

論文内容の要旨

論文提出者氏名 吉田 寿一郎

論文題目

Metformin inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and liver metastasis of pancreatic cancer cells.

論文内容の要旨

膵癌は予後の悪い癌腫の一つである。2型糖尿病は膵癌のリスクとなる。一方で2型糖尿病治療薬の一つであるメトホルミンは様々な機序を介しての抗腫瘍効果が報告されている。癌の浸潤転移にepithelial-mesenchymal transition(EMT)がかかわるとされ、メトホルミンがEMTを阻害することは複数の癌腫で示されているが、膵癌での報告はない。著者は膵癌細胞におけるメトホルミンのEMT抑制効果、転移抑制効果を明らかにすることを目的とした。

3種のヒト膵癌細胞株(PANC-1, MiaPaCa-2, BxPC-3)を用いてEMTの誘導実験を行った。EMTはTGF- β 1(10ng/ml)により刺激を行い誘導した。メトホルミンはTGF- β 1刺激の前より10nMで共培養を行った。細胞形態の変化、wound healing assay法を用いてEMTの表現型を評価し、またEMT関連分子の発現についてはウエスタンブロット法、RT-PCR法、蛍光免疫染色法を用いて評価した。また膵癌移植による膵癌転移モデルマウスを用いて転移抑制効果を評価した。6-8週齢雌性C57BL/6マウスを用いた。まずマウス両側腹部皮下にマウス膵癌細胞株(Panc02)を 3×10^6 個注入し、3週間後に生着した皮下腫瘍の組織片を別個体30匹のマウスの膵尾部に移植した。移植したマウスはコントロール群とメトホルミン投与群に分け、前者は生理食塩水を、後者はメトホルミン125 mg/kgを連日腹腔内投与した。28日後に解剖を行い、原発巣の大きさや重量、肝転移・肺転移個数、さらに原発巣(膵癌移植病巣)のEMT関連分子についてウエスタンブロット法、RT-PCR法、免疫染色法を用いて評価した。

細胞形態については、いずれの細胞においても、TGF- β 1刺激にて細胞は紡錘形への変化が観察され、メトホルミンを加えて共培養を行うと紡錘形変化がキャンセルされた。またwound healing assay法では、2種の細胞(PANC-1, MiaPaCa-2)において、TGF- β 1刺激で運動能亢進がみられたが、メトホルミン共培養を行うとTGF- β 1誘導の運動能亢進は抑制された。

EMT関連蛋白についての検討では、上皮系マーカーであるE-cadherinは、PANC-1 cellではTGF- β 1刺激にて発現が減弱しメトホルミン投与で増強した。BxPC-3 cellにおいては

メトホルミン投与で増強した。間葉系マーカーに関しては、PANC-1 cellではVimentin、SnailがTGF- β 1刺激にて発現が増強しメトホルミン投与で減弱した。BxPC-3 cellではVimentin、 α -SMAがTGF- β 1刺激にて発現が増強しメトホルミン投与で減弱した。これらのことから、膵癌細胞株においてTGF- β 1刺激で惹起されるEMTはメトホルミン投与で阻害されていると考えられた。EMTはsmad2/3を介する経路、Akt/mTORを介する経路など複数の機序で引き起こされるが、PANC-1 cellはTGF- β 1刺激にてsmad2/3のリン酸化が引き起こされたが、メトホルミンはこのリン酸化を抑制した。一方でTGF- β 1刺激にてAktやmTORのリン酸化は引き起こされなかった。BxPC-3 cellではTGF- β 1刺激にてAktやmTORのリン酸化が引き起こされたが、メトホルミン投与でリン酸化は抑制された。BxPC-3 cellではTGF- β 1刺激によるsmad2/3のリン酸化は引き起こされなかった。以上から、TGF- β 1誘導EMTを引き起こす経路や、メトホルミンが阻害する経路は、PANC-1 cellではsmad2/3を介する経路が主に関与し、BxPC-3 cellではAkt/mTORを介する経路が主に関与しており、細胞により機序が異なることが示唆された。

さらに膵癌転移モデルマウスを用いて膵癌の肝・肺転移につき評価した。コントロール群とメトホルミン群で体重については差を認めなかった。また解剖時に膵尾部に移植した膵腫瘍の大きさ、重量については有意差を認めなかった($p=0.249$, $p=0.295$)。肺転移をきたした個体数については有意差を認めなかったが($p=0.341$)、肝転移をきたした個体数についてはメトホルミン投与群で有意に少なかった($p=0.049$)。また原発巣は膵尾部に移植した膵腫瘍組織の蛋白質発現解析において、上皮系マーカーであるE-cadherinがメトホルミン投与群で発現が強く、間葉系マーカーであるVimentinはメトホルミン投与群で発現が弱いことが確認された。以上からメトホルミンは膵癌においてEMTを阻害することによって肝転移形成を抑制することが示唆された。