

氏名	いわや ちかよ 岩屋 智加予		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第 1766 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 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	Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates breast cancer growth by inhibiting NF- κ B activation (GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 は NF- κ B の阻害を介して乳癌増殖を抑制する)		
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	岩本 隆宏
	福岡大学	教授	小林 邦久
	福岡大学	准教授	角田 俊之

内容の要旨

【目的】

糖尿病治療の目標は、患者の生活の質の改善や余命の延長にある。従って、血糖降下作用のみならず、合併症の発症進展を抑制し、この目標達成に寄与しうる治療選択が望まれる。我が国の2型糖尿病患者の死因第1位は癌であり、種々の疫学研究において、肥満や糖尿病患者では、癌の罹患率・死亡率が高いことが示されている。近年、GLP-1の臓器保護作用が血管保護作用を中心に報告されているが、糖尿病治療薬の癌に対する影響の研究は重要といえる。我々は、既報でGLP-1受容体作動薬Exendin-4(Ex-4)が前立腺癌を抑制することを報告し、GLP-1が癌抑制作用を有する可能性を提唱した (Diabetes 2014, PLOS ONE 2015)。一方、乳癌は糖尿病患者において1.2倍の発症率を認める癌であり、メタボリック症候群や肥満2型糖尿病との関連が注目されているが、乳癌に対するGLP-1作用の効果およびメカニズムは不明である。そこでGLP-1の乳癌における作用を検討した。

【対象と方法】

ヒト乳癌組織とヒト乳癌細胞株 MCF-7(エストロゲン依存性)、MDA-MB-231(エストロゲン非依存性)、KPL-1細胞(エストロゲン弱依存性)における GLP-1 受容体発現を免疫染色と定量的 RT-PCR を用いて検討した。Ex-4 による細胞増殖抑制作用を、成長曲線を作製し、検討した。BrdU アッセイで細胞分裂能を、TUNEL アッセイでアポトーシスを検討した。ウエスタンブロットや ELISA 法によるタンパク発現、定量的 RT-PCR による mRNA 発現、ルシフェラーゼアッセイを行い、乳癌における Ex-4 の細胞内増殖シグナルや増殖機序に与える影響について検討した。BALB/c ノードマウスにヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞を播種させ、Ex-4 を皮下に持続投与することで in vivo における癌抑制作用を検討した。

【結果】

ヒト乳癌組織とヒト乳癌細胞株に GLP-1 受容体が発現していることをタンパクレベルと RNA レベルで確認し、乳癌細胞株を 0.1~10nM の Ex-4 存在下で培養すると、用量依存性に有意に成長曲線が抑制されることが分かった。乳癌細胞における Ex-4 の増殖抑制作用は GLP-1 受容体アンタゴニスト Ex9-39 や GLP-1 受容体を siRNA でノックダウンすることでキャンセルされることから、GLP-1 受容体を介した作用であることが分かった。また Ex-4 は BrdU の取り込みを用量依存性に抑制したが、TUNEL 陽性細胞は認めなかったことから、Ex-4 は細胞増殖を抑制し、細胞死は促進していないことが分かった。Ex-4 によって MCF-7 細胞内の cAMP 濃度が有意に上昇したことから、Ex-4 は GLP-1 受容体の古典的経路を活性化していることが分かった。一方、Ex-4 は乳癌におけるエストロゲンの作用には関与していなかった。ヌードマウスに MCF-7 細胞を播種させ、Ex-4 を 9 週間持続皮下投与すると、形成される腫瘍の増大は有意に抑制された。ヌードマウスは非糖尿病状態であり、血糖値・体重・インスリン濃度には差を認めず、Ex-4 の乳癌抑制作用は糖代謝を介さない直接的な作用と考えられた。マウスに形成された腫瘍を細胞分裂増殖のマーカである Ki67 で免疫染色すると、Ex-4 によって Ki67 陽性細胞が約半分に抑制されており、*in vivo* においても乳癌細胞の分裂増殖を抑制することで腫瘍径の増大を抑制していることが分かった。一方、乳癌をはじめとした癌において、NF- κ B が恒常的に活性化し、癌細胞の生存や転移能、血管新生などを誘導して癌の進展に寄与していることが知られている。MCF-7 細胞を Ex-4 で刺激すると、NF- κ B (p65) の核内移行が有意に抑制され、転写活性の有意な抑制もルシフェラーゼアッセイを用いて認められた。乳癌における NF- κ B の標的遺伝子である IL-8、VEGF、COX-2 の発現が、Ex-4 によってタンパクレベル、RNA レベルともに有意に抑制された。同時に、Ex-4 は Akt のリン酸化を抑制し、I κ B α のリン酸化も抑制していた。以上より、Ex-4 は NF- κ B の抑制を介して乳癌の細胞増殖を抑制することが分かった。本研究は Ex-4 が *in vivo* と *in vitro* の両系において乳癌を抑制し、その分子生物学的機序を明らかにした最初の検討である。我々の既報である Ex-4 の前立腺癌抑制作用に加え、乳癌も抑制することが分かり、GLP-1 の作用が多種多様な癌を抑制する可能性が示唆された。

【結論】

乳癌に GLP-1 受容体が発現し、GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 は NF- κ B の阻害を介して乳癌の細胞増殖を抑制することが示された。

審査の結果の要旨

本論文は、手術後のヒト乳癌組織に GLP-1 受容体が発現していることを示し、糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬 Ex-4 がヒト乳癌細胞株においても血糖降下作用とは独立した乳癌抑制作用を有することを詳細なメカニズムとともに明らかにした論文である。

乳癌はわが国の女性で最も多い癌の一種で、糖尿病患者では約 1.2 倍の発症率を認め、メタボリック症候群や肥満 2 型糖尿病患者との関連が注目されている。そこで、乳癌における GLP-1 受容体の発現と Ex-4 の乳癌に対する作用を検討した。非糖尿病乳癌患者から摘出されたヒト乳癌組織およびヒト乳癌細胞株である MCF-7 細胞 (エストロゲン (E) 依存性)、MDA-MB-231 細胞 (E 非依存性)、KPL-1 細胞 (E 弱依存性) に、蛋白レベル、RNA レベルで GLP-1 受容体が発現していることを確認した。これらの乳癌細胞株を 0.1~10nM の Ex-4 存在下で培養すると、Ex-4 はエストロゲン作用とは無関係に用量依存性かつ有意に細胞数を成長曲線において抑制した。LP-1 受容体アンタゴニスト Ex9-39 の添加や siRNA を用いた GLP-1 受容体のノックダウンによって、Ex-4 の乳癌細胞増殖抑制作用が完全にキャンセルされることから、Ex-4 の乳癌細胞増殖抑制作用は GLP-1 受容体を介していることが明確になった。また、Ex-4 は BrdU の取り込みを用量依存性に有意に抑制したが、Tunel 陽性細胞を増やさないことから、乳癌細胞の細胞分裂増殖は抑制するが、アポトーシスの誘導はしないことが分かった。Ex-4 刺激によって MCF-7 細胞内の cAMP 濃度が有意に上昇していたことから、Ex-4 は GLP-1 受容体の古典的経路を活性化していることが分かった。次に Xenograft モデルを用いて *in vivo* の検証を行った。ヌードマウスの皮下に MCF-7 細胞を播種させ、Ex-4 を 9 週間持続皮下投与し、形成された腫瘍径はコントロールに比して有意に縮小されていた。さらに、腫瘍を摘出し細胞分裂増殖のマーカーである Ki67 で免疫染色すると、Ex-4 投与群で Ki67 発現は著明に抑制されており、*in vivo* においても乳癌細胞の分裂増殖を抑制することで、腫瘍径の増大を抑制していることが分かった。この時、マウスの体重、血糖値、血清インスリン値は両群間で差を認めなかった。NF- κ B は乳癌増大における重要な転写因子であることが知られている。MCF-7 細胞を Ex-4 で刺激すると、NF- κ B (p65) の核内移行が有意に抑制されることが ELISA 法で確認され、転写活性も有意に抑制されていることがルシフェラーゼアッセイを用いて認められた。乳癌における NF- κ B の標的遺伝子である IL-8、VEGF、cox-2 の発現が、Ex-4 によって蛋白レベル、RNA レベルともに有意に抑制されていた。また、Ex-4 は NF- κ B 活性化の上流に位置する Akt のリン酸化を抑制し、I κ B α のリン酸化も抑制した。以上より、乳癌に GLP-1 受容体が発現し、Ex-4 が NF- κ B の抑制を介して乳癌の増殖を *in vivo*、*in vitro* ともに抑制していることを明らかにした。

1. 斬新さ

本研究は GLP-1 受容体作動薬 Ex-4 の乳癌抑制作用を *in vivo*、*in vitro* 両系で立証

し、詳細な分子メカニズムも解明した世界で最初の報告である。

2. 重要性

研究の重要な点は、本来血糖降下作用を主目的として開発された GLP-1 受容体作動薬に血糖降下作用とは独立した乳癌抑制作用が認められる点である。非糖尿病モデルを用いて行われた研究であることから、非糖尿病患者の乳癌抑制に GLP-1 受容体作動薬が貢献しうる可能性も示唆している。さらに、この発見は、乳癌の発症進展を抑制するための糖尿病治療ストラテジー確立に大きく貢献するとともに、糖尿病や肥満と乳癌が併存しやすい両疾患の関連性を示唆する重要な報告でもある。

3. 実験方法の正確性

細胞培養、細胞や組織の免疫染色、細胞増殖アッセイ、アポトーシス、シグナル伝達経路の解析、動物実験といった複数の実験系を確立された方法に従い、正確な手技で施行されている。

4. 表現の明確さ

糖尿病および乳癌に対する十分な専門的知識や研究方法の正確さを背景に、論文は Abstract, Materials and Methods, Results, Discussion, Figure legends の各項目が理路整然と正確かつ明確に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q1 糖尿病患者ではその他の癌に比べて、乳癌はそんなに増えないと思うが、なぜ研究テーマに乳癌を選んだのか？

A1 女性医師であることから女性の健康に寄与できる研究テーマを希望した。

Q2 GLP-1 受容体の発現は、癌種によって比較したか？

A2 当科では乳癌以外にも、前立腺癌、肝癌、大腸癌においてみているが、GLP-1 受容体の発現量は癌腫によって異なる。

Q3 高インスリン血症、血糖との関連は？

A3 本研究では非糖尿病モデルで検討を行っており、in vivo ではコントロールと Ex-4 において、血糖・インスリン値に有意差はなく、血糖、インスリンとは無関係と考えている。

Q4 p53 や炎症性サイトカインはみてないのか？

A4 みていないが、抑制されているのではないかと考える。

- Q5 低容量の Ex-4 投与で臨床でも癌抑制はみられるのか？
A5 大規模臨床研究 LEADER 試験の副次評価項目では、GLP-1 受容体作動薬リラグルチドが私達の既報の前立腺癌を抑制したという報告があった。
- Q6 癌抑制を目指した場合の薬剤投与の設定方法はどうか？
A6 GLP-1 受容体作動薬は嘔気の副作用があり、高容量にすると嘔気の副作用が増強することが考えられ、難しいであろう。現行の皮下注製剤ではなく、直接、癌に投与・注入するなどが望ましいかもしれない。
- Q7 DPP-4 阻害薬でも同様の効果がおきるのか？
A7 本研究では DPP-4 阻害薬リナグリプチンにおいて Growth curve、BrDU assay で検討したが、乳癌抑制効果は認めなかった。おそらく、DPP-4 阻害薬は GLP-1 受容体作動薬と比べて、GLP-1 作用が弱いためではないかと考えられる。
- Q8 NF- κ B の下流の VCAM-1, ICAM-1 は検討していないのか？
A8 検討していない。
- Q9 Ex-4 は Akt をどのように抑制しているのか？
A9 それはよくわかっていない。
- Q10 糖尿病マウスに乳癌を播種して Ex-4 投与しインスリンを上昇させた場合、乳がん増殖を抑制するにはどうしたらいいと思うか？
A10 インスリン分泌を抑制する薬剤（メトホルミン、SGLT-2 阻害剤）を併用するのがよいと思われる。
- Q11 Fig. 1A 患者は正常者？
A11 非糖尿病の stage I の乳癌患者である。
- Q12 糖尿病ありなしで乳癌における GLP-1 受容体の発現の差は確認したか？
A12 糖尿病ありなしでは確認していない。今後検討する臨床意義は大きい。
- Q13 GLP-1 受容体の発現量と癌抑制の作用に関連はあるのか？
A13 関連あると考える。GLP-1 受容体のない癌細胞株は Ex-4 の効果乏しく、GLP-1 受容体を強発現させることで Ex-4 の癌増殖抑制効果が増強される。糖尿病感受性遺伝子で知られる TCF7L2 が膵 β 細胞において、GLP1 受容体の発現に関与していることが報告されており、現在、癌との関連性を研究中である。

- Q14 GLP-1 受容体発現の正常乳腺組織のデータはあるのか？
A14 本研究では正常組織を入手することができず、検討できていないが、正常乳腺組織には GLP-1 受容体は発現しないと報告されている。
- Q15 後半の研究で MCF-7 細胞を選んだ理由は？
A15 遺伝子レベルで GLP-1 受容体の発現が多かったことと、乳癌においてもっとも研究によく使用される一般的な乳癌細胞株であるためである。
- Q16 Fig. 1E で GLP-1 受容体を強制発現させたのは、単純に抗体の特異性の確認？
A16 リバイスの際に GLP-1 抗体の特異性について質問があったため、ご指摘のとおり、がん抗体の特異性の確認のためである。
- Q17 アポトーシスを誘導しないという結果を TUNEL assay でみているが、他のアポトーシスをみるような実験はしていないのか？
A17 FACS などはしていないが、ウェスタンブロットで Akt-mTOR シグナルを検討したが、変化なかった。
- Q18 Ex-4 投与濃度を上げたり、長期間 Ex-4 を投与するとアポトーシスは増えるのではないか？
A18 増えることが予測されるが、本研究はあくまでも現在使用されている糖尿病治療薬の Pharmacological dose で行った。
- Q19 NF- κ B と cAMP 上昇の関連をどのように考えるか？
A19 癌では報告はないが、喘息モデルマウスにおいて、Ex-4 が cAMP 上昇→PKA を介して NF- κ B を抑制するという報告があった。しかし、PKA から NF- κ B までの機序は分かっていない。
- Q20 Fig. 5I、5J の Western blotting の写真は再現性を確かめ、定量したのか？
A20 本文中に記載しているが、3 回定量したが、有意差はなく、抑制する傾向であったため、写真だけの掲載とした。

上記の何れの質問にも適切に回答した。

以上、審査の結果、本論文は学位論文に値すると判断された。