

氏 名 つつみ ようこ
堤 陽子

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1608 号

学位授与の日付 平成 28 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Combined Treatment with Exendin-4 and Metformin Attenuates Prostate
Cancer Growth
(GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 とメトホルミンの併用は前立腺癌を抑制
する)

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	柳瀬 敏彦
（副査）	福岡大学	教授	田中 正利
	福岡大学	教授	白澤 専二
	福岡大学	准教授	石井 龍

博士学位申請論文内容の要旨

博士学位申請論文名

Combined treatment with Exendin-4 and metformin attenuates prostate
cancer growth

(日本語訳)

GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 とメトホルミンの併用は前立腺癌を抑制する

博士学位申請論文キーワード

Prostate cancer	Exendin-4
Metformin	AMPK
Cell proliferation, apoptosis	

博士学位申請者氏名

堤 陽子

(平成 27 年 10 月 9 日提出)

【目的】

糖尿病患者の治療目標は、患者の生活の質を改善し余命を延長することにある。従って、ただ単に血糖を下げるのみならず、これらを目標とした治療選択が望まれる。我々は GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4 (Ex-4) が、血糖降下作用とは独立してアテローム病変形成抑制や (Diabetes 2010)、血管傷害後の新生内膜形成抑制 (BBRC 2011) に働き、直接的な血管保護作用を有することを報告してきた。

一方、わが国の 2 型糖尿病患者の主たる死因は癌であり、抗糖尿病薬の癌に対する作用が最近注目されている。我々は Ex-4 が GLP-1 受容体を介して前立腺癌細胞増殖を抑制することを見出し報告した (Diabetes 2014)。また、メトホルミン (Met) の抗癌作用が既に知られており (Eur J Cancer 2010/2014、PLOS ONE 2013)、今回 Met の前立腺癌に対する作用について、Met および Ex-4 と Met 併用での検討を行った。

【対象と方法】

6 週齢の非糖尿病雄ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞株である LNCaP を播種させ、6 週間 Ex-4 単独持続皮下投与 (300pmol/kg BW/day)、Met 経口投与 (750mg/kg BW/day)、Ex-4 と Met 併用投与を行い、12 週齢時に血清グルコース、PSA、インスリン値測定を行い、腫瘍切片作成し各種免疫染色 (GLP-1R、P504S、Ki67、AR、pAMPK α) および TUNEL アッセイでのアポトーシス検出を行った。

また *in vitro* では、ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、PC3、DU145 に、Met 0.1mM、1mM、10mM もしくは、Ex-4 10nM、Met 0.1mM、Ex-4 10nM+Met 0.1mM を添加し、細胞増殖を BrdU アッセイにて検討した。機序解明のため、併用で AMPK 阻害剤である Compound C 0.1 μ M 添加もしくは siRNA での AMPK ノックダウンを行い、同様に細胞増殖を BrdU アッセイ検討を行った。LNCaP については更に TUNEL アッセイにてアポトーシス検出と、ウエスタンブロットで p-mTOR、p-AMPK α 発現について検討した。また細胞遊走アッセイについても LNCaP と PC3 で検討を行った。

【結果】

Ex-4 と Met は *in vivo* において前立腺癌増殖を相加的に抑制する

腫瘍径はいずれも対照群に比して縮小し、Ex-4 と Met の併用は相加的に腫瘍径を有意に縮小した。体重および血糖値は Met 使用群で低値、PSA は Ex-4 および Met いずれにおいても低下した。インスリン値は Ex-4 使用で上昇したが、Met と併用することで対照群レベルまで低下した。

Ex-4 と Met は細胞増殖を抑制し GLP-1R 発現を高める

腫瘍の免疫染色では、細胞分裂のマーカーである Ki67 および前立腺癌のマーカーである P504S はいずれの群においても有意に低下した。ただし、併用群での相加的な低下はみられなかった。興味深いことは、Ex-4 および Met 投与により腫瘍での GLP-1R 発現上昇がみられたことで、併用群においては有意差を認めた。腫瘍内の AR 陽性細胞も確認したが、変化は認められなかった。

Ex-4 と Met は前立腺癌細胞増殖を抑制はするが、細胞遊走は抑制しない

LNCaP、PC3、DU145 細胞いずれにおいても Met 用量依存性に有意に細胞増殖が抑制され、Ex-4 との併用でも有意な増殖抑制を認めた。LNCaP、PC3、DU145 いずれの細胞株においても Ex-4 と Met により BrdU の取り込みが抑制され、DNA 合成が抑制されていることが分かった。また、併用では相加的に DNA 合成を抑制した。遊走能は、LNCaP においては抑制が認められず、PC3 では有意ではないがわずかに低下傾向を示していた。

Met は前立腺癌細胞において、AMPK 活性を介してアポトーシスを誘導し、細胞増殖抑制をもたらす

Ex-4 単独投与ではアポトーシスは認められなかったのに対し、Met 投与では確認できた。

Met 投与によって AMPK のリン酸化が認められ、AMPK のノックダウンや阻害剤 (Compound C) を投与する事によって Met の細胞増殖抑制作用がキャンセルされる事から、Met の細胞増殖抑制作用は AMPK を介している事が分かった。さらに、AMPK の下流に位置する mTOR のリン酸化も Met によって抑制されていた。

Met は in vivo での前立腺癌において AMPK 活性とアポトーシスを誘導する

腫瘍切片においても、Met 投与で AMPK リン酸化の有意な上昇が免疫染色で認められ、Ex-4 投与ではアポトーシスが誘導されず、Met 投与においてはアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

【結論】

Ex-4 と Met は前立腺癌細胞増殖を in vitro 及び in vivo で有意に相加的に抑制することが示唆された。その機序として、Ex-4 が細胞分裂を抑制する一方で、Met がアポトーシスを誘導し、AMPK 活性を介して LNCaP 細胞増殖を抑制することが分かった。また、インスリンが前立腺癌において growth factor の一つとして働くことから (J Biol Chem 2007)、Ex-4 投与により上昇するインスリン値が Met 併用により対照レベルまで低下することで相加的に腫瘍を縮小させ得ると考えた。さらに、Ex-4 および Met は GLP-1R 発現を上昇させる事が報告されており (J Am Soc Nephrol 2007、Diabetologia 2011)、併用による有意な GLP-1R 発現上昇が更なる腫瘍縮小に寄与した可能性も考えられた。近年発表されたアメリカ糖尿病学会および欧州糖尿病学会の 2 型糖尿病薬物療法の推奨アルゴリズムにおいても、Met は 2 型糖尿病治療における第一選択薬とされ、GLP-1R 作動薬や DPP-4 阻害薬のようなインクレチン関連薬との併用が第二選択薬に推奨されており、実臨床では低血糖や体重増加といったリスク軽減も期待できるものである。今回のような研究により、両剤の併用が抗癌作用という新たな作用も併せ持つ可能性が示唆され、糖尿病診療において有益なものになり得ると考える。

本論文はメトホルミン (Met) と GLP-1 作働薬の Exendin 4 (Ex-4) が、前立腺癌細胞増殖を抑制することを *in vivo* 及び *in vitro* の系で明らかにした。すなわち、Ex-4 と Met はヌードマウスに前立腺癌細胞株の LNCaP 細胞を播種させて作成した担癌マウスの前立腺癌増殖を相加的に抑制することを示した。一方、Ex-4 と Met は前立腺癌細胞増殖を *in vitro* の培養細胞系においても有意に相加的に抑制することを示した。これらの機序として、Ex-4 が細胞分裂を抑制する一方で、Met がアポトーシスを誘導し、AMPK 活性を介して LNCaP 細胞増殖を抑制することを明らかにした。また、インスリンが前立腺癌において腫瘍増殖因子として作用することから、Ex-4 投与により上昇するインスリン値が Met 併用により対照レベルまで低下することで相加的に腫瘍を縮小させる機序並びに Ex-4 および Met 併用による有意な GLP-1R 発現上昇が更なる腫瘍縮小に寄与した可能性も提示した。

1. 斬新さ

本論文はメトホルミン (Met) と GLP-1 作働薬の Ex-4 が、前立腺癌細胞増殖を抑制することを *in vivo* 及び *in vitro* の系で明らかにした、はじめての論文である。

2. 重要性

我が国における 2 型糖尿病の最大の死因は癌であり、抗糖尿病薬の中では、Met の抗癌作用が示唆されている。近年発表されたアメリカ糖尿病学会および欧州糖尿病学会の 2 型糖尿病薬物療法の推奨アルゴリズムにおいても、Met は 2 型糖尿病治療における第一選択薬とされ、GLP-1R 作働薬や DPP-4 阻害薬のようなインクレチン関連薬との併用が第二選択薬に推奨されている。今回のような研究により、実臨床に沿った両剤の併用が抗癌作用という新たな作用も併せ持つ可能性が示唆され、糖尿病診療において有益なものになり得ると考える。

3. 実験方法の正確性

細胞増殖、アポトーシス、細胞遊走能、組織免疫染色、シグナル系解析、動物研究など本研究の遂行に必要な *in vivo*, *in vitro* の様々な研究手法が適切に選択され、実施に際しては既報の方法に準拠し、正確に解析された。それにより現象の発見のみならず、機序の解明に至る研究が達成された。

4. 表現の明確性

各実験方法と結果については、項目立てし、わかりやすく提示してあり、論理的構成となっている。表現の明確性は保たれている。

5. 主な質疑応答

Q: まず基礎の確認として、AMPK と ACC の関連について述べてください。

A：AMPK が活性化されると ACC 活性が低下し、マロニル CoA の濃度を減少させ、それにより脂肪酸が CTP1 を介してミトコンドリア内へ取り込まれ、燃焼し、インスリン感受性の亢進へとつながる。

Q：腫瘍体積は投薬で確かに有意に低下しているが、重量が Ex-4・メトホルミン投与群で有意には低下していないので、あまり効果としては大きくなかったのではないか。

A：重量は保ったままサイズだけ小さくなったのかははっきりしないが、PSA の低下から見て腫瘍部分の縮小はあると予想される。

コメント：病理切片を見るとよかったのではないか。

Q&コメント：コントロール群と比較して、メトホルミン群・併用群でマウスの体重 5g も減少しており、割合にして 20%もの低下になるので、ここまで体重減量させて実験を行ってよいのだろうか。癌を専門に研究をしている者としては気になる。

Q：LNCaP を埋め込まない状態で同様に投薬を行ってもこのような体重減量が見られるのか。

A：腫瘍植え込み無しでのコントロール群を設定していなかったもので、これもはっきりしないが、メトホルミンはインスリン抵抗性を改善するのみで、おそらくここまでの体重減量は来さないと思う。

コメント：CT など画像検査を用いて、どこの部分が体重減量につながったのかを見るのがよいのではないか。

Q：腫瘍植え込みと同時に投薬を行っているが、腫瘍形成後の方がよかったのではないか。

A：その研究は行っていない。確かに、腫瘍形成させた後に投薬を行うという実験デザインのほうが実際の薬剤効果だけを見ていることになるかもしれない。

Q：マウス 12 週齢でデータを見ているが、途中の時系列はみていないのか。

A：全て途中でも時系列でデータをとっています。

Q：メトホルミンのマウス血中濃度はどの程度だったのか。

A：*in vitro* では生理的濃度となる量を使用したが、*in vivo* ではヒトでの約 30 倍の量を用いており、その際の血中濃度はメトホルミンの製薬会社へ問い合わせても論文化されたものは無いとのことだった。非公開データとしてはいくつかの用量に対する血中濃度が設定してあったが、今回の値がヒト血中濃度と比較してどの程度になるかは換算しての推測になる。申し訳ないがこの場ではっきり覚えていない。

Q: *in vitro* のメトホルミン投与量は 1mM 未満の μM 量での使用が適当で、今回の 1mM、10mM というのは多すぎるのでは無いか。

A: 抗癌作用でのメトホルミン *in vitro* 実験では、他の論文では 20mM などもっと高容量の設定が多く、今回の設定は他論文と比べるとむしろ少ないくらい。多量に必要とする理由として、細胞ではピグアナイドを輸送する OCT 1 が低下しており、取り込みが難しいため高容量設定となるという報告がある。

Q: Fig4E の増殖曲線で Compound C (AMPK 阻害剤) 処置でのコントロール・メトホルミン添加群のほうが、無処置でのコントロール・メトホルミン添加群よりも増殖が抑制されており、それでは AMPK 活性が腫瘍増殖を抑制するという今回の結論に反するデータとなるのではないか。

A: Compound C は毒性が強いためと思われる。濃度設定の際にも当初はもう少し高用量でやっていたが、Compound C 処置後、24hr 後には細胞がほぼ全て死滅してしまうような状況であった。そのため濃度の条件検討を行い今回の $0.1\mu\text{M}$ としたが、それでも細胞毒による死滅の影響で細胞数が減っていると考える。増殖抑制されているわけではない。

Q: ヒト前立腺癌組織で GLP-1R が癌細胞に特異的に発現しているということだったが、その意味は何と考えるか。

A: GLP-1R 発現が癌化へ影響しているのではないかという考えもあるかと思うが、必ずしもそうとは言い切れない。報告では GLP-1R に働くインクレチンにより、ヒト・マウスでの甲状腺細胞に癌促進的に働くというデータもあるが、インクレチンの抗癌作用の報告の方が多し。ヒトやマウスで乳癌・胆管癌・膵癌・大腸癌などにおいて cAMP 上昇などの機序での増殖抑制やアポトーシスをもたらす事などが言われている。各臓器での GLP-1R 発現については、Ex-4 が腎糸球体皮質や網膜細胞において発現を上昇させることや、メトホルミンが PPAR α を介して発現上昇させることなどは現象としてみられている。

コメント: 今後は免疫系からみた全身的な視点からも検討すると良いと思う。

Q: とても効果が出ていると思うが、血中テストステロン値はどうだったのか。

A: 今回テストステロン、DHT 等のデータは取っておらず、PSA のみを見た。

Q: 去勢抵抗性の前立腺癌で使用できるのではないか。

A: アンドロゲン受容体発現への関与がないというデータも出たことから、そのような症例に検討してもよいのではないかと考える。糖尿病のある患者で前立腺癌の現在の標準治療となっている抗アンドロゲン剤との併用などは、倫理的には問題が少ないと思わ

れる。*in vitro*ではそのような検討報告も既に出てきている。

Q：メトホルミンの観察研究のデータで各種癌発症を抑制するという事だったが、非糖尿病患者さんで用いることは検討しているか。

A：現在、非糖尿病状態でも抗糖尿病薬が使用できるのは α GIのベイスン剤のみのため、保険診療では行えないが、将来、何らかの形で臨床応用できればと考えている。

コメント：前立腺癌患者での臨床応用という点では、腫瘍形成させた後の投薬実験がやはり見てみたい。

Q：昨年群馬大の泌尿器科からも IGF-1 低下による前立腺癌増殖抑制の論文が出たと思うが、IGF-1 はどうか。

A：今回は IGF-1 値やその発現などは検討していない。血中インスリン値は低下していることから、IGF-1 も同様のデータになるのではないかと思う。

以上のように、質問にも的確に回答した。

本論文は、斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確性などから、学位論文に値すると評価された。