシスを誘導することを示した。</p> <p>3) メトホルミンは、5mM 以上でアクリジンオレンジ染色で赤色光の増強、Western blotting 法で LC3BII の上昇、p62 の低下を認め、オートファジーを誘導することを示した。</p> <p>4) オートファジーを 3 メチルアデニンで阻害するとアポトーシスの一部を抑制することを示し、オートファジーのレギュレーターである Beclin1 を siRNA でノックダウンしてもアポトーシスの一部を抑制することを示したことから、メトホルミンにおけるオートファジーの効果は殺細胞的に働いていることを示した。</p> <p>本論文は、メトホルミンの子宮体癌細胞株に対する増殖抑制効果の作用機序にオートファジーが関与しているという新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 534 字)</p>			
(平成 27 年 1 月 29 日)			