

氏名	たなか ゆき 田中 由貴		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1955 号		
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 13 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 glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 and metformin attenuates breast cancer growth (GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 とメトホルミンの併用による乳癌抑制作用の検討)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	佐藤 寿彦
	(副査) 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	福岡大学	准教授	石倉 周平

内容の要旨

【目的】

わが国の糖尿病患者の死因第 1 位は癌であり、糖尿病治療薬の癌に対する作用の研究は重要といえる。我々は既報において、前立腺癌で Exendin-4 (Ex-4) の GLP-1R を介した Erk-MAPK のリン酸化抑制とメトホルミン (Met) による高インスリン血症の改善を介した Erk-AMPK のリン酸化抑制、さらに Met の AMPK 活性化からアポトーシスの誘導により癌細胞増殖を抑制することを報告した。さらに、Ex-4 に乳癌抑制作用があるかを検討し Ex-4 は Akt、I κ B のリン酸化を抑制することで NF- κ B p65 の核内への移行を抑制し、NF- κ B の活性化を抑制することで乳癌を抑制することを見出し報告した。今回 GLP-1 受容体作動薬 Ex-4 と Met の併用における乳癌抑制作用について検討した。

【対象と方法】

エストロゲン高感受性の MCF-7 細胞、エストロゲン非依存性の MDA-MB-231 細胞、エストロゲン低感受性の KPL-1 細胞の 3 種類のヒト乳癌細胞株を用いて 10nM Ex-4 単剤、0.1mM Met 単剤、10nM Ex-4 と 0.1mM Met の併用存在下でそれぞれ 3 日間培養し、細胞数をカウントし増殖曲線を作成し、DNA 合成への関与を評価するために BrdU アッセイを行った。TUNEL アッセイ、MCF-7 細胞においてアポトーシス/ネクローシス アッセイを用いてアポトーシス誘導について検討し BCL-2 と Caspase-9 について測定

した。GLP-1Rの発現を確認し siRNA を用いて GLP-1R をノックダウンし GLP-1R の関連性について検討した。AMPK の活性化について Western Blotting を行った。Akt のリン酸化について検証した。6週令のメスヌードマウスに、MCF-7細胞100万個を播種し control 群、Ex-4単剤群、Met単剤群、Ex-4とMet併用群をそれぞれN数10とし14週令で心臓採血、腫瘍摘出し、腫瘍重量、インスリン濃度、血糖値、体重推移を測定した。腫瘍細胞のHE染色、ki67染色をおこない、ki67染色陽性細胞数をカウントした。GLP-1R発現について検討した。

【結果】

増殖曲線においてMCF-7細胞、MDA-MB-231細胞、KPL-1細胞の全てにおいてMet単剤で用量依存性に細胞増殖が抑制され、Ex-4とMet両剤の併用ではより有意に細胞数の減少が認められた。しかしホルモン感受性による影響は認めなかった。Ex-4とMetの併用はBrdUの取り込みを有意に抑制し、両薬剤は乳癌細胞において細胞分裂を抑制することで細胞増殖を抑制することが分かった。MetはAMPKを活性化し、アポトーシスを誘導することにより乳癌細胞増殖を抑制し、アポトーシスシグナルにおける抗アポトーシスタンパクはBCL-2の発現を低下させることがメカニズムであることが示唆された。MCF-7細胞にはGLP-1R発現が認められ、GLP-1RをノックダウンすることでEx-4の細胞増殖抑制作用が消失しEx-4はGLP-1Rを介して細胞増殖を抑制していることがわかった。一方、Metの増殖抑制作用はGLP-1Rをノックダウンしてもキャンセルされず、GLP-1Rを介していないことが分かった。またEx-4とMetの併用でAktのリン酸化が抑制された。In vivoの検討においてMet単剤群で腫瘍体積は減少しEx-4とMet併用群で腫瘍重量は最も低下した。インスリン値はMet単剤群と併用群で低下した。血糖値、体重は各群で明らかな差は認めなかった。腫瘍細胞のHE染色では壊死組織はコントロール群で特に多く認められた。ki67染色陽性細胞は、Ex-4単剤群、Met単剤群、併用群全てにおいて減少した。GLP-1Rの発現はEx-4単剤群、Met単剤群、併用群でともに上昇した。

【結論】

GLP-1受容体作動薬は血糖依存性にインスリン分泌を促進する薬剤であり、食欲抑制作用や体重減少作用もあり、大規模臨床試験では心血管イベント抑制作用も報告されている。一方ビッグアナイド薬の一種であるMetはインスリン分泌非促進系の薬剤であり、主には肝臓からの糖の放出を抑制し、インスリン抵抗性を改善し、欧米では第一選択薬として用いられている。GLP-1受容体作動薬とMetはよく使用される糖尿病治療薬であり、血糖降下作用が相補的であるため併用療法は2型糖尿病患者の血糖コントロールにしばしば処方されているが、癌抑制への影響についての検証は極めて限定的である。Metが癌細胞増殖を抑制する機序については間接的作用と直接的作用がある。間接的作用としては、Metはインスリン抵抗性を改善させることでインスリンおよびIGF-1の血中濃度を低

下させる。また、直接的作用としては細胞周期を停止させアポトーシスを誘導するとされている。GLP-1 受容体作動薬の癌に対する影響も、いまだ研究段階である。既報で我々は、Ex-4 は GLP-1R を活性化することで乳癌細胞増殖を抑制することを報告し、本稿では GLP-1R をノックダウンすることで Ex-4 の乳癌細胞増殖抑制効果を消失させることがわかった。このことから Ex-4 の細胞増殖抑制効果は GLP-1R が関与していることが考えられた。AMPK はエネルギー代謝の標的分子としてだけでなく、抗腫瘍効果としても重要であり Met は AMPK を活性化させアポトーシスを誘導することが報告されている。Met が抗アポトーシス蛋白である BCL-2 を減少させることがわかった。In vivo において各群でマウスの体重には差がなく、非糖尿病のマウスであり血糖値は正常であり抗腫瘍効果には影響しなかった。Met のインスリン抵抗性改善による間接的作用でインスリン濃度が低下したと考えられた。マウスの腫瘍において腫瘍の形状や壊死組織の存在から腫瘍重量を指標とし、Ex-4 と Met の併用群で最も重量の低下を認めた。以上のことから Ex-4 の GLP-1R を介した NF- κ B の活性化の抑制と、Ex-4 と Met による Akt のリン酸化抑制による細胞増殖の抑制、Met による高インスリン血症の改善、更に Met による AMPK 活性化作用でのアポトーシスにより、癌細胞増殖を抑制することが示唆された

審査の結果の要旨

本論文では、乳癌に対する GLP-1 受容体作動薬エキセンジン-4 とメトホルミンの併用効果についての検討が行われた。先行研究においてメトホルミンによるインスリン抵抗性の改善とアポトーシスの誘導で乳癌細胞の増殖が抑制されること、乳癌細胞に GLP-1 受容体が発現しておりエキセンジン-4 を乳癌細胞株に投与すると Akt のリン酸化を抑制し NF- κ B の活性化を抑制することで乳癌細胞増殖を抑制することが報告されている。しかしながら、エキセンジン-4 とメトホルミンの併用の乳癌抑制作用に関しては明らかにされていない。申請者らはまず、in vitro の検討においてメトホルミンによって 3 種類のヒト乳癌細胞株 (MCF-7, MDA-MB-231, KPL-1) においてメトホルミンが濃度依存性に細胞増殖を抑制することを確認した。次に、エキセンジン-4 とメトホルミンの併用で相加的に乳癌細胞の増殖を抑制することを確認した。この機序として、両剤とも DNA 合成を抑制することが BrDU アッセイによって示されると共に、Akt のリン酸化抑制が関与することが示唆された。エストロゲン受容体が存在し、ホルモン依存性の乳癌細胞株である MCF-7 細胞では、GLP-1 受容体の発現を認めエキセンジン-4 とメトホルミン投与によりその発現が上昇し、siRNA を用いた GLP-1 受容体のノックダウンによりエキセンジン-4 による細胞増殖抑制効果が消失したことからエキセンジン-4 の細胞増殖抑制効果は GLP-1 受容体を介したものであることが示唆された。またメトホルミンは AMP キナーゼ (AMPK) を活性化し BCL-

2 の発現を低下させることでアポトーシスを誘導することが示唆された。in vivo での検討においては、ヌードマウスに MCF-7 細胞の移植実験を行ったところ、エキセンジン-4 とメトホルミンの併用投与によって腫瘍サイズの縮小効果がみられた。メカニズムの解析を行ったところ、細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導や血中インスリン値を減少させたことが、乳癌腫瘍サイズの縮小に寄与していることが明らかとなった。本研究によって、エキセンジン-4 とメトホルミン併用が乳癌の増殖抑制に有用である可能性が示唆された。

1. 斬新さ

これまでにエキセンジン-4 とメトホルミンが各々乳癌増殖抑制効果を有することが報告されている。しかしながら、両剤の併用の有効性については明らかになっていなかった。申請者らは乳癌細胞にエキセンジン-4 とメトホルミンを併用することにより相加的に抗腫瘍効果をえられる可能性を新たに示した研究であり、斬新さを認める。

2. 重要性

糖尿病患者は増加の一途を辿っており、最も多い死因は癌である。糖尿病は血管合併症のみならず、併存症である癌、サルコペニア、フレイル、認知症等が患者の寿命、QOL を著しく損なう存在として知られている。癌に対する糖尿病治療薬の作用を詳細に検討した本研究は重要性があると考えられる。

3. 研究方法の正確性

申請者は審査会において研究目的・方法・各実験について詳細かつ真摯に説明、解説をおこない、その再現性・正確性について審査員一同一致してみとめている。また本論文は査読を経て Diabetology International にすでに掲載されており、研究方法の正確性は担保されていると認められる。

4. 表現の明確さ

目的、方法、結果は、詳細かつ正確に表現されており、figure を用いて簡潔に表現されている。結果に基づいた考察については、過去の論文を十分に検討し、本研究では Ex-4 と Met の併用における乳癌への作用を明確に示している。

5. 主な質疑応答

Q:エキセンジン-4 には癌抑制効果があるが DPP-4 阻害薬で同様の作用がないのはなぜか。GIP との関連はあるか。

A:GIP に関しては検証していないので今後検討させていただきたい。DPP-4 阻害薬は基質を介して乳癌の転移を促進するという基礎研究があり、近年は担癌患者への DPP-4 阻害薬の投与が予後に影響を与える可能性を示唆する臨床研究も散見されるようになっている。

GLP-1 受容体作動薬であるエキセンジン-4 にはそのような懸念がないのが利点である。

Q:GLP-1 受容体作動薬には正常細胞における細胞保護作用が報告されているが、癌細胞であるため非生理的な形で細胞増殖を抑制したという解釈か。正常乳腺の細胞では GLP-1 受容体発現とその影響はあるのか。

A:正常の乳腺にも GLP-1 受容体が発現しているという報告もあったが他の正常組織と比較しごく微量であるため影響は少ないと考えている。癌細胞である MCF-7 細胞には GLP-1 受容体の発現を認めたので正常細胞とは異なる作用があったと考えている。

Q:抗癌剤として臨床応用できないか。GLP-1 受容体作動薬とメトホルミンの併用で化学療法の際の抗癌剤の投与量を低減させることは可能か。

A:臨床的には抗癌剤として使用し有効であったという報告はないが、臨床研究で現行の抗がん剤や放射線療法を行った糖尿病患者でメトホルミン内服による癌の進行が抑制された可能性が報告されている。GLP-1 受容体作動薬とメトホルミンを併用した場合の抗癌剤との比較の報告はなかった。抗癌剤との関連は今後の課題としたい。

Q:実験に用いたエキセンジン-4 とメトホルミンの投与量は至適量か。

A: 既報で使用され、臨床使用量に近い濃度を使用した。

Q: エキセンジン-4 とメトホルミンは併用することでマイナスの作用はないのか。他の糖尿病薬との併用で癌抑制作用はあるか。

A:両剤併用でのマイナスの作用は本研究では認めなかった。SGLT2 阻害薬での乳癌、肺癌の抑制作用は報告されているので他の糖尿病薬との併用で癌を抑制する可能性について今後の課題とさせていただきたい。

Q:GLP-1 受容体作動薬では cAMP が活性化することが知られている。また、メトホルミン投与によって乳酸が上昇するが、これらとの関連は検討したか。本研究では両剤の相加効果が弱い印象があるので、他の作用も確認した方が良いと思われる。

A:cAMP や乳酸の関連については検討していなかったなので今後の課題とさせていただきたい。

Q: Fig. 3c に関して MCF-7 細胞の 20%程度しか GLP-1 受容体の発現はみられないがなぜエキセンジン-4 による効果があると考えたのか。また MDA-MB-231 細胞では GLP-1 受容体は 80%近く発現しているが、今回 MCF-7 細胞を用いて実験をしたのはなぜか。

A: GLP-1 受容体は正常乳腺の細胞にはほとんど発現していないので、GLP-1 受容体の発現は癌細胞特有の現象と考えたため効果があると考えた。既報のエキセンジン-4 による癌抑制作用が MCF-7 細胞で検討されたため、今回はメトホルミンとの併用効果を判定するため MCF-7 細胞を用いた。

Q: Fig. 1b や in vivo の結果からは、メトホルミン単剤と比較しエキセンジン-4 とメトホルミンの併用が相加効果で細胞増殖を抑制したというのは根拠としては弱いと思われる。Fig. 3d において GLP-1 受容体をノックダウンし 0hr で細胞数が減少しており、72hr ではさらにその差がひらいていることから GLP-1 受容体の存在自体を減らすことで細胞増殖が抑えられたとことが考えられる。さらにメトホルミンで細胞増殖が抑制されている。GLP-1 受容体作動薬は必要だろうか。

A: 乳癌細胞における GLP-1 受容体および GLP-1 受容体作動薬の意義については、様々な報告があり、その見解はまだ一致していない。今回の乳癌抑制効果に関しては、エキセンジン-4 の GLP-1 受容体を介さない何らかの作用が関係している可能性も否定できず、今後の検討課題とさせていただきたい。

Q: メトホルミンは臨床的に癌の発生を抑制するという報告があるのか。

A: メトホルミンが癌の発生や死亡を抑制するというメタ解析があり、臓器別ではメトホルミン使用者において大腸癌の発症抑制が認められるという報告が複数認められる。

Q: Met がキラーT 細胞を活性化するという報告がある。今回はヌードマウスを用いて実験しているが今後キラーT 細胞の活性化について検討してみてもどうか。

A: 今後の課題とさせていただきたい。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者は適切に回答した。本論文は、GLP-1 受容体作動薬エキセンジン-4 とメトホルミンの併用療法が乳癌の細胞増殖抑制に有用である可能性を新たに示した研究であり、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。