

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15612

研究課題名(和文) 肝癌の進展におけるインスリン受容体基質(Irs)の役割

研究課題名(英文) Role of insulin receptor substrates in the progression of hepatocellular carcinoma

研究代表者

桜井 賛孝 (Sakurai, Yoshitaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70748376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌では種々のシグナル経路が活性化していることが知られている。多くの疫学研究で肥満や糖尿病と肝癌の強い関連が報告されているが、肥満と糖尿病に共通するのはインスリン抵抗性に起因する高インスリン血症である。肝癌形成におけるインスリンシグナルの寄与は不明な点が多いため、両シグナル上流に位置するインスリン受容体基質(Irs)1、Irs2に着目し、肝臓特異的Irs1欠損マウス、肝臓特異的Irs2欠損マウスに薬剤で肝癌を誘発し表現型を解析した。一連の解析の結果、肝癌形成時にWnt経路の亢進により発現増加したIrs1がインスリンシグナルの活性化に関与し、肝癌進展において重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LIrs1KO、LIrs2KOマウスは通常食下では脂肪肝を伴わず、正常耐糖能に近いことが先行研究や本研究で明らかになっている。高血糖や脂肪肝は肝癌の増悪因子であることが報告されているが、今回我々は、LIrs1KO、LIrs2KOマウスにDENで肝癌を誘発し、通常食下で観察することにより、高血糖や脂肪肝などの肝癌発症における交絡因子を除外した状態でインスリンシグナル関連分子の肝癌形成における役割を評価できた。LIrs1KOマウスで肝癌の進展が抑制されたことを踏まえると、今後Irs1が肝癌治療の分子ターゲットになる可能性もあると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of insulin receptor substrate (Irs) 1 and Irs2, both of which are the major molecules to be responsible for transducing insulin/IGF signaling in the liver, in the development of HCC by inducing chemical carcinogenesis using diethylnitrosamine (DEN) in mice. Liver-specific Irs1-knockout (LIrs1KO) mice exhibited suppression of DEN-induced HCC development, accompanied by reduced cancer cell proliferative activity and reduced activation of Akt. On the other hand, liver-specific Irs2-knockout (LIrs2KO) mice showed a similar pattern of HCC development to the DEN-treated control wild-type mice. We focused on Wnt/ β -catenin signaling and demonstrated that Irs1 expression was induced by Wnt3a stimulation in the primary hepatocytes, associated with insulin-stimulated Akt activation. These data suggest that upregulated Irs1 by Wnt/ β -catenin signaling plays a crucial role in the progression of HCC.

研究分野：糖尿病、代謝、内分泌

キーワード：インスリン受容体基質 肝癌 インスリンシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌は世界でも主要な癌関連死の原因であり、特にアジアで罹患率が高い(CA Cancer J Clin 2011; 61: 69-90)。肝癌の原因はウイルス感染や NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)、アルコールなど多岐に渡るが、その原因に関わらず種々のシグナル経路(WNT 経路、PI3K/Akt/mTOR 経路など)が活性化されていることが知られている(Oncogene 2010; 29: 4989-5005)。また、多くの疫学研究で肥満や糖尿病と肝癌の強い関連が報告されているが、肥満と糖尿病に共通するのはインスリン抵抗性に起因する高インスリン血症である。肥満に関連する慢性炎症、脂肪肝が肝癌を増悪させることは明らかになっているが(Cell 2010; 140: 197-208)、肝癌におけるインスリンシグナルに関しては、なお明らかでない点が多い。

インスリンや IGF1 は各々の受容体に結合した際にチロシンキナーゼにより自己リン酸化され、リン酸化したチロシン残基にインスリン受容体基質(Irs: insulin receptor substrate)が結合し、Irs のチロシン残基がリン酸化されることで、下流の PI3K、Akt が活性化される。Irs には 6 つのアイソフォームが存在するが、肝臓では Irs1 と Irs2 が主にシグナル伝達や糖脂質代謝制御に重要であることが、我々の先行研究等により明らかになっている(Cell Metab 2008; 8: 49-64)。また、*Llrs1KO*、*Llrs2KO* マウスは通常食下では脂肪肝を伴わず、正常耐糖能に近いことも先行研究で明らかになっている。

一方、肝癌においてはヒト/マウスのいずれにおいても Irs1 のみならず(Hepatology 1997; 26: 598-604)、Irs2 の発現増加が報告されているが(Am J Pathol 2005; 167: 869-77)、肝癌形成と Irs1、あるいは Irs2 の causal relationship に関しては、いまだ明らかではない。

肝癌の発生と進展を *in vivo* で観察するためのマウス肝癌モデルとして、ジエチルニトロサミン(Diethylnitrosamine; DEN)投与によるものがある。この薬剤はアルキル化剤であり、生体内の肝臓において CYP2E1 で代謝されて活性化される。活性化された DEN は、DNA にアルキル基を付加することで発癌のイニシエーションを誘発し、その後、半年以上の期間に自然経過で癌のプロモーションが促される。DEN による肝癌は線維化を伴わない点など、必ずしもヒトの肝癌と合致しない点があるものの、100%の確率で肝癌を誘発でき、また、誘発された肝癌はヒトにおける肝癌と類似した病理所見や病態生理学的特徴を有するため(Nat Genet. 2004; 36(12):1306-11)、古典的なマウス肝癌モデルとして依然広く用いられている。

2. 研究の目的

肝癌では、その原因に関わらず種々のシグナル経路が活性化されていることが知られている。また、多くの疫学研究で肥満や糖尿病と肝癌の強い関連が報告されているが、肥満と糖尿病に共通するのはインスリン抵抗性に起因する高インスリン血症である。しかしながら、肝癌形成におけるインスリンシグナルの寄与は不明な点が多いため、我々は、両シグナル上流に位置するインスリン受容体基質(Irs)1、Irs2 に着目し、肝臓特異的 Irs1 欠損マウス(*Llrs1KO*)、肝臓特異的 Irs2 欠損マウス(*Llrs2KO*)に薬剤で肝癌を誘発し表現型などを解析することで、Irs1、2 の肝癌形成における役割、ひいてはインスリンシグナルの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

15 日齢の *Llrs1KO*、*Llrs2KO* マウスに DEN を 25mg/kg で腹腔内注射により単回投与を行い肝癌を誘発し、10 ヶ月後の時点での表現型、病理学的特徴を評価することで肝癌形成における Irs1、Irs2 が担う役割の解明を目指す。対照群には各々、Irs1 flox マウス、Irs2 flox マウスを用いて同様の手法で肝癌を誘発する。各群の腫瘍部における増殖/炎症/浸潤、代謝関連遺伝子発現などを比較し Irs1、Irs2 が欠損した肝癌の特徴を解析する。また、野生型マウス初代培養肝細胞を用いて Irs の発現調節機構を検討する。

4. 研究成果

まず、実際に野生型マウスに DEN で肝癌を誘発し、インスリンシグナル関連分子の発現を遺伝子、蛋白レベルで評価した。肝癌を誘発した肝臓において、腫瘍部、非腫瘍部に分けて、Irs の遺伝子発現を検討したところ、腫瘍部では Irs2 は軽度上昇傾向を認めたが、Irs1 は著明に発現増加していた。さらに、腫瘍部での Irs1 の増加の程度は Irs2 よりも有意に高かった。蛋白レベルでも肝癌における Irs1 の発現増加を認めた。また、肝癌ではインスリンシグナル等の下流に位置する Akt の蛋白発現とリン酸化亢進を認め、インスリン受容体(IR)の蛋白発現も増加していた。IR は、exon 11(36bp)を有するアイソフォーム B 型と exon 11(36bp)が欠損したアイソフォーム A 型があり、A 型の IR はインスリン、IGF2 に対して高感受性であることが明らかになっている(EMBO J 1990; 9: 2409-13, Mol Cell Biol 1999; 19: 3278-88)。実際に PCR で確認したところ、肝臓では通常は B 型が発現しているが、癌化に伴い A 型が出現していた。一方、GHR、IGF1、IGF1R の遺伝子発現は肝癌を誘発した非腫瘍部において(正常肝と比較して)増加していたが、腫瘍部では(非腫瘍部と比較して)むしろ有意に低下していた。以上より、今回の発癌モデルにおいては、肝癌で発現増加した Irs1 は主にインスリンシグナルの亢進に関与していると考えられた。

次に、実際に、*Llrs1KO* に DEN で肝癌を誘発したところ、肉眼的観察では、腫瘍数、最大腫瘍径が対照群より小さく、また、癌化に伴う肝重量の増大が軽度で、血清 ALT 値も対照群よりも低値であったことから、腫瘍形成が抑制されている所見を認めたが、一方で *Llrs2KO* では

対照群と同等に肝癌が誘発された。また、*Llrs1KO* の腫瘍部では対照群の腫瘍部と比較して Akt の蛋白発現/リン酸化が低下しておりインスリンシグナルが低下していると考えられたが、*Llrs2KO* の腫瘍部では対照群と同等に Akt の蛋白発現/リン酸化を認め、肝癌のインスリンシグナル伝達においては Irs1 が主要な役割を担っていると考えられた。また、腫瘍細胞の増殖能を評価するため、Ki67 染色を行ったところ、*Llrs1KO* では腫瘍部の Ki67 染色陽性率が低値であり増殖能は低下していたが、*Llrs2KO* の腫瘍部では、対照群の腫瘍部と Ki67 染色陽性率の有意差を認めなかった。また、*Llrs1KO* の腫瘍部では、炎症(TNF)/浸潤(MMP9,12、VEGF 等)に関連する遺伝子発現の低下も認めた。一方で、*Llrs2KO* の腫瘍部の遺伝子発現に関しては、*Llrs1KO* の腫瘍部で見られたような一連の所見を認めなかった。これらの結果から、肝癌形成時に発現増加した Irs1 が病態形成にも大きく寄与していると考えられた。

また、DEN 投与初期の変化を検討するため、12 週齢の各 KO マウスと各々の対照群のマウスに DEN を 100mg/kg で腹腔内注射を行い、48 時間後の肝障害の程度やアポトーシス/抗アポトーシス関連遺伝子の発現誘導を評価したところ、いずれの KO マウスも対照群との差を認めなかった。このことから Irs1 の肝癌抑制効果は、この実験モデルにおいて肝癌のイニシエーションよりもプロモーションに対して関与していると考えられた。

では、なぜ肝癌形成時に Irs1 が発現増加しているのか、ということを検討するため、我々は Wnt 経路に着目した。肝癌では Wnt 関連分子の体細胞変異により Wnt 経路が活性化されていることが知られているが(Hepatology 2007 45(5):1298-305)、近年、筋肉などの臓器で Wnt 経路が Irs1 を発現調節しているという報告がある(Genes Dev 2010; 24: 1507-18)。実際に肝癌で β カテニンの免疫組織染色を行ったところ、腫瘍部では非腫瘍部よりも β カテニンの発現が増加しており、また標的遺伝子の c-Myc や cyclin D1 の発現増加も認めた。また、同一肝において腫瘍部と非腫瘍部を比較すると Active β カテニンの発現も腫瘍部で増加していたことから、本実験モデルにおける肝癌においても、Wnt 経路が活性化されていると考えられた。

そこで、古典的 Wnt シグナルを活性化する recombinant Wnt3a で、野生型マウスの初代培養肝細胞を刺激したところ、Irs2 は変化がなかったが、Irs1 は遺伝子・蛋白レベルで有意に発現増加した。この現象は dominant-negative な TCF4(DN-TCF4)(N 末の 30 アミノ酸を欠失させ、 β カテニンとの結合ができなくなり標的遺伝子の DNA に結合するが転写活性化能を有さない)のトランスフェクションで抑制されたため、Wnt3a 刺激が TCF4 を介した経路で Irs1 を制御していると考えられた。さらに、Wnt 経路を活性化し Irs1 の発現を誘導した状態で、インスリン刺激を行うと、Akt のリン酸化は亢進しており、Wnt 経路を介した Irs1 の発現増加がインスリンシグナルの増強に関与していると考えられた。肝癌のように Wnt 経路が恒常的に活性化している状態では、Irs1 の発現が増加することでインスリンシグナルが増強され、それにより肝癌の進展が促進されることが示唆された。

最後に Irs1 が欠損した肝癌の特徴を網羅的に解析するため、*Llrs1KO* の腫瘍部と対照群の腫瘍部の cDNA マイクロアレイ解析を行った結果、Irs1 が欠損した腫瘍ではワールブルグ効果の減弱や脂質代謝の変化など、代謝面の変化が多く認められた。このことから、Irs1 を介した肝癌形成時の癌代謝の変化が、肝癌の進展に重要である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) [Sakurai Y](#), Kubota N, Takamoto I, Obata A, Iwamoto M, Hayashi T, Aihara M, Kubota T, Nishihara H, Kadowaki T. Role of insulin receptor substrates in the progression of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2017;7(1):5387.

2) Sasaki M, Sasako T, Kubota N, [Sakurai Y](#), Takamoto I, Kubota T, Inagi R, Seki G, Goto M, Ueki K, Nangaku M, Jomori T, Kadowaki T. Dual Regulation of Gluconeogenesis by Insulin and Glucose in the Proximal Tubules of the Kidney. *Diabetes.* 2017;66(9):2339-2350.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) [桜井 賛孝](#)、高本偉碩、窪田直人、門脇孝：「新規糖尿病関連遺伝子 UBE2E2 の膵 細胞における役割」第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会(2018 年 5 月 東京)

2) [桜井 賛孝](#)、窪田直人、高本偉碩、門脇孝：「Role of insulin receptor substrates in the progression of hepatocellular carcinoma」第 38 回 日本肥満学会 (2017 年 10 月 大阪)

3) [桜井 賛孝](#)、窪田直人、高本偉碩、門脇孝：「肝癌におけるインスリン受容体基質(Irs)の役割」

第 90 回 日本内分泌学会学術総会 (2017 年 4 月 京都) (Young investigator award 受賞)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 桜井賛孝、窪田直人、門脇孝：癌におけるインスリン受容体基質の役割と PI3 キナーゼ阻害剤による癌治療。内分泌・糖尿病・代謝内科 47 (4): 318 -322, 2018
- 2) 桜井賛孝：[最新論文レビュー]ハダカデバネズミは果糖を用いた解糖系により無酸素に対応できる。DIABETES UPDATE Vol.7 No.1:18-19, 2018.3

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：窪田 直人
ローマ字氏名： Kubota Naoto
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：准教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。