

博士論文

ラット子宮筋腫細胞に対する抗糖尿病薬メトホルミンの
血管新生抑制効果について

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

(発生発達医学講座婦人科学分野)

只川 真理

目次

I	要約	2 頁
II	略語	5 頁
III	研究背景	6 頁
IV	研究目的	10 頁
V	研究方法	11 頁
VI	研究結果	16 頁
VII	考察	20 頁
VIII	結論	26 頁
IX	謝辞	27 頁
X	文献	28 頁
XI	図	34 頁
XII	図説明	43 頁

I 要約

1 研究目的

子宮筋腫は過多月経や不妊など種々の健康障害を引き起こし、閉経前女性の子宮摘出術の主たる原因となる。子宮温存を希望する患者には薬物治療として GnRH(gonadotropin releasing hormone; 性腺刺激ホルモン放出ホルモン)アゴニストが用いられてきたが、骨粗鬆症などの副作用により長期投与不可能であるといった問題点がある。一方、糖尿病治療薬であるメトホルミンは多嚢胞性卵巣症候群の排卵障害改善に用いられてきた歴史があり、生殖年齢女性における安全性が確立されている。近年、メトホルミンは種々の癌細胞の増殖に対し抑制的に働く事が明らかとなり、癌治療への応用でも注目を集めている。また、メトホルミンが血管新生抑制効果を示す事も報告された。

我々は、先行研究においてメトホルミンが子宮筋腫細胞の細胞増殖を抑制する事を示し、メトホルミンが副作用の少ない新しい子宮筋腫治療薬となりうる可能性を示した。そこで、本研究ではメトホルミンが子宮筋腫において血管新生因子である VEGF(vascular endothelial growth factor)の発現を抑制するか、また、その分子機構を解析する事を目的とした。

2 方法

ヒト子宮筋腫のモデルとして Eker ラット由来の子宮筋腫細胞株(ELT-3 細胞)を用いた。子宮筋腫の血管新生がメトホルミンによって抑制されるのかどうかを調べるために、メトホルミンが ELT-3 細胞の VEGF 発現を抑制するかを検討した。ELT-3 細胞の培養液中にメトホルミンを添加した際の VEGF 蛋白発現量の変化を調べた。また、メトホルミンがどのような経路で VEGF 蛋白発現を抑制するのかを解明するため、HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α ; 低酸素誘導因子1 α)、PHD2(prolylhydroxydase2; プロリルヒドロキシダーゼ)、mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白複合体 1)関連因子の発現やリン酸化状態を調べた。筋腫組織は著しい低酸素状態にあるため、塩化コバルトを用いた擬似的低酸素条件下において検討を行った。

3 結果

正酸素条件で ELT-3 細胞の培養液中にメトホルミンを添加した際にメトホルミンは培養上清中および細胞中に存在する VEGF の蛋白発現量を濃度依存的に抑制した。擬似的低酸素条件で ELT-3 細胞の培養液中にメトホルミンを添加した実験では、VEGF と HIF-1 α の蛋白発現量は増加したが、メトホルミン添加により両者は有意に抑制された。一方、メトホルミンは HIF-1 α の mRNA 発現には影響を与えなかったことから、その作用は翻訳後の段階に起因するものと考えられた。これらのメカニズムの解明として、PHD2 の発現をみた実験においてメトホルミンは PHD2 蛋白発現量には変化を

与えなかった。また、mTORC1 関連因子の検討では、メトホルミンが AMPK を活性化し、raptor をリン酸化していた。メトホルミンにより mTORC1 下流の因子である P70S6K と S6 蛋白のリン酸化が抑制されていたことからメトホルミンが ELT-3 細胞において mTORC1 活性を抑制したことが示された。

4 結論

現在までもメトホルミンが血管新生抑制効果を有する事が報告されていたが、本研究によりメトホルミンがラット子宮筋腫細胞株 ELT-3 細胞において VEGF 蛋白発現を抑制し、血管新生効果を有する事が明らかとなった。その機序として、メトホルミンが ELT-3 細胞において mTORC1/HIF-1 α 経路を抑制することに起因する可能性が示唆された。

II 略語

GnRH , gonadotropin releasing hormone; 性腺刺激ホルモン放出ホルモン

AMPK, AMP-activated protein kinase; AMP 活性化プロテインキナーゼ

mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白複合体 1

mTOR, mammalian target of rapamycin; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白

VEGF, vascular endothelial growth factor; 血管内皮細胞増殖因子

HIF-1, hypoxia inducible factor-1; 低酸素誘導因子-1

PHD, prolylhydroxylase; プロリルハイドロキシダーゼ

HRE, hypoxia response element; 低酸素応答性領域

PI3K, phosphatidyl inositol 3-kinase; ホスホイノシチド 3-キナーゼ

TSC2, tuberous sclerosis complex 2; 結節性硬化症複合体 2

DMSO, dimethyl sulfoxide; ジメチルスルホキシド

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, cobalt(II) chloride 6 hexahydrate; 塩化コバルト(II) 6 水和物

FBS, fetal bovine serum; ウシ胎児血清

GPR10, G-protein receptor 10; G 蛋白受容体 10

III 研究背景

子宮筋腫は婦人科領域において最も頻度の高い良性腫瘍であり、過多月経、不妊、骨盤痛など種々の健康障害を引き起こす。子宮筋腫は閉経前女性が子宮摘出に至る主要疾患の一つであり、アメリカでは子宮摘出術の33%を占めるとの報告もある^{1),2)}。

子宮筋腫治療の第一選択は外科的切除であるが、女性の象徴として重要な臓器である子宮を失う喪失感・心理的ショックは大きく、子宮温存治療の要望は強い。薬物療法は最も低侵襲な治療であるが、現在、子宮筋腫に対し用いられているGnRH

(gonadotropin releasing hormone; 性腺刺激ホルモン放出ホルモン)アゴニストは骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状といった重篤な副作用を引き起こすため、長期投与不可能な薬剤である。よって、より良い薬物治療の開発が切望されている。

メトホルミンはビグアナイド系糖尿病治療薬で、2型糖尿病患者に対する第一選択薬として広く処方されている。副作用としては、乳酸アシドーシスや肝機能障害などの報告が認められるが、その発症頻度はいずれも稀である³⁾。また、婦人科領域では多嚢胞性卵巣症候群の排卵障害改善に使用されてきたことから、生殖可能年齢の女性に対して安全に長期使用できる薬物といえる。疫学的調査では、糖尿病患者においてインスリン使用者に比してメトホルミン使用者の癌リスクが有意に低いことが報告されている⁴⁾。加えて、*in vitro*や*in vivo*の研究では、メトホルミンの肺癌・大腸癌・乳癌などに対する腫瘍増殖抑制効果が報告され⁵⁾、近年メトホルミンは抗腫瘍薬として

の一面も注目されている。メトホルミンのこのような抗腫瘍効果にはAMPK (AMP-activated protein kinase; AMP活性化プロテインキナーゼ) / mTORC1(mammalian target of rapamycin complex; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白複合体1)経路が関与している⁶⁾。mTORC1は、セリン/セリオニンキナーゼであるmTOR(mammalian target of rapamycin; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白)の蛋白複合体で、細胞内外のエネルギー・成長因子などに反応して、細胞増殖や代謝を制御する。mTORC1は、細胞内のATP枯渇を感知するエネルギーセンサーであるAMPKによりその活性が抑制される。AMPKが活性化されるとmTORに抑制的に働くTSC2 (tuberous sclerosis complex 2; 結節性硬化症複合体2)とmTORC1の構成蛋白であるraptorの両者、もしくは一方をリン酸化することでmTORC1活性が抑制される⁷⁾。メトホルミンは、AMPKを活性化し、mTORC1およびその下流蛋白質であるS6蛋白質の活性抑制を介して細胞増殖を抑制する事が知られている⁵⁾。さらに、メトホルミンは、上記の細胞増殖抑制効果に加えて、乳癌や膵臓癌でアポトーシスを誘導する事^{8), 9)}や、卵巣癌で血管新生抑制効果を有する事も報告されている¹⁰⁾。

血管新生は、既存血管から新しい血管が発育する生理的プロセスのことをいい、腫瘍の増殖には不可欠であると考えられている。子宮筋腫の詳細な血管新生メカニズムは未だ解明されていない。しかしながら、現在までに筋腫の病態生理学的特徴として血管新生異常や血管新生因子の過剰発現があることが報告されてきた^{11), 12)}。血管新生機構には種々の成長因子やホルモンが関わっている。その中でもVEGF (vascular

endothelial growth factor; 血管内皮細胞増殖因子)は血管新生機構において中心的な役割をもつ因子である事が知られており、血管内皮細胞に作用し血管新生を促進する¹³⁾。VEGFの発現は筋腫組織において周囲の正常筋層と比して増強しており^{14), 15)}、現行の子宮筋腫治療薬であるGnRHアゴニストや選択的プロゲステロン受容体拮抗薬も筋腫のVEGF発現に抑制的に働く事が報告されている^{16), 17)}。よって、VEGFは子宮筋腫治療におけるターゲットとなりうると考えられる。

さらに、低酸素状態は、固形腫瘍がおかれている特徴的な環境の一つであり、血管新生を促進する。VEGF蛋白は、主に低酸素下で誘導され、2量体の転写因子であるHIF-1 (hypoxia inducible factor 1; 低酸素誘導因子1)によってその発現が制御されている¹⁸⁾。酸素の存在下ではPHD (prolylhydroxylase; プロリルヒドロキシダーゼ)が速やかにHIF-1の酸素分圧依存的なサブユニットであるHIF-1 α を水酸化し、分解へと導く。一方、低酸素下ではPHDの機能は抑制されており、その結果HIF-1 α は安定化し、核内へと移行する。核内でHIF-1 α は安定して存在する β サブユニットと複合体を形成し、プロモーター領域のHRE (hypoxia response element; 低酸素応答性領域)に結合し、VEGF mRNAの翻訳に働く¹⁹⁾。このように低酸素下におけるPHDの機能不全は、HIF-1 α 蓄積の主たる要因とされているが、それ以外にHIF-1 α 合成も関与している²⁰⁾。腫瘍細胞においては、しばしば成長因子の刺激によりPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase; ホスホイノシチド3-キナーゼ)/AKT/mTORC1経路活性化を介して、HIF-1 α 合成が促進されている^{21), 22)}。特にmTORC1の活性化はHIF-1 α の発現に不可欠であると報告されてい

る²¹⁾。筋腫組織は著しい低酸素状態にあり²³⁾、mTORC1活性が増強していることが知られている²⁴⁾。また、筋腫組織はHIF-1 α mRNAの発現レベルが上昇していることも報告されており²⁵⁾、子宮筋腫の血管新生系においてmTORC1/HIF-1 α 経路は重要な役割を果たしているものと考えられる。

糖尿病と子宮筋腫の発症に正の相関関係があることは過去に報告されたが²⁶⁾、現在までにメトホルミンを使用している糖尿病患者における筋腫の頻度や大きさについての報告はない。しかしながら、近年子宮筋腫モデルラットのEker ratとモデル細胞株であるELT-3細胞、ヒト筋腫においてmTORC1活性が増強していることが報告され²⁴⁾、mTORC1シグナルをターゲットとするメトホルミンによる子宮筋腫増殖抑制効果が期待される。我々は先行研究で、メトホルミンがラット子宮筋腫細胞において細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する事を示した²⁷⁾。本研究においては、メトホルミンが血管新生因子であるVEGF発現に与える影響について検討した。また、mTORC1およびHIF-1 α 経路に關与するメトホルミンの作用についても検討した。

IV 研究目的

抗糖尿病であるメトホルミンは種々の癌種において、細胞増殖抑制効果や血管新生抑制効果を有する事が報告されてきた。我々は、先行研究においてメトホルミンが子宮筋腫細胞の細胞増殖を抑制する事を示し、メトホルミンが副作用の少ない新しい子宮筋腫治療薬となりうる可能性を示した。そこで、本研究ではラット子宮筋腫細胞を用いてメトホルミンが血管新生因子であるVEGFの発現を抑制するかについて検討した。また、その分子メカニズムの解明を目的としてメトホルミンがmTORC1/HIF-1 α 経路に与える影響についても検討した。

V 研究方法

1. 試薬と抗体

メトホルミンはAlexis Biochemicals (San Diego, CA, USA)より、ラパマイシンはCell Signaling technology (Danvers, MA, USA)よりそれぞれ購入した。DMSO (dimethyl sulfoxide; ジメチルスルホキシド)と $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cobalt (II) chloride 6 hexahydrate; 塩化コバルト(II) 6水和物)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。

抗VEGF抗体はAbcam (Cambridge, MA, USA)より、抗HIF-1 α 抗体はNovus Biologicals (Littleton, CO, USA)より購入した。抗リン酸化mTOR(Ser²⁴⁴⁸)抗体、抗mTOR抗体、抗リン酸化raptor(Ser⁷⁹²)抗体、抗raptor抗体、抗リン酸化AMPK α (Thr¹⁷²)抗体、抗AMPK α 抗体、抗リン酸化p70S6K(Thr³⁸⁹)抗体、抗リン酸化S6リボソーム蛋白(Ser^{235/236})抗体、抗S6リボソーム蛋白抗体、抗PHD-2/Egln1抗体はCell Signaling Technologyより購入した。抗 β -actin抗体はSigma-Aldrichより購入した。ペルオキシダーゼ標識された2次抗体はSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)より購入した。

2. 細胞培養と薬剤添加

Ekerラット由来子宮筋腫細胞株(ELT-3細胞)はDr. C. L. Walker (M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Smithville, USA) より提供を受けた。Ekerラットの子宮筋腫はその表現型や生化学的・遺伝的特徴がヒトの筋腫と類似する²⁸⁾。Ekerラットの

筋腫はmTORC1に抑制的に働くTSC2を欠損しており、結果ヒト筋腫と同じようにmTORC1が活性化されている事が知られている²⁴⁾。ELT-3細胞は37℃、5% CO₂の条件下で、10%のfetal bovine serum (FBS; ウシ胎児血清)を含むDMEM:HAM's F12 (1:1)培養液で培養した^{29), 30)}。細胞は10 mlの培養液を入れた10 cm培養シャーレに播種した。24時間後、細胞が60～70%程度になったところで、シャーレにメトホルミンもしくはmTORC1阻害剤であるラパマイシンを添加した。メトホルミンは超純水で溶解し、濃度1Mで保存、最終濃度が0.5～2.5 mMとなるよう超純水で希釈した。ラパマイシンはDMSOに溶解し、濃度100 μMのストックを作成した後、最終濃度が10～50 μM (0.1% DMSO)となるよう希釈した。コントロールの細胞には、各溶解液(超純水およびDMSO)を同量培養液に添加した。

本研究では、擬似的低酸素条件を得るためにCoCl₂・6H₂Oを使用した。低酸素状態を作り出す2価金属の中でもCoCl₂は、酸素とPHDが反応する過程に必要なFe²⁺の反応を妨げ、結果HIF-1αの安定性を増す事が知られている³¹⁾。CoCl₂・6H₂Oは最終濃度150 μMとなるように、メトホルミンもしくはラパマイシン添加30分後に加えた。CoCl₂・6H₂Oはすべての実験において新たに作成し、超純水で希釈した。

3. 培養上清中の分泌VEGF濃度

ELT-3細胞を2.に示した方法で10 cm培養シャーレで培養した。0.5～2.5 mMのメトホルミンを添加し、48時間もしくは72時間培養を行い、培養上清を回収した。培養上

清中のVEGF濃度はVEGFA Rat ELISA kit (Abcam)を用いて測定した。VEGFAの4つのアイソフォームのうち、VEGF₁₆₅とVEGF₁₂₁は分泌蛋白で可溶性であり、VEGF₁₈₉とVEGF₂₀₆は細胞内に存在する。よって、本キットでは前者2つを検出するものである。すべての実験はtriplicateで行い、測定は分光光度計(Molecular Devices)を用いて450 nmの波長で測定した。

4. SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング

ELT-3細胞を10 cm培養シャーレに細胞密度が60～70%になるように播種した。24時間後、メトホルミンもしくはラパマイシン、必要に応じてCoCl₂・6H₂Oを添加した。24時間後に細胞を回収し、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA)と 0.1% プロテアーゼインヒビターカクテルを含む細胞溶解液で細胞を溶解させた。10%のポリアクリルアミドゲルSuper SepTM Ace (Wako, 大阪, 日本)を使用し、各サンプルについて同量(全細胞蛋白で40 µg、もしくは核蛋白で10 µg)の蛋白を泳動した。その後PVDF膜に転写し、各一次抗体で目標の蛋白質発現を解析し、内在性コントロールとしてβ-actinを用いた。検出はECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Princeton, NJ, USA)を用いて行った。必要時に定量ソフトであるImage J (Rasband WS, 1997-2012: <http://imagej.nih.gov/ij/>)を用い、バンドを定量的に評価した。

5. 逆転写リアルタイムPCR

メトホルミンと $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を添加した細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatworth, CA, USA)を用いてRNAを抽出、Perfect Script RT Master Mix (タカラバイオ, 大津, 日本)を用いて逆転写した。続いて、100 ngのcDNAをSYBR Premix Ex TaqTM II (Tli RNase Plus; タカラバイオ)を用いてThermal Cycler Dice Real Time System Lite (タカラバイオ)で増幅した。プログラムは、95°C5分間で変性、続いて95°C5秒間の変性と60°C30秒間のアニーリングと伸展を40サイクル行った。PCRのプライマーは以下の通りである。

HIF-1 α forward: 5'-TCTAGTGAACAGAACAGGATGGATGGAATGGAT-3'、

reverse: 5'-TCGTAACTGGTCAGCTGTGGTAA-3'

VEGF forward: 5'-GCACGTTGGCTCACTTCCAG-3'

reverse: 5'-TGGTCGGAACCAGAATCTTTATCTC-3'

β -actin forward: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'

reverse: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'

全てのprimerはタカラバイオより購入した。本実験では β -actinを内在性コントロールとして使用した。RNA発現の相対的变化は $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法³²⁾を用いて求めた。

6. 核蛋白抽出と転写活性

ELT-3細胞の培養上清にメトホルミンを添加し、正酸素条件もしくは擬似的低酸素

条件で培養した。細胞回収後、Nuclear Extraction Kit (Cayman; Ann Arbor, MI, USA)を用いて、核蛋白を抽出した。

HIF-1 α の転写活性の検討には、HIF-1 alpha Transcription Factor Assay Kit (Abcam)を用いた。手順は以下の通りである。HIF-1 α response element (5'-ACGTG-3')を含んだ特異的な二本鎖DNAをコーティングした96 well plateに5 μ gの核蛋白を加えた。核蛋白抽出物に含まれた活性型HIF-1 α がこの特異的なresponse elementと結合し、続いてこれをHIF-1 α と特異的に結合する1次抗体、HRP標識された2次抗体で検出した。全ての実験はtriplicateで行い、測定は分光光度計(Molecular Devices)を用いて450 nmの波長で測定した。

7. 統計解析

統計解析は、Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA)のアドインソフトであるエクセル統計 2010 (SSRI, Tokyo, Japan)を用いて行った。解析は ANOVA の Scheffe's F-test で行った。データは平均 \pm S.D.で表記し、統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

VI 研究結果

1. メトホルミンの VEGF 発現に与える影響

メトホルミンを ELT-3 細胞の培養上清に添加し、培養上清中の VEGF 濃度を ELISA で、細胞中の VEGF 蛋白発現をウエスタンブロット法で検討した。48 時間と 72 時間においてメトホルミンは培養上清中の VEGF 濃度を濃度依存的に抑制した(図 1A)。0.5 mM のメトホルミン添加はコントロールに比して有意に VEGF 濃度を抑制した。細胞中の VEGF 蛋白についても同様に、0.5 mM 以上のメトホルミンにおいて濃度依存的に VEGF 蛋白発現が抑制された(図 1B と 1C)。

2. 擬似的低酸素条件におけるメトホルミンの VEGF 発現に与える影響

子宮筋腫組織は低酸素状態にあることが知られていることから²³⁾、低酸素条件下における VEGF と HIF-1 α 蛋白発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した。今回は擬似的低酸素条件を得るために $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を使用した。ELT-3 細胞を 150 μM の $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 下で培養した結果、3 時間後から有意に HIF-1 α の蛋白発現が増強し、24 時間後で最も強い発現がみられた(図 2A)。VEGF の蛋白発現も同様の挙動を示した。

擬似的低酸素条件下でのメトホルミンの VEGF 発現に与える影響について検討するため、ELT-3 細胞を $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ で処理し、メトホルミンを各濃度で添加した。RT-PCR 法を用いて VEGF mRNA の変化を検討した結果、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 添加と共に

VEGF mRNA の発現は増強したが、メトホルミン添加により抑制された（図 2B）。

ウエスタンブロット法および ELISA 法による細胞中、培養上清中の VEGF 蛋白発現の検討においても、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ により VEGF 蛋白発現は増強したが、メトホルミン添加により抑制された(図 2C と 2D)。

3. メトホルミンの HIF-1 α 発現に与える影響

次にメトホルミンが低酸素条件下における ELT-3 細胞の VEGF 発現を抑制するメカニズムを検討した。VEGF は主に低酸素下で誘導され、転写因子である HIF-1 α による制御を受けている事が知られている¹⁸⁾。よって、擬似的低酸素条件下においてメトホルミンが HIF-1 α に与える影響について検討した。ELT-3 細胞に $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ とメトホルミンを添加し、回収した細胞より核蛋白を抽出した後に HIF-1 α の転写活性の検討を行った。その結果、メトホルミンは擬似的低酸素条件下で活性化された結合能のある HIF-1 α 蛋白量を抑制した(図 3A)。今回、有意差が検出されたのはメトホルミン 2.5mM 添加のみであった。同様にウエスタンブロットを用いた核蛋白、細胞全体の HIF-1 α 蛋白発現の検討では、メトホルミンによる有意な HIF-1 α 蛋白発現の抑制がみられた(図 3B と 3C)。しかしながら、RT-PCR を用いた HIF-1 α mRNA レベルの検討においてはメトホルミンによる有意な変化は認められなかった(図 3D)。これらの結果から、メトホルミンの HIF-1 α 抑制は翻訳後の段階に起因するものと考えられた。

低酸素における HIF-1 α 蛋白の蓄積は PHD の機能不全による事が知られている。哺

乳類の細胞において同定されている 3 種類の PHD のうち、PHD2 は最も豊富で主要な酸素分圧センサーである事がすでに分かっている³³⁾。そこで、メトホルミンによる HIF-1 α 抑制が PHD2 蛋白発現の変化によるものか検討するため、抗 PHD2 抗体を用いたウエスタンブロット法による検討を行った。図 3E に示すように、メトホルミンは HIF-1 α 蛋白発現を有意に抑制したのに対して PHD2 蛋白発現には影響を与えなかった。よって、メトホルミンの HIF-1 α 抑制機構には PHD2 蛋白発現量の変化は関与していないものと考えられた。

4. HIF-1 α 抑制機構における mTORC1 の関与

PHD を介する HIF-1 α の分解メカニズムとは別に mTORC1 の活性が翻訳レベルで HIF-1 α の合成を促すことで、HIF-1 α 蛋白蓄積に寄与していることが知られている³⁴⁾。そこで、ELT-3 細胞において HIF-1 α 発現に mTORC1 の活性が必要であるかを検討するため、擬似的低酸素条件下で mTORC1 阻害剤であるラパマイシンを添加した。ウエスタンブロットを用いて HIF-1 α 蛋白発現を検討した結果、ラパマイシンは有意に擬似的低酸素条件下の HIF-1 α 蛋白発現を抑制し、HIF-1 α の発現には mTORC1 の活性が必要である事が示された(図 4A)。次にメトホルミンの AMPK/mTORC1 経路に対する影響を検討するため、ウエスタンブロット法によりリン酸化状態を検討した。メトホルミンは AMPK をリン酸化し、その標的である raptor もリン酸化した(図 4B)。raptor は mTORC1 の構成蛋白の 1 つであり、そのリン酸化は mTORC1 活性の抑制に必須で

あると考えられている³⁵⁾。また、mTORC1の下流シグナルであるp70S6KとS6リボソーマル蛋白のリン酸化も検討した。メトホルミンは両者のリン酸化を抑制したことから、ELT-3細胞においてmTORC1活性を抑制したと考えられた(図4B)。本検討においてはメトホルミンによりmTORC1活性が抑制されたにも関わらず、mTORのSer²⁴⁴⁸残基のリン酸化は活性化されていた(図4B)。Ser²⁴⁴⁸におけるmTORのリン酸化は、mTORC1上流のAKTの活性を反映していると考えられている³⁵⁾。そこで、メトホルミンがAKT活性に与える影響についても検討した。図4Cに示すように、メトホルミンはAKTのリン酸化を活性化していた。

以上より、メトホルミンはELT-3細胞においてAMPKを介しmTORC1の構成蛋白であるraptorをリン酸化し、mTORC1活性を抑制していることが示された。その結果、HIF-1 α の蛋白合成を阻害している可能性が示唆された(図5)。mTORC1活性抑制によるAKTへのフィードバックはp70S6Kを介することが過去に報告されている³⁶⁾。

VII 考察

本研究で、我々はメトホルミンが ELT-3 細胞において VEGF の発現を抑制していることを示した。メトホルミンは、正酸素条件下、また擬似的低酸素条件下のどちらにおいても VEGF 発現を抑制した。これら抑制効果は、従来のメトホルミンの抗腫瘍効果で使われてきた濃度(5-20 mM)⁵⁾より低い、0.5 mM から認められた。これまでに乳癌、前立腺癌、大腸癌、卵巣癌などでメトホルミンの抗腫瘍効果が示されてきた⁵⁾が、本研究ではラット子宮筋腫細胞に対しメトホルミンが VEGF 発現を抑制する事を初めて示し、血管新生抑制効果を有することを示唆した。

子宮筋腫の詳細な血管新生機構は未だ解明されていないが、子宮筋腫を有する子宮においては子宮動脈の血流速度が速く、血管抵抗が低い事が知られている¹⁴⁾。さらに、子宮筋腫を貫く血管は筋層を欠き、その径も異常に細く蛇行している¹⁴⁾事から、子宮筋腫の病態には血管新生の異常が関わっているものと考えられてきた。血管新生因子の中でも、VEGF は筋腫患者において血中濃度が高く³⁷⁾、周囲の正常筋層と比較して筋腫組織において過剰発現している事が知られている^{14), 15)}。その発現は同一の筋腫の中でもばらつきがあり、血管の少ない筋腫中心部から血管豊富な筋腫辺縁部にかけ、血管数と一致するように増加している³⁸⁾。また、子宮筋腫移植モデルを作成する際に移植組織の増殖を保つため VEGF の過剰発現が必要であることが報告された³⁹⁾。一般的に良性疾患における抗血管新生療法の意義は確立されていないが、上記より判断して VEGF は筋腫増殖において重要な因子と考えられ、筋腫治療における重要な

標的になりえると考えられる。

本研究ではメトホルミンがELT-3細胞においてVEGF発現を抑制するということを示し、さらにその分子機構についても検討した。メトホルミンはPHD2発現に変化を与えず、mTORC1活性を抑制することでHIF-1 α 合成を抑制し、HIF-1 α 蛋白の蓄積を抑えた。mTORC1の活性は翻訳レベルでHIF-1 α 合成を制御することが知られている³⁴⁾が、この事は本研究でメトホルミンがHIF-1 α mRNAレベルに有意な変化を与えなかった事とも一致する。加えて、mTORC1阻害剤であるラパマイシンはHIF-1 α 蛋白の発現を完全に抑制し、HIF-1 α 蛋白の発現にはmTORC1の活性が必要であることを示した。以上よりメトホルミンはmTORC1活性をHIF-1 α の翻訳レベルで抑制し、その結果としてVEGFの発現を抑制した可能性が示唆された。VEGFの制御にはHIF-1 α 以外の経路の可能性も過去に報告されている⁴⁰⁾ことから、メトホルミンによるVEGF発現低下の全てをmTORC1/HIF-1 α 経路で説明する事が出来るとは限らない。しかし、本研究においてメトホルミンの血管新生抑制効果が示されたことから、子宮筋腫の新たな治療薬としての可能性が示されたと考えられる。

これまで子宮筋腫に対する薬物療法は、GnRHアゴニストを中心に使用されてきたが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状といった副作用の問題から長期投与が出来ない。一方、メトホルミンはすでに多嚢胞性卵巣症候群の排卵障害改善に汎用されており、副作用は稀であることが知られている。よって、メトホルミンは生殖可能年齢女性に対し長期投与が可能であると考えられる。糖尿病と子宮筋腫の発症には関連性が認めら

れるという報告が過去にはある²⁶⁾が、メトホルミン内服の糖尿病患者と子宮筋腫のリスクの関係についてのデータはなく、この両者の調査は今後の臨床研究として必要であると考えられる。

メトホルミンの抗腫瘍効果の研究においては、AMPK/mTORC1 経路が中心的な役割を担うとされてきた⁵⁾。我々の先行研究においても、メトホルミンの子宮筋腫細胞増殖抑制効果は AMPK を介して mTORC1 活性が抑制されることによるものと考えられた²⁷⁾。mTORC1 は mTOR の蛋白複合体の一つで、成長因子、栄養、エネルギーに反応して、細胞増殖や代謝を制御する。mTORC1 は癌や代謝異常などあらゆる疾患で発現が増強していることが知られている³⁶⁾が、ヒト及びラットの筋腫も例外ではない²⁴⁾。最近になり、mTORC1 の上流シグナルである GPR10 (G-protein receptor 10; G 蛋白受容体 10)がヒトの筋腫で過剰発現していることが報告された⁴¹⁾。さらに、子宮にヒト GPR10 を発現しているトランスジェニックマウスにおいて筋腫様腫瘍が発生したことも報告され⁴¹⁾、mTORC1 およびその関連分子がヒト筋腫発生において主要な役割を担っている可能性が示唆された。Raptor は mTORC1 を構成する要素の一つであり、mTOR と相互反応する物質を集めるアダプターのような役割を担っている³⁵⁾。よって、raptor のリン酸化は mTORC1 活性の抑制を意味する。従来、AMPK の mTORC1 に与える効果は TSC2 を介するものと考えられてきた。TSC2 は TSC1/TSC2 (hamartin/tuberin)複合体のサブユニットの一つで、mTORC1 に抑制的に作用する⁴²⁾。

しかしながら、近年になり raptor が TSC2 を介さない AMPK の標的として報告された

7)。本検討においても TSC2 を発現しない ELT-3 細胞において、メトホルミンによる AMPK 活性化が mTORC1 活性を抑制したことから、AMPK による raptor のリン酸化が作用したものと考えられる。

本検討においては、メトホルミンは mTORC1 の活性を抑制した一方で mTOR をリン酸化した。Ser²⁴⁴⁸ 残基における mTOR のリン酸化は細胞の生存を制御するキナーゼである AKT 活性に反映する事が示されている³⁶⁾。本検討においてもメトホルミンは ELT-3 細胞において AKT を活性化しており、それによって mTOR のリン酸化が増強したと考えられた。この AKT に対するフィードバックは、現在までにいくつかのもの mTORC1 阻害剤で報告されてきたが、その意義は未だ解明されていない⁴³⁾。

メトホルミンは糖尿病や多嚢胞性卵巣症候群の患者に対して世界中で広く使われてきた薬であるが、その抗腫瘍効果が注目されてきたのはここ 10 年のことである。多くの研究においては成長促進ホルモンであるインスリンの血中濃度の低下と AMPK を介する mTORC1 経路の抑制がその抗腫瘍効果の中心であると報告されてきた⁵⁾。前述のように、mTORC1 活性は VEGF や血管新生系を主に制御する HIF-1 α 蛋白の合成に関与しており、メトホルミンは腫瘍細胞において血管新生抑制効果を有する可能性がある。近年には卵巣癌モデルにおいてメトホルミンが VEGF の発現と血管密度を抑制し、血管新生抑制効果を有する事が報告された¹⁰⁾。腫瘍以外においても、メトホルミンは多嚢胞性卵巣症候群⁴⁴⁾ と齧歯類の海綿移植モデル⁴⁵⁾において血管新生を抑制したことが報告されている。このような血管新生抑制効果は、現在までに確

立されてきた細胞増殖抑制効果と合わせてメトホルミンの抗腫瘍効果をより確実なものにすると考えられる。

さらに、子宮筋腫の治療において使用可能な薬物治療は GnRH アゴニストなどで排卵を抑制するために妊娠希望のある患者には使用できないものであった。メトホルミンは妊娠を希望する患者でも使用できるというメリットがあり、将来の子宮筋腫治療において新たな可能性を示したものと考ええる。さらにメトホルミンは前述のように多嚢胞性卵巣症候群の患者への投与経験が豊富であり生殖年齢女性における安全性も確立されているため、長期投与が可能である点も今後の筋腫治療を考えるうえで重要である。

本検討は全て ELT-3 細胞における検討であり、他の細胞におけるメトホルミンの VEGF に対する効果は不明である。また、本研究は全て *in vitro* での実験に基づくものであり、メトホルミンとヒト子宮筋腫の臨床的な関連についての検討は今後の課題である。子宮筋腫における基礎研究の課題の一つは適切な *in vivo* モデルの欠如である。この問題点を克服するために、我々は新たにヒト子宮筋腫移植モデルマウスを確立した⁴⁶⁾。このモデルマウスは、手術で摘出されたヒト子宮筋腫を 3mm 長、2mm の厚さに切除し、17 β -エストラジオール放出ペレットを予め移植した 8 週齢の雌 NOG マウスの背部に移植したものである。移植片を検討すると、移植より 8 週にわたって子宮筋腫の組織学的特徴や、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体などの発現が維持されていた。我々は今後このヒト子宮筋腫移植モデルマウスを用いてメトホ

ルミンの効果を検討する予定である。さらには、メトホルミンがすでに広く使用されている薬物であることから、子宮筋腫を有する糖尿病患者においてメトホルミンを投与した場合の筋腫サイズの変化について検討することもメトホルミンの効果を知る上では非常に有用であると考えられる。

VIII 結論

メトホルミンはラット子宮筋腫細胞株 ELT-3 において VEGF の発現を抑制した。今回のメトホルミンによる VEGF の発現抑制は mTORC1/HIF-1 α 経路が抑制されたことによるものと考えられた。

以上の結果より、メトホルミンがヒト子宮筋種の血管新生を抑制する可能性があり、子宮筋腫治療におけるメトホルミンの臨床応用が期待される。

IX 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東北大学大学院医学系研究科医学専攻 発生・発達医学講座婦人科学分野 八重樫伸生教授、ならびに本研究の遂行にあたり終始御指導を賜りました近畿大学東洋医学研究所 武田卓教授(東北大学医学部客員教授兼任)に心から厚く御礼申し上げます。また、実験にご協力いただきました築地謙治先生(東北大学大学院医学系研究科婦人科学分野助教)および李賓先生(東北大学東北メディカル・メガバンク機構地域医療支援部門研究支援者)に心より感謝いたします。

X 文献

- 1) Wilcox LS, Koonin LM, Pokras R, et al: Hysterectomy in the United States, 1988-1990. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 549-555.
- 2) Walker CL, Stewart EA: Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 2005; 308: 1589-1592.
- 3) Bailey CJ, Path MR, Turner RC: Metformin. *N Eng J Med* 1996; 334: 574-579.
- 4) Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, et al: New users of metformin are at low risk of incident cancer. *Diabetes Care* 2009; 32: 1620-1625.
- 5) Sahra IB, Marchand-Brustel YL, Tanti JF, et al: Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1092-1099.
- 6) Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, et al: Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for the breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10269-10273.
- 7) Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al: AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30: 214-226.
- 8) Liu B, Fan Z, Edferton SM, et al: Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 2009; 8: 2031-2040.
- 9) Wang LW, Li ZS, Zou DW, et al: Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7192-7198.
- 10) Rattan R, Graham RP, Maguire JL, et al: Metformin suppresses ovarian cancer growth and

- metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity *in vivo*. Neoplasia 2011; 13: 483-491.
- 11) Fleischer R, Weston GC, Vollenhoven BJ, et al: Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2008; 22: 603-614.
- 12) Tal R, Segars JH: The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. Hum Reprod Update 2014; 20: 194-216.
- 13) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 2004; 9: 2-10.
- 14) Hague S, Zhang L, Oehler MK, et al: Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. Clin Cancer Res 2000; 6: 2808-2814.
- 15) Gentry CC, Okolo SO, Fong LF, et al: Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. Clin Sci (Lond) 2001; 101: 691-695.
- 16) Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, et al, Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. J Soc Gynecol Investig 2005; 12: 123-128.
- 17) Xu Q, Ohara N, Chen W, et al: Progesterone receptor modulator CDB-2914 downregulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. Hum

Reprod 2006; 21: 2408-2416.

- 18) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 1996; 16: 4604-4613.
- 19) Shofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 343-354.
- 20) Garcia-Maceira P, Mateo J: Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signaling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. Oncogene 2009; 28: 313-324.
- 21) Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, et al: Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 α , HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. J Biol Chem 2004; 279: 45643-45651.
- 22) Karar J, Maity A: PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. Front Mol Neurosci 2011; 4: 1-8.
- 23) Mayer A, Hockel M, Wree A, et al: Lack of hypoxic response in uterine leiomyomas despite severe tissue hypoxia. Cancer Res 2008; 68: 4719-4726.
- 24) Crabtree JS, Jelinsky SA, Harris HA, et al: Comparison of human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway. Cancer Res 2009; 69: 6171-6178.
- 25) Hou P, Zhao L, Li Y, et al: Comparative expression of thioredoxin-1 in uterine

- leiomyomas and myometrium. *Mol Hum Reprod* 2013; 20: 148-154.
- 26) Okolo S: Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008; 22: 571-588.
- 27) Li B, Takeda T, Tsuiji K, et al: The antidiabetic drug metformin inhibits uterine leiomyoma cell proliferation via an AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 87-90.
- 28) Walker CL, Hunter D, Everitt JJ: Uterine leiomyoma in Eker rat: A unique model for important diseases of women. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 349-356.
- 29) Howe SR, Gottardis MM, Everitt JJ, et al: Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Establishment and characterization of tumor-derived cell lines. *Am J Pathol* 1995a; 16: 1568-1579.
- 30) Howe SR, Gottardis MM, Everitt JJ, et al: Estrogen stimulation and tamoxifen inhibition of leiomyoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 1995b; 136: 4996-5003.
- 31) Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T: Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by the direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 2003; 278: 15911-15916.
- 32) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001; 25 402-408.
- 33) Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al: HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor

setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. EMBO J 2003; 22: 4082-4090.

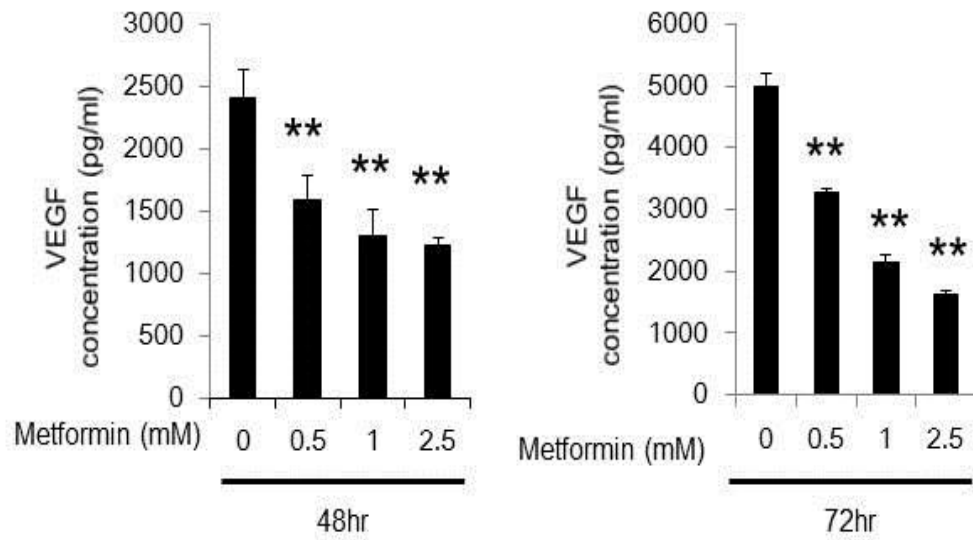
- 34) Laughner E, Taghavi P, Chiles K., et al: HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol 2001; 21: 3995-4004.
- 35) Hara K, Maruki Y, Long X, et al: Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell 2002; 110: 177-189.
- 36) Wullschleger S, Loewith R, Hall MN: TOR signaling in growth and metabolism. Cell 2006; 124: 471-484.
- 37) Huang R, Lin Y, Shi Q, et al: Enhanced protein profiling arrays with ELISA-based amplification for high-throughput molecular changes of tumor patient's plasma. Clin Cancer Res 2004; 10: 598-609.
- 38) Wei JJ, Zhang XM, Chiriboga L, et al: Spatial differences in biologic activity of large uterine leiomyomata. Fertil Steril 2006; 85: 179-187.
- 39) Hassan MH, Eyzaquirre E, Arafa HM, et al: Memy I: a novel murine model for uterine leiomyoma using adenovirus-enhanced human fibroid explants in severe combined immune deficiency mice. Am J Obstet Gynecol 2008; 199: 156. e1-8.
- 40) Slomiany MG, Rosenzweig SA: Hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor

secretion. J Pharm Exp Ther 2006; 318: 666-675.

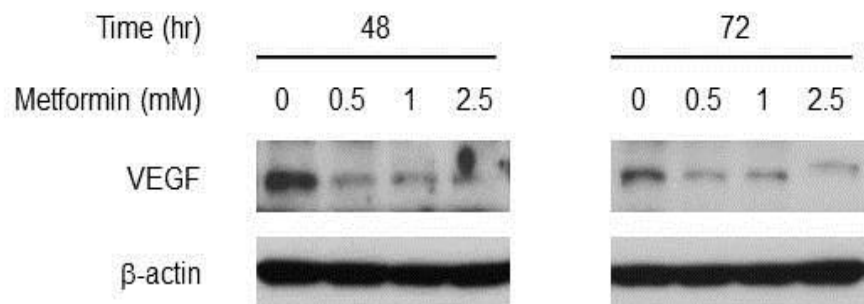
- 41) Varghese BV, Koohestani F, McWilliams M, et al: Loss of repressor REST in uterine fibroids promotes aberrant G protein-coupled receptor 10 expression and activates mammalian target of rapamycin pathway. Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 2187-2192.
- 42) Li Y, Corradetti MN, Inoki K, et al: TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. Trends Biochem Sci 2004; 29: 32-38.
- 43) O'Reilly KE, Rojo F, She Q, et al: mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates AKT. Cancer Res 2006; 66: 1500-1508.
- 44) Tan BK, Adya R, Chen J, et al: Metformin decreases angiogenesis via NF- κ B and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1. Cardiovasc Res 2009; 83: 566-574.
- 45) Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, et al: Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. Biomed Pharmacother 2010; 64: 220-225.
- 46) Tsuiji K, Takeda T, Li B, et al: Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. Tohoku J Exp Med 2010; 222: 55-61.

XI

1A



1B



1C

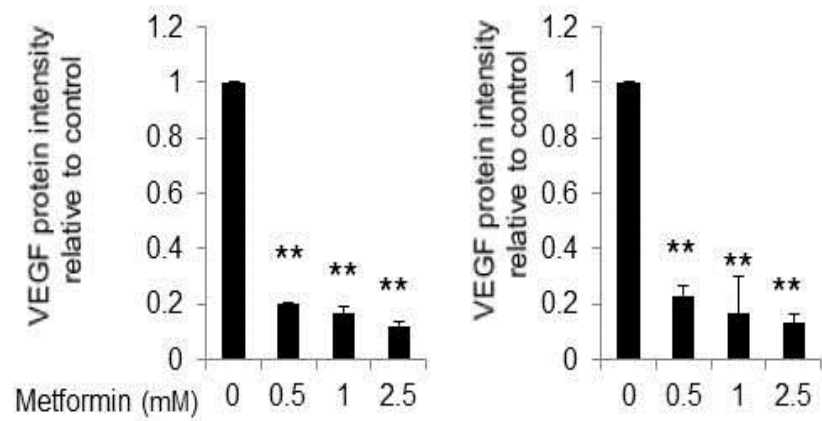


图 2A

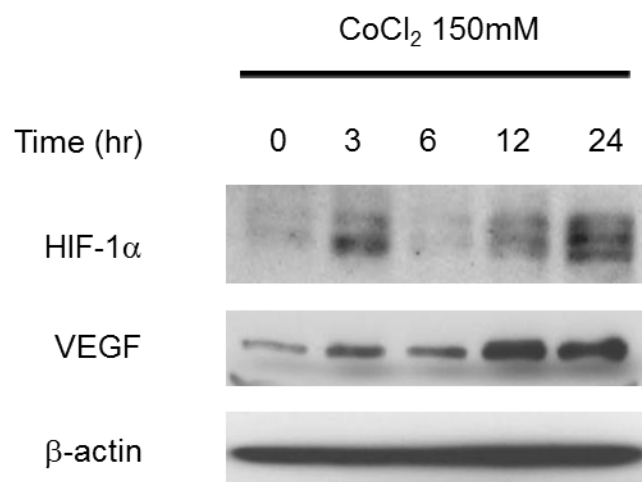


图 2B

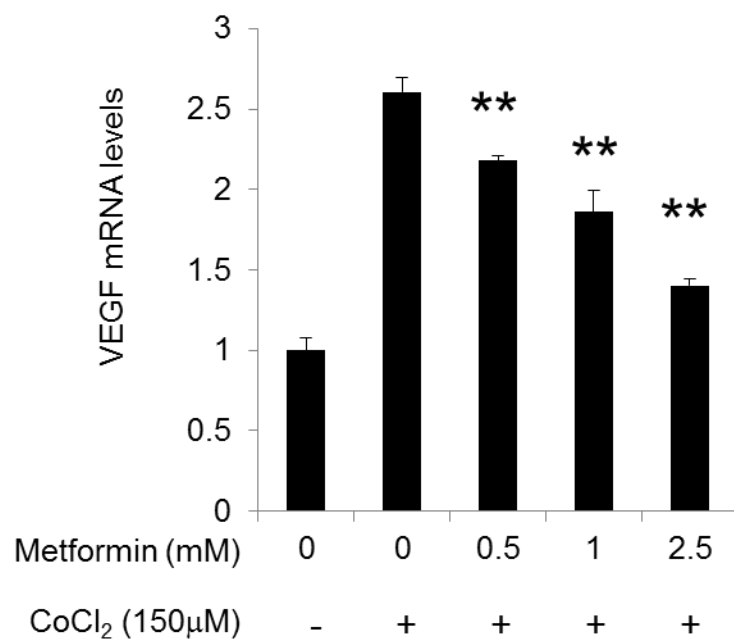


图 2C

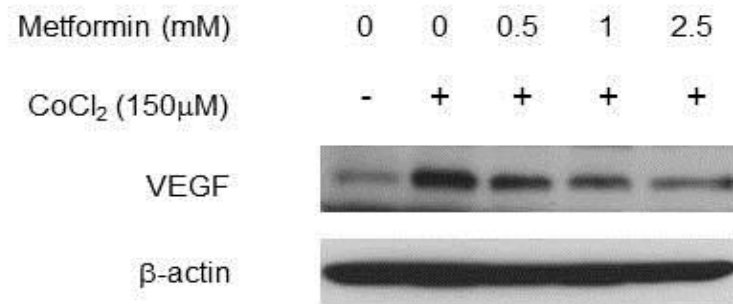


图 2D

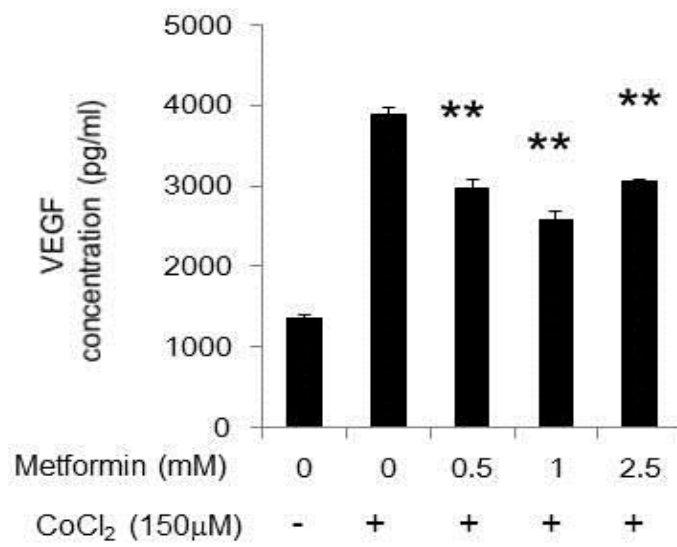


图 3A

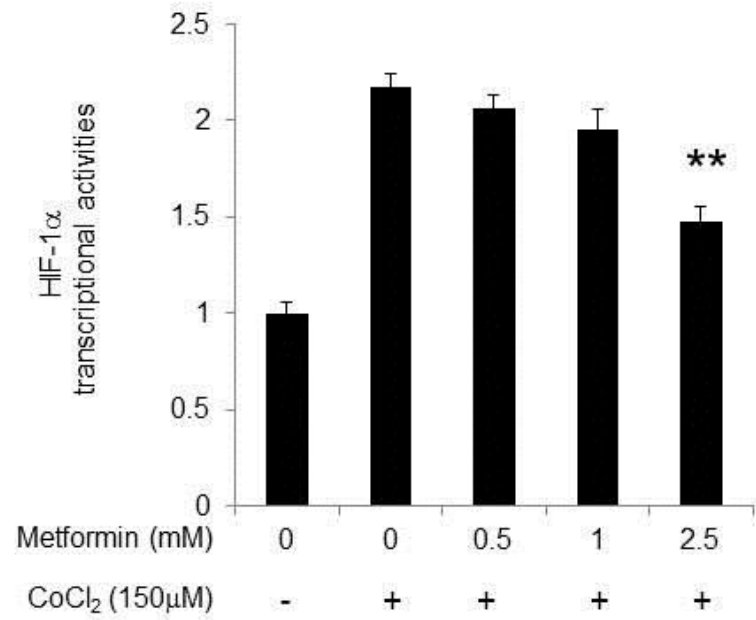


图 3B

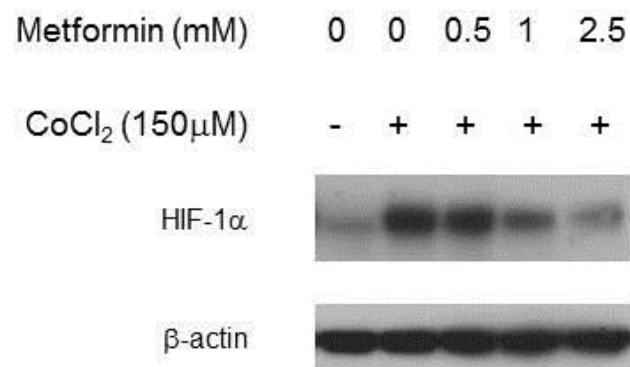


图 3C

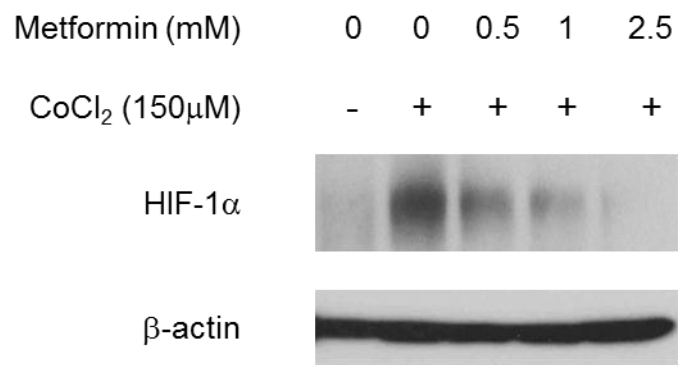


图 3D

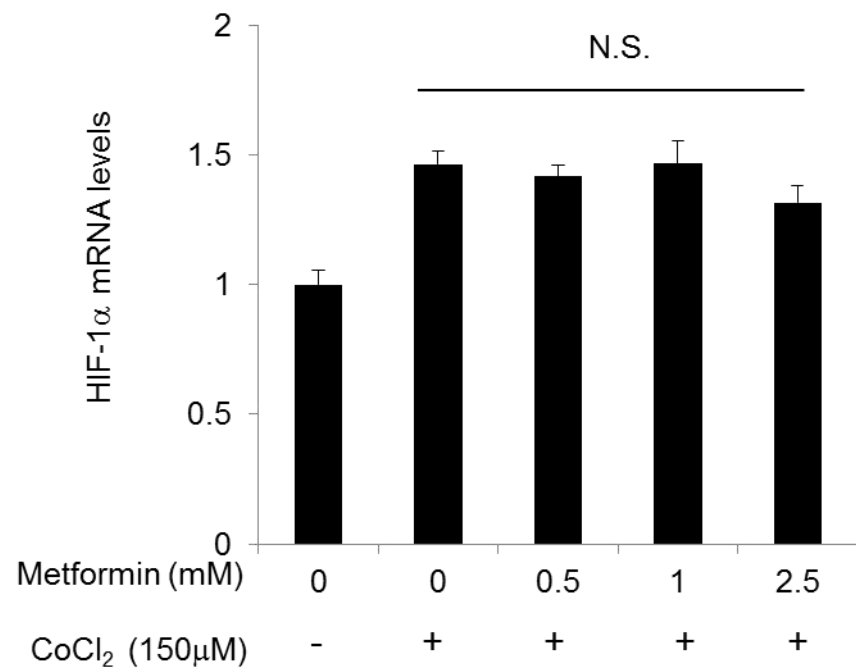


图 3E

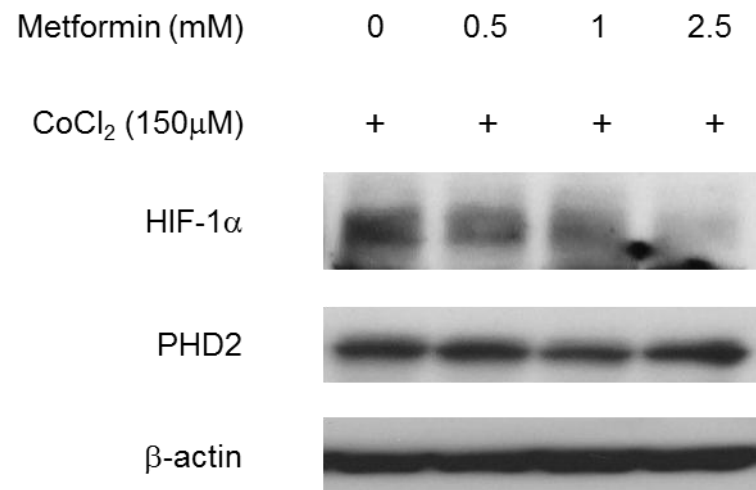


Figure 4A

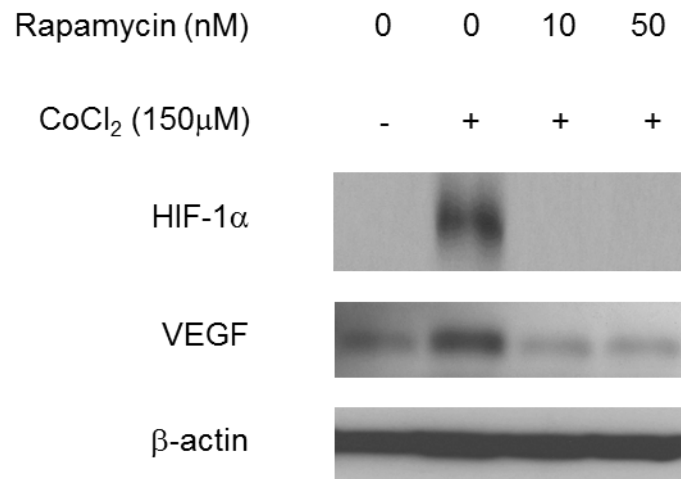


图 4B

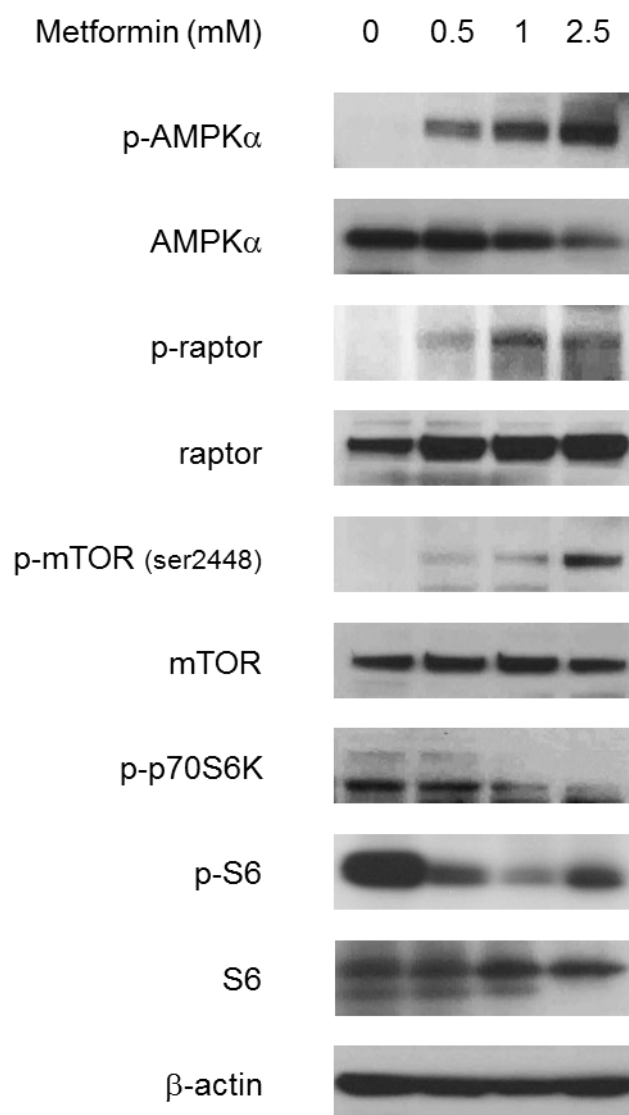


图 4C

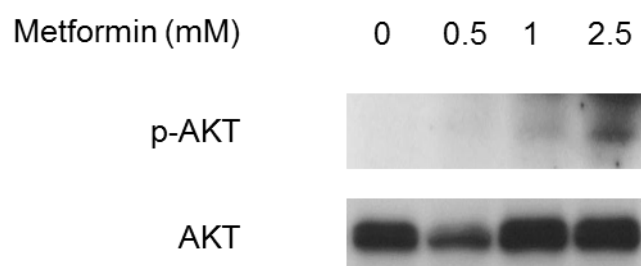
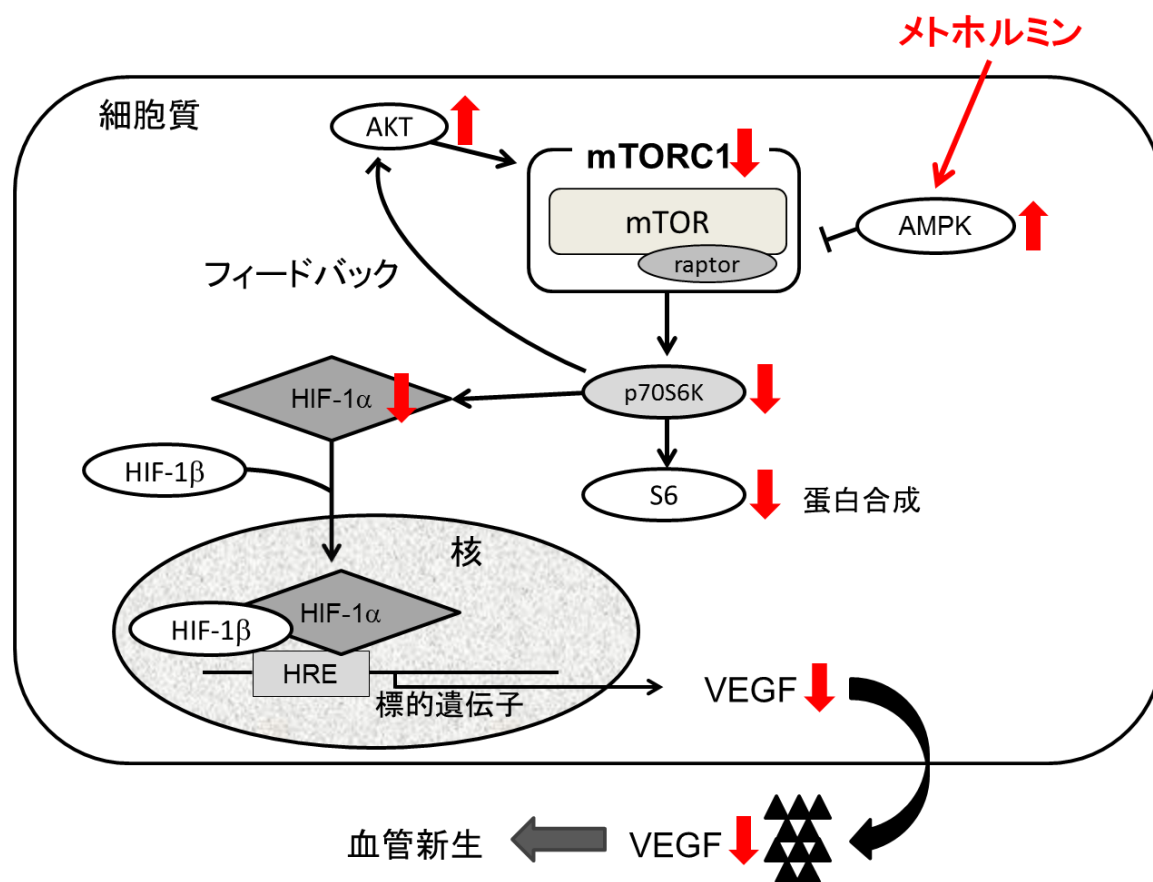


図 5



XII 図説明

(図 1)

ELT-3 細胞におけるメトホルミンの VEGF に対する効果

(A) 正酸素下でメトホルミンを ELT-3 細胞に添加し、48 時間および 72 時間後の培養上清を回収した。培養上清中の VEGF 濃度は ELISA キット(VEGFA Rat ELISA kit; Abcam)を用いて計測し、**はコントロールと比較して $p<0.01$ を示した。その結果、培養上清中の VEGF 濃度は 48 時間、72 時間ともにメトホルミン 0.5mM から有意に抑制されており、濃度依存的であった。(B) メトホルミンを ELT-3 細胞に添加し、48 時間および 72 時間後の細胞を回収、細胞蛋白を抽出した。(C)は(B)で得られたバンドを定量的に計測したものを示した。各時間のコントロールを 1.0 として表示し、**はコントロールと比較して $p<0.01$ を示した。その結果、細胞中の VEGF 蛋白発現は 48 時間、72 時間ともにメトホルミン 0.5mM から有意に抑制されており、濃度依存的だった。

(図 2)

擬似的低酸素条件におけるメトホルミンの ELT-3 細胞の VEGF 発現に与える影響

(A) 擬似的低酸素条件を得るため、ELT-3 細胞に $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM を添加し、培養した。ウエスタンブロット法により HIF-1 α および VEGF 蛋白の発現量を検討した結

果、3 時間以上で両者の蛋白発現の増加を認めた。(B) (C) (D) ELT-3 細胞にメトホルミンを添加した後、30 分後に $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM を添加した。24 時間後に細胞および培養上清を回収した。細胞より RNA と細胞蛋白を抽出し、リアルタイム PCR(B)、ウエスタンブロットを行った(C)。リアルタイム PCR はメトホルミン 0 mM、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 非添加群を 1.0 として表示し、**はメトホルミン 0 mM、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM と比較して $p < 0.01$ を示した。VEGF mRNA、蛋白発現ともに $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM 添加で増加したが、メトホルミンはそれを有意に抑制した。メトホルミン 0.5mM より有意な抑制効果を認めた。(D)ELISA キット(VEGFA Rat ELISA kit; Abcam)を用いて培養上清中の VEGF 濃度を計測した。**はメトホルミン 0 mM、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM と比較して $p < 0.01$ を示した。結果、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM 投与により培養上清中の VEGF 濃度は増加したが、メトホルミン投与がそれを有意に抑制していた。

(図 3)

ELT-3 細胞におけるメトホルミンの擬似的低酸素条件下で誘導された HIF-1 α 蛋白発現と転写活性に与える影響

(A) (B) ELT-3 細胞にメトホルミンを添加した後、30 分後に $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM を添加した。24 時間後に細胞を回収し、核蛋白質を抽出した。核蛋白中の結合能を有する HIF-1 α および HIF-1 α 蛋白発現の変化について HIF-1alpha Transcription Factor Assay Kit (Abcam)およびウエスタンブロット法で検討した。結果、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μM 投与によ

り結合能のある HIF-1 α 蛋白、および HIF-1 α 蛋白自体の発現は増加したが、メトホルミンが有意にそれを抑制した。結合能のある HIF-1 α 蛋白においてはメトホルミン 2.5mM でのみ有意差を認めた。また、同様の条件下で培養した ELT-3 細胞の細胞蛋白と mRNA を抽出し、全細胞中の HIF-1 α 蛋白と HIF-1 α mRNA 発現の変化について、ウエスタンブロット法(C)とリアルタイム PCR を行った(D)。細胞中の HIF-1 α 蛋白発現は(B)同様に CoCl₂·6H₂O 150 μ M で増加し、メトホルミンで有意に抑制されていた(C)が、HIF-1 α mRNA 発現においてはメトホルミンによる変化は認められなかった(D)。(E)抗 HIF-1 α 抗体および抗 PHD2 抗体を用いたウエスタンブロット法では、メトホルミンが HIF-1 α 蛋白発現を有意に抑制したのに対して、メトホルミンは PHD2 蛋白発現には影響を与えなかった(E)。**はメトホルミン 0 mM、CoCl₂·6H₂O 150 μ M と比較して p<0.01 を示した。

(図 4)

メトホルミンの ELT-3 細胞における HIF-1 α 抑制機構における mTORC1 活性の関与

(A) ラパマイシン(mTORC1 阻害剤)を ELT-3 細胞に添加した後、30 分後に CoCl₂·6H₂O 150 μ M を添加した。24 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法により HIF-1 α および VEGF 蛋白発現の検討を行った。結果、CoCl₂·6H₂O 150 μ M は HIF-1 α および VEGF 蛋白の発現を増加させたが、ラパマイシンはそれを有意に抑制した。(B) (C) メトホルミンを ELT-3 細胞に添加し、48 時間後細胞を回収し細胞蛋白を抽出した。抗リ

ン酸化 AMPK α 抗体、抗リン酸化 raptor 抗体、抗リン酸化 mTOR(ser²⁴⁴⁸)抗体、抗リン酸化 p70S6K 抗体、抗リン酸化 S6 抗体および抗 AKT 抗体を用いてウエスタンブロット法を行った。その結果、メトホルミンは AMPK- α および raptor をリン酸化した。また、mTORC1 下流の p70S6K および S6 蛋白のリン酸化が抑制されていた。一方で、メトホルミンは mTOR(Ser2448)のリン酸化を誘導した(B)。メトホルミンは AKT 活性を誘導したことも示された(C)。

(図 5)

ELT-3 細胞においてメトホルミンは mTORC1 活性抑制を通じて血管新生を抑制した。mTORC1 は細胞において細胞増殖や蛋白合成に働く。一方、血管新生因子である VEGF は主に HIF-1 α の制御を受ける。正酸素下では HIF-1 α が分解へ導かれるのに対して、低酸素下では HIF-1 α は安定し核内へ移動、細胞内に安定して存在する HIF-1 β と 2 量体を形成し HRE に結合し、VEGF や血管新生を誘導する。また、PHD が関与する HIF-1 α の分解メカニズムではなく mTORC1 が関わる HIF-1 α 蛋白合成がその発現に重要である。今回明らかとなったメトホルミンの作用を赤矢印で示す。メトホルミンは AMPK を活性化し、その標的である raptor をリン酸化する事で mTORC1 活性を抑制した。その結果、S6 蛋白質を介して蛋白合成が抑制され、細胞増殖が抑制された。また、mTORC1 活性の低下により HIF-1 α 蛋白の合成が抑制され、VEGF 発現が低下した。