

【要約】

Metformin produces synergistic cytotoxic effects in combination with p53-enhancing nutlin-3a on malignant mesothelioma through multiple mechanisms

(悪性中皮腫において Metformin は p53 を増強する Nutlin-3a との併用で、複数の機序で相乗的な細胞障害作用を示す)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：巽 浩一郎 教授)

島津 健吾

【目的】

悪性中皮腫は胸腔内に発生する予後不良の悪性腫瘍で、主な危険因子はアスベスト被爆によることが知られている。その多くは正常型の p53 遺伝子を有するが、約 80% で p14 遺伝子の欠損を認めることが知られている。p14 タンパクは p53 分解を促進する MDM2 の活性を阻害することで、結果的に悪性中皮腫は正常型 p53 遺伝子を有するにも関わらず、p53 の機能的低下を示す。また約 50% に NF2 とその下流の変異が認められ、結果として mTOR 経路の活性化が引き起こされる。

p53 タンパクは定常的に MDM2 により分解誘導を受けており、至適な量に調整されているが、悪性中皮腫でみられる p14 欠損は MDM2 過剰発現を引き起こし、結果 p53 タンパクの減少を来している。Nutlin-3a は MDM2-p53 相互作用を阻害する薬剤で、p53 タンパクの安定化に寄与し抗腫瘍効果を示す。

Metformin はビグアナイド系に分類される 2 型糖尿病の治療薬で欧米では第一選択薬として使用されている。Metformin 使用患者で悪性腫瘍の発生率が低いことからその抗腫瘍効果が疫学的に確かめられ、現在では様々な細胞種で報告がなされている。その主な作用機序は AMPK 活性化・mTOR 抑制経路を介すると考えられているが、その他の機序も多数報告があり、環境や細胞種により多岐に渡る。

今回我々は、予後不良疾患として知られる悪性中皮腫に対する Metformin の抗腫瘍効果を確かめるとともに、その作用機序に関し、Nutlin-3a を用いて p53 経路との関連を中心に検討を行う事を目的とした。

【方法】

ヒト中皮腫細胞として MSTO-211H, NCI-H28, NCI-H226, NCI-H2052, NCI-H2452, EHMES-1, EHMES-10, JMN-1B, Met-5A の 9 細胞を用いた。MTT assay (WST kit, Wako, Japan) と Cell count (trypan-blue dye exclusion assay) で Metformin, Nutlin-3a に対する細胞増殖効果を確認した。siRNA を用い p53 ノックダウンを行い MTT assay で細胞増殖の変化を確認した。FACS により細胞周期解析を行い、Western blotting でタンパク解析を行った。

【結果・考察】

MTT assay と Cell count では Metformin は悪性中皮腫細胞 9 種に対し、p53 遺伝子型に依らず濃度・時間依存的な抗腫瘍効果を示す事が確かめられた。Nutlin-3a は正常型 p53 遺伝子を有する細胞に対してより強く、濃度・時間依存的な抗腫瘍効果を示した。

siRNA による p53 のノックダウン実験を MSTO-211H, NCI-H28, EHMES-10 の 3 細胞に対し行ったところ、Metformin 処理に対しては p53 非依存的な細胞増殖抑制を示したのに対し、Nutlin-3a 処理に対しては MSTO-211H, NCI-H28 では p53 ノックダウンで細胞増殖抑制作用が減弱したが、EHMES-10 では p53 非依存的な反応を示した。EHMES-10 は正常型 p53 遺伝子を有するが MDM-2 の過剰発現が認められ、このために Nutlin-3a の p53 依存的な作用が発揮されなかったものと考えられる。結果的に Metformin は p53 非依存的な作用機序で、Nutlin-3a は p53 依存的な作用機序で主に抗腫瘍効果を発揮していることが確かめられた。

FACS による細胞周期解析では Metformin 処理群・Nutlin-3a 処理群ともに、細胞種によって Sub-G1 期の増加 (apoptosis を示唆)、G1 期もしくは G2/M 期の増加 (Cell cycle arrest を示唆) といった異なる反応が認められた。

Metformin と nutlin-3a の併用実験 (WST assay) では、MSTO-211H, NCI-H28, EHMES-10 のすべてで相加・相乗効果を示した。

Western blotting でのタンパク解析を行った結果、Metformin 単独処理に対し MSTO-211H と NCI-H28 では AMPK 非依存的な mTOR の抑制が認められ、EHMES-10 ではよく知られた AMPK 依存的な mTOR の抑制が認められた。また Nutlin-3a により AMPK は活性化されるものの、mTOR の抑制は Metformin 投与に比して殆ど認められなかった。Metformin と Nutlin-3a の併用では、MSTO-211H でリン酸化 p53 の減少、cleaved caspase-3 の減少など、apoptosis を示唆するタンパクの発現が Nutlin-3a 単剤処理に比して減少していた。WST assay で 2 薬剤の相加・相乗効果が確かめられている事と合わせて考えると、Metformin の細胞増殖抑制作用が p53 タンパクの安定化により増強されたと考えられる。また併用処理に対する NCI-H28, EHMES-10 の反応は、リン酸化 p53 の増加、cleaved caspase-3 の増加などが認められ、併用により apoptosis が増強したことが示唆された。

【結論】

Metformin は悪性中皮腫細胞に対し p53 非依存的に抗腫瘍効果を示すことがわかった。NF2 遺伝子変異は mTOR 活性化を引き起こす事が知られており、mTOR 阻害薬の側面を持つ metformin は悪性中皮腫治療として合理的だと考える。

Nutlin-3a は p53 正常型に対して効果的に抗腫瘍効果を示すことがわかった。p14 欠損 / p53 正常型の多い悪性中皮腫に対して、MDM-2 阻害により p53 安定化をもたらす nutlin-3a の使用は合理的だと考える。

Metformin と nutlin-3a の併用により、悪性中皮腫に対し相加・相乗の抗腫瘍効果が発揮されることがわかった。作用機序は細胞ごとに異なるものであったが、mTOR 抑制と p53 の安定化の併用は、新たな悪性中皮腫治療法として期待できると考える。