




## 学位論文審査の結果の要旨

平成 27 年 11 月 18 日

審査委員	主査	辻 晃仁 		
	副主査	河野 雅和 		
	副主査	舩形 尚 		
願出者	専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
	学籍番号	09D743	氏名	藤森 崇行
論文題目	Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma: In vitro and in vivo studies			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

## 〔要旨〕

【目的】胆管癌は胆道癌の中で最も多く、原発性肝癌においても肝細胞癌に次いで多い疾患である。我が国の2013年の胆嚢・胆管癌死亡数は男性約8900人および女性約9300人で、それぞれ癌死亡全体の約4%および6%を占めている。胆管癌は黄疸以外には自覚症状に乏しく、早期発見が難しい。治療としては手術療法、全身化学療法などがあるが、診断時に既に遠隔転移を有するなど手術適応にならないことも多いのが現状である。よって、進行癌に対して、副作用の少なく効果的な抗癌剤治療の発見が未だに必要とされている。

最近、抗糖尿病薬であるMetforminが、前立腺癌、乳癌に対して抗癌作用を持つことが報告されている。更には糖尿病患者の中でMetformin内服患者が非内服者と比べて有意に膵臓癌発生者が少ないとの報告も認められる。今回、我々は、Metforminの胆管癌に対する抗癌作用を培養細胞株、実験モデル動物を用いて検討した。加えて、近年、研究の進んでいるmicroRNAs（細胞内に存在する、長さ20から25塩基ほどの1本鎖RNA）についてmicroarrayを用いて網羅的に解析を行ったため、併せて報告する。

【方法】1. *in vitro*の系：胆管癌細胞株としHuCCCT-1, TFK-1を使用し、Metformin投与による細胞増殖をcell proliferation assayにより検討し、種々の細胞周期関連分子の発現動態はWesternblot法により検討した。また、Metformin投与がHuCCCT-1細胞株の細胞周期にどのように変化を与えるかを、フローサイトメトリーを利用し検討した。更にはMetformin投与により、誘導されうるmiRNAsを1000分子のmiRNAsが搭載されたアレイチップを用いて網羅的に検討した。2. *in vivo*の系：HuCCCT-1細胞をヌードマウスに皮下移植し、Metforminが、*in vivo*においても増殖を抑制するかを検討し、胆管癌細胞株におけるMetformin投与による細胞周期関連分子、miRNAsについても、*in vitro*の系と同様に検討した。

【結果】1. *in vitro*の系：Metformin投与群は非投与群と比較して、2種類の胆管癌細胞株で増殖は抑制されていた。Metformin投与は非投与と比較し、CyclinD1, Cdk4の発現が抑制され、Rb, EGFRのリン酸化は低下していた。また、フローサイトメトリーにおける検討でも、Metformin投与群は胆管癌細胞株をG1停止に導いていた。Metformin投与により、46種類のmiRNAsの発現動態が有意に変化し、特にmiR-302 familyの発現は昂進していた。2. *in vivo*の系：Metformin



投与は、胆管癌細胞の増殖を顕著に抑制し、さらにmiRNAsの動態変化も*in vitro*の系に類似していた

【結論】Metforminが胆管癌対し抗癌作用を持つことを*in vitro*, *in vivo*の系において証明した。さらに、そのMetforminの抗癌作用の一つに癌抑制miRNAsを誘導し、細胞周期のG1期で停止させることにより癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。Metforminは1950年代に開発され、安価で副作用の少ない糖尿病薬と認知されていて、臨床応用に移行しやすい状況にあると思われる。この検討により、Metforminが有用な胆管癌の新たな治療法となりうる可能性が示唆された。

【質疑・応答】

① 糖尿病や肥満患者に胆管癌の患者は多いか？

→糖尿病患者は非糖尿病患者に比べ、20～30%程度、癌発症のリスクが高いとの報告あり。

② 糖尿病に対しメトホルミン内服にて加療中の患者の中で、糖尿病コントロールが良好な群と不良な群における発癌率の違いはあるか？

→これまでに調べた文献において、そのようなデータは見当たらなかったが、検討すべき項目と思われる。

③ メトホルミンの濃度設定はどのように決めたか？

→*in vitro*の検討では、溶媒中のグルコース濃度がかかなり高いため、実臨床の血中濃度(約100μM)より高い濃度設定とした。*in vivo*の検討では、マウスの体重から換算し、投与量が実臨床に近い値となるように設定した。

④ microRNAを調べてみようと思ったきっかけは？

→メトホルミンの作用機序についてはいろいろな報告があるが、実際はまだ不明な点が多い。AMPKαのリン酸化により、下流にあるmTORが阻害されるというメカニズムが考えられているが、実際は癌種によって違いがある。AMPKインヒビターを使用して比較すると、AMPKはあまり関与していないような結果となった報告もある。レセプター型チロシンキナーゼも、癌種によって抑制されるものが様々であり、どういった因子がそのようなし違いを生むのか、さらなる検討が必要である。microRNAは薬剤効果や薬剤耐性にも関連があり、メトホルミンの抗腫瘍効果にも関連があると考えられたため検討した。

⑤ 他に有意差があったmicroRNAは？

→メトホルミンにより抑制されたmicroRNAの中にmiR548というものがある。乳癌細胞についての検討で、over expressionさせると増殖が抑えられたり、アポトーシスが増えるといった報告がある。

⑥ 今後の検討について、既存治療への上乗せ効果の比較検討において、治療開発としてはゲムシタビン、シスプラチンの2剤は除き、メトホルミンをlast lineとして有用であるかどうか検討したほうがよいと考えられる。さらに、糖尿病を合併している胆管癌患者での、さらなる検討がひつようであると思われる。

平成27年11月11日に学位論文公開審査会が開催され、論文の内容や発表、質疑応答を通して、審査員一同、藤森崇行氏が医学博士の学位に値すると判断した。

掲載誌名	Oncology Reports		
	DOI: 10.3892/or.2015.4284		
(公表予定) 掲載年月	平成27年 9月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1,500字以内にまとめてください。