

【要約】

Antitumor effects of metformin via indirect inhibition of protein phosphatase 2A in patients with endometrial cancer

(メトホルミンは子宮体癌組織で間接的に PP2A を抑制し
抗腫瘍効果を発揮する)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻
生殖医学講座
(主任:生水真紀夫教授)

埴 真輔

【緒言】 子宮体癌は婦人科でもっともメジャーな悪性腫瘍である。子宮体癌は糖尿病、インスリン抵抗性、肥満、などがリスク因子となる。

メトホルミン(以下 Met)はビグアナイド系の糖尿病薬出合い、2型糖尿病の第一選択薬である。Met は糖尿病患者の悪性腫瘍の罹患率と死亡率を低下させる効果もある。In vitro の研究では Met 投与は種々の癌細胞で増殖を抑制することが報告されている。また我々はメトホルミンの投与で子宮体癌患者の組織内の ki-67 と

TopoisomeraseII α が優位に減少することを報告したがメトホルミンの抗腫瘍効果の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

Protein phosphatase2a(以下 PP2A)はセリン/スレオニンフォスファターゼであり、PP2A の活性化はインスリン抵抗性の獲得、糖尿病に関与するとされている。また一般的に tumor suppressor とされているが、近年 PP2A 抑制剤である LB-100 がシスプラチンの効果を高めるとして臨床試験が組まれ、癌腫によっては PP2A の抑制が癌細胞の増殖を抑制する報告がある。子宮体癌に対する PP2A の関与についてはまだ詳細に検討されていない。

今回、我々はメトホルミンの抗腫瘍効果に PP2A が関与しているかを探索的に研究した。

【方法】

14 人の類内膜腺癌の患者を対象とした。以前我々の研究に参加した(UMIN000004852)に今回の研究に関し再同意を取得した。

Performance status は 0 から 1 であり、腎機能、肝機能、心機能に問題ない患者を対象とした。治療を必要とする糖尿病、Met の使用歴がある、凝固能異常がある、精神疾患がある患者は除外した。内膜組織を内膜キュレットで採取後、Met を 4-6 週間(1500mg-2250mg)手術まで内服し、子宮体癌手術の際に再度内膜組織を採取した。

このうち 6 例の症例はペアで RNA を採取できた。

まず PP2A-Bsubunit の発現を免疫染色で比較した。免疫染色のコントロールとしてメトホルミンを投与していない子宮体癌類内膜腺癌症例を、診断時の内膜キュレットの組織と手術の際の検体のペア 10 例を使用した。評価は immunoreactivity scores(IRS)を使用した。

Met 投与前後で PP2A-Bsubunit であり、PP2A の活性化に重要な PPP2R4 の発現を real time PCR(以後 RT-PCR)で比較した。

RT-PCR の基準として、悪性腫瘍の既往なく、肥満や糖尿病の既往歴もない6例の正常子宮内膜の PPP2R4mRNA の発現の平均値を使用した。評価には Δ CT 法を使用した。

In vitro の実験系では子宮体癌類内膜腺癌 Grade1 に相当する細胞株として HEC265,HEC1B を使用した。

Met を添加し 24 時間後に PPP2R4mRNA の発現を RT-PCR にて計測した。

次に siRNA を導入し、PPP2R4 を細胞株でノックダウンし、細胞株の増殖能を WST-アッセイで計測し、アポトーシス誘導能として caspase3/7 活性を計測した。またメトホルミンの抗腫瘍効果として重要な経路であるとされている AKT,ERK の発現をウェスタンブロット法にて測定した。

【結果】14 症例の子宮体癌患者の年齢の中央値は 46 歳(range28-65)であり、HOMA-R の中央値は 3.02(range0.6-8.18)で 2.5 以上のインスリン抵抗性の患者が 9 症例(64.3%)に耐糖能異常が見られた。BMI の中央値は 27.9(range18.9-50.2)であり BMI25 以上の肥満患者は 10 症例(71.4%)であった。肥満、インスリン抵抗性の患者比率が高かった。

子宮体癌組織の PP2A-Bsubunit 免疫染色では Met 投与群では 14 症例中 11 症例(78.6%)にその染色性の低下がみられ、Met 非投与群では 10 症例中 3 症例(30%)に低下が見られ、Met 投与群の方が有意に Met 投与後に PP2A-Bsubunit の低下が見られた。

次に 6 ペアの Met 投与の PPP2R4 の mRNA の発現を検討した。

PPP2R4 の発現は Met 投与で有意に低下した。

また子宮体癌組織の PPP2R4 の発現は正常内膜に比較し高値であった。

In vivo の検討では Met 投与により PP2A-Bsubunit,PPP2R4 の発現低下が観察された。

In vitro の検討で Met の濃度を変えて(0-5mmol)HEC265,HEC1b に添加し 24 時間後の PPP2R4 の発現を検討したが PPP2R4 の発現に

変化は見られなかった。Met 投与による In vivo の PPP2R4,PP2A-Bsubunit の発現低下は直接的な効果でなく、メタボリックな間接的な作用であることが示唆された。

PPP2R4 の低下についての意義を In vitro で検証した。siRNA を用いて HEC265,HEC1b の PPP2R4 をノックダウンした。

PPP2R4 をノックダウンしたのち 72 時間後に WST-8 アッセイで計測すると HEC265,HEC1b の吸光度は有意に低下し、細胞増殖能が低下したことが示唆された。また同様に caspase3/7 活性を計測すると HEC265,HEC1b の caspase3/7 活性が有意に上昇した。

HEC265,HEC1b の二つの子宮体癌細胞株で PPP2R4 のノックダウンは細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが示された。

Met の抗腫瘍効果に重要であるとされる ERK, Akt の発現は PPP2R4 のノックダウンを行っても変化は見られなかった。

【考察】Met の抗腫瘍効果は間接的なものであると考えられる。これは生体内におけるメトホルミンの濃度は In vitro で細胞増殖を抑制する Met の濃度よりはるかに低いからである。

Met の抗腫瘍効果は肺がんと乳がんの動物モデルで、肥満やインスリン抵抗性を持つモデルでより効果的であることが示されている。

Met の抗腫瘍効果は IGF やレプチンなどを介したメタボリックなものであることが示唆されている。

今回我々は子宮体癌で Met と PP2A の関係について検討した。

PP2A は一般的に tumor suppressor とされているが、いくつかの論文で PP2A の抑制剤が癌治療のポテンシャルを持つと報告されている。LB-100 はシスプラチンとの併用でより抗腫瘍効果を高めるとされているし、canthridin は膵臓癌の細胞株の浸潤能を抑制すると報告されている。PPP2R4 のノックダウンの検討は他にも報告があり、hela cell でも細胞増殖を抑制し、HEK293,N2a cell ではミトコンドリアを介した経路で細胞増殖を抑制させる。

しかし PPP2R4 の過剰発現もまた細胞増殖能を抑制すると報告されており、PPP2R4 は細胞のホメオスターシスを担うと考えられる。

PPP2R4 だけでなく、他の subunit に関してもその抑制が肝細胞癌の治療ターゲットになるという報告がある。

つまり PP2A は腫瘍に対する効果は様々であり、それは subunit が関係しているのかもしれない。PP2A はその subunit により、ERK の脱リン酸化に関与したり、Akt シグナルを調整するとされている。しかし今回の検討では PPP2R4 のノックダウンは ERK, Akt に影響を及ぼさなかった。子宮体癌では PPP2R4 の抑制が抗腫瘍効果を持つことが示唆されたが、そのメカニズムの追及にはさらなる検討が必要である。

今回の研究にはいくつか limitation がある。Type1 の子宮体癌に症例を絞っているので Type2 の子宮体癌に PP2A がどう作用するかが不明であること、また PP2A には 92 のアイソフォームがあり、またそれぞれの subunit についても詳細な検討を行っておらず、Met と PP2A の関係をより明らかにするためにさらに詳細な検討を要する。

【結語】 この研究で子宮体癌患者への Met 投与は間接的に子宮体癌組織内の PPP2R4 の発現を低下させ、In vitro では PPP2R4 のノックダウンが細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導し、この作用は ERK, Akt を介さないことが示された。Met 投与は PPP2R4 を間接的に抑制し、この抗腫瘍効果は ERK, Akt を介さない経路で細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが示唆された。Met の抗腫瘍効果のメカニズムの一つに PP2A の関与が示された。