

論文内容の要旨

論文提出者氏名 田中 良一

論文題目

Metformin causes G1-phase arrest via down-regulation of miR-221 and enhances TRAIL sensitivity through DR5 up-regulation in pancreatic cancer cells.

論文内容の要旨

緒言

膵癌は予後不良の癌の一つであり、悪性腫瘍による部位別死亡率では本邦において第4位とされる。膵癌の唯一の根治療法は外科手術であるが、1975年から2009年のアメリカ合衆国における5年生存率は2-6%である。ゲムシタビン、FOLFIRINOXやEGFRチロシンキナーゼの選択的阻害薬の効果は、全生存率の一部改善にとどまっている。

本研究では、癌予防効果や抗癌剤としての一面も報告されているメトホルミンと tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)に着目した。メトホルミンは長年使用されている2型糖尿病の第一選択薬である。一方、TRAILは癌細胞に選択的にアポトーシスを引き起こすサイトカインであり、組み換えヒトTRAILタンパク質やTRAIL受容体のアゴニスト抗体は抗癌剤として期待されている。

近年、癌の制御に対し、ノンコーディングRNAの一種であるmicroRNAが重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。microRNAは、翻訳阻害やmRNAの分解を通して、特定の遺伝子の翻訳を制御している。中でも癌促進型のmicroRNAの一種であるmiR-221は、膵癌細胞において発現が高いことが知られている。

本研究で、我々は膵癌細胞においてメトホルミンがmiR-221発現を減少させてmiR-221の直接の標的遺伝子の一つであるp27の発現を誘導することにより、その結果G1期停止を引き起こすことを発見した。さらにメトホルミンがp53変異膵癌細胞においてTRAIL受容体であるDR5の発現量を増加させ、TRAIL感受性を増強することを見出した。本研究の結果から、メトホルミンの癌細胞に対するTRAIL感受性増強能はp53に依存しないことを明らかにした。

結果

メトホルミンの膵癌細胞に対する効果を調べるため、膵癌細胞株PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1にメトホルミンを投与して72時間後にトリパンブルー色素排除試験を行った。その結果メトホルミンは用量依存的に膵癌細胞の増殖を抑制した。

次に膵癌細胞にメトホルミンを投与して48時間後にフローサイトメトリー解析を行った結果、メトホルミンの用量依存的なG1期停止作用が認められた。さらに40 mMのメトホルミンはG1期停止に寄与するタンパク質であるp27の発現量を増加させた。

膵癌では miR-21, miR-221, miR-301, miR-376a, miR-155 の発現が亢進していること、また p27 が miR-221 の標的分子であることが報告されている。メトホルミンによる miR-221 発現量に及ぼす影響を検討した結果、用量依存的な miR-221 の発現抑制効果が認められた。次に PANC-1 に miR-221 mimic を遺伝子導入した後にメトホルミンを投与してフローサイトメトリー解析と Western blotting を行ったところ、メトホルミンによる p27 発現誘導効果と G1 期停止作用は減弱した。すなわち、メトホルミンによる膵癌細胞の G1 期停止は miR-221 の発現抑制によって p27 発現量が回復することで引き起こされると考えられる。

次に p53 変異の膵癌細胞株 (PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2) に対する TRAIL 感受性増強作用について検討した。上記の膵癌細胞株 3 株に対し、メトホルミンと TRAIL を併用投与し、sub-G1 細胞数を計測した。メトホルミンと TRAIL の併用により、3 株の細胞全てでアポトーシス誘導効果は有意に増強した。

メトホルミンが TRAIL 感受性を増強させるメカニズムを調べるために、アポトーシス関連タンパク質の発現量へのメトホルミンの影響について検討した。PANC-1 細胞にメトホルミンを投与して 48 時間後に TRAIL 受容体である DR4, DR5 や、種々のアポトーシス関連タンパク質の発現を調べた。DR4, DR5 やアポトーシス促進タンパク質である Bim の発現量は、メトホルミンによって有意に増加した。次に TRAIL 受容体の細胞表面における発現量に対するメトホルミンの影響について検討した結果、PANC-1 細胞において、メトホルミンによる細胞表面上の DR5 発現量の増加が認められた。さらにリアルタイム RT-PCR 法により、メトホルミンによる DR5 の発現誘導効果は、mRNA レベルから認められることが明らかとなった。

メトホルミン/TRAIL 併用によるアポトーシスと、caspase や DR5 の関連性を検討するため、pan-caspase 阻害剤である zVAD-FMK あるいは DR5/Fc キメラを用いたアポトーシス阻害実験を行った。メトホルミンと TRAIL 併用によるアポトーシスは zVAD-FMK と DR5/Fc キメラいずれによっても著明に抑制されたことから、この組み合わせによって増強するアポトーシスは、部分的には caspase や DR5 に依存することが示された。細胞に miR-221 mimic を遺伝子導入した後にメトホルミンと TRAIL を投与したところ、アポトーシス細胞数は減少しなかったことから、miR-221 は TRAIL が引き起こすアポトーシスに関与しないことが示された。

考 察

古典的な 2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンは近年抗腫瘍薬としても注目されており、メトホルミンと様々な抗癌剤との併用療法に関する臨床試験が現在行われている。今回、メトホルミンが膵癌細胞において miR-221 の発現を抑制することで G1 期細胞周期停止を引き起こし、さらに DR5 の発現を増加させることで TRAIL の感受性を増強することを証明した。また、メトホルミンと TRAIL の併用療法が膵癌治療において非常に有効であり、期待できる治療法の一つである可能性を示した。