

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17446

研究課題名（和文）SGLT2阻害剤が肝臓におよぼす影響

研究課題名（英文）Effect of SGLT2 inhibitor for hepatocellular carcinoma

研究代表者

中野 暖（Nakano, Dan）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40723987

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝細胞株におけるSGLT2の発現とミトコンドリア内への局在を明らかとした。SGLT2阻害剤が肝臓細胞株の増殖を抑制すること。その機序として、1)電子伝達系、2)脂肪酸代謝経路、3)DNA合成経路であるピリン、ピリミジン経路、の3経路が主に代謝の変化を起こしていることが明らかとなった。また、SGLT2阻害剤は、肝臓細胞株のケモカインにも影響を与え、肝臓増殖に影響を与えるケモカインを有意に低下させる効果があることを明らかにした。これらことから、SGLT2阻害剤は肝臓細胞に対し、代謝変化による増殖抑制効果とケモカインの変化による微小環境の変化による増殖抑制効果を持ち合わせる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

肝臓癌は日本では死亡数第5位にあたる悪性腫瘍である。肝臓細胞におけるSGLTの発現およびSGLT2阻害による肝臓細胞増殖抑制およびその作用機序を解明したことで、新たな癌増殖抑制機序を発見した。また、SGLT2阻害により肝臓細胞の生存・増殖抑制効果が得られたことで、SGLT2阻害剤がすでに糖尿病薬として治療効果および安全性が確認されている薬剤であることから、直ちに臨床応用が可能な肝臓の新規治療戦略となりうる。

研究成果の概要（英文）：The expression and mitochondrial localization of SGLT2 in hepatoma cell lines were revealed, and SGLT2 inhibitors suppressed the growth of hepatoma cell lines. The three main metabolic pathways that were found to be involved in this mechanism were 1) the electron transfer system, 2) the fatty acid metabolism pathway, and 3) the pyrimidine and pyrimidine pathway, which is a DNA synthesis pathway. The SGLT2 inhibitor also affected chemokines in hepatocellular carcinoma cell lines and was found to significantly reduce chemokines that affect hepatocellular carcinoma growth.

These findings suggest that SGLT2 inhibitors may have a growth inhibitory effect on hepatocellular carcinoma cells through both metabolic changes and microenvironmental changes caused by chemokine alterations.

研究分野：脂肪肝

キーワード：肝細胞癌 SGLT2 SGLT2阻害剤 糖尿病薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

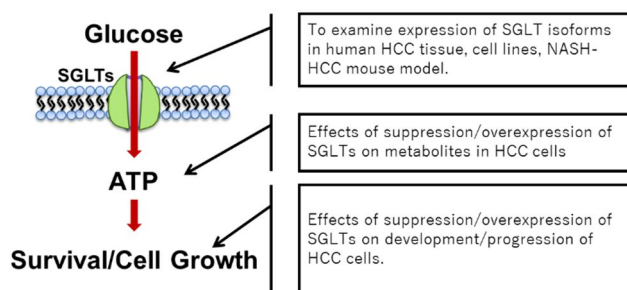
1. 研究開始当初の背景

がん細胞が生存・増殖するためにはエネルギーを必要とする。がん細胞のエネルギー産生は主に嫌氣的解糖により行われるため、がん細胞は多くのグルコースを細胞内へ取り込む必要がある。グルコースは疎水性の細胞膜に対して透過性がないことから、膜蛋白に局在する糖輸送担体を介して細胞内に取り込まれる。

ナトリウム・グルコース共役輸送体 (sodium glucose cotransporter; SGLT) は SLC5 遺伝子ファミリーに属している膜 14 回貫通型の輸送担体である。SGLT は 12 種類のアイソフォームからなるが、グルコースの輸送に関わるのは 5 種類である (SGLT1~5)。SGLT1 は小腸上皮細胞で腸管からグルコースの吸収に、SGLT2 は近位尿細管上皮細胞に発現し、尿からグルコースの再吸収を担っている。SGLT3 はグルコースセンサーとして機能している。SGLT4 は腎臓や小腸など複数の臓器に発現し、SGLT5 は腎皮質に限局的に発現している。

近年、SGLT は前述の組織以外に、がん細胞で発現していることが報告されている。これまでに、膵癌や前立腺癌では SGLT1 と SGLT2 が発現しているだけでなく、SGLT2 の機能阻害により、癌細胞の増殖抑制効果も報告されている。また、臨床的にも SGLT2 阻害剤の使用により消化器癌の発症が減少するといったメタ解析の結果も報告されている。肝癌細胞も、他のがん細胞と同様にミトコンドリア数が減少しており、その生存や増殖はグルコースの取り込みに大きく依存していると想定されるが、未だ肝癌細胞における SGLT の発現は検討されていない。

Pathophysiological roles of SGLTs in HCC



2. 研究の目的

本研究の目的は、肝癌細胞における SGLT の細胞生物学的意義を検討し、SGLT_i を介した新規治療法を展開するために基盤となる基礎的研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

3. 研究の方法

In vitro study:

(1) ヒト肝癌細胞株における SGLTs の発現

肝癌細胞株 (HepG2, Huh-7, Hep3B, HLF) における SGLT1, 2 の蛋白発現をウエスタンブロットイングおよび免疫染色にて検討した。また、免疫染色の二重染色にて SGLT2 の局在の確認をおこなった。同時に、細胞分画を行った後に核、ミトコンドリア、リボソーム、小胞体における SGLT2 の発現をウエスタンブロットイングで確認を行い SGLT2 の局在の確認を行った。

(2) ヒト肝癌細胞株における SGLT2_i による増殖抑制効果の確認

肝癌細胞株 (Huh-7, Hep3B) の培養上清において SGLT2 (3 μM, 10 μM, 30 μM) 投与群 (それぞれ n=5) とコントロール群 (n=5) を準備し、24 時間、48 時間後および 72 時間後の細胞数を測定した。

(3) ヒト肝細胞株における SGLT2_i によるアポトーシスの有無

肝癌細胞株 (Hep3B) の培養上清において SGLT2 投与群 (10 μM) (n=5) とコントロール群 (n=5) を準備し、培養 48 時間後に 7AAD および annexin V で染色した後にフローサイトメトリーを用いてアポトーシスの有無を確認した。

(4) ヒト肝癌細胞株における SGLT2_i による細胞周期の変化

肝癌細胞株 (Hep3B) の培養上清において SGLT2 投与群 (10 μ M, 30 μ M) (n=5) とコントロール群 (n=5) を準備し、培養 48 時間後に PI で染色した後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化について確認した。

(5) ヒト肝癌細胞株における SGLT2i による代謝変化

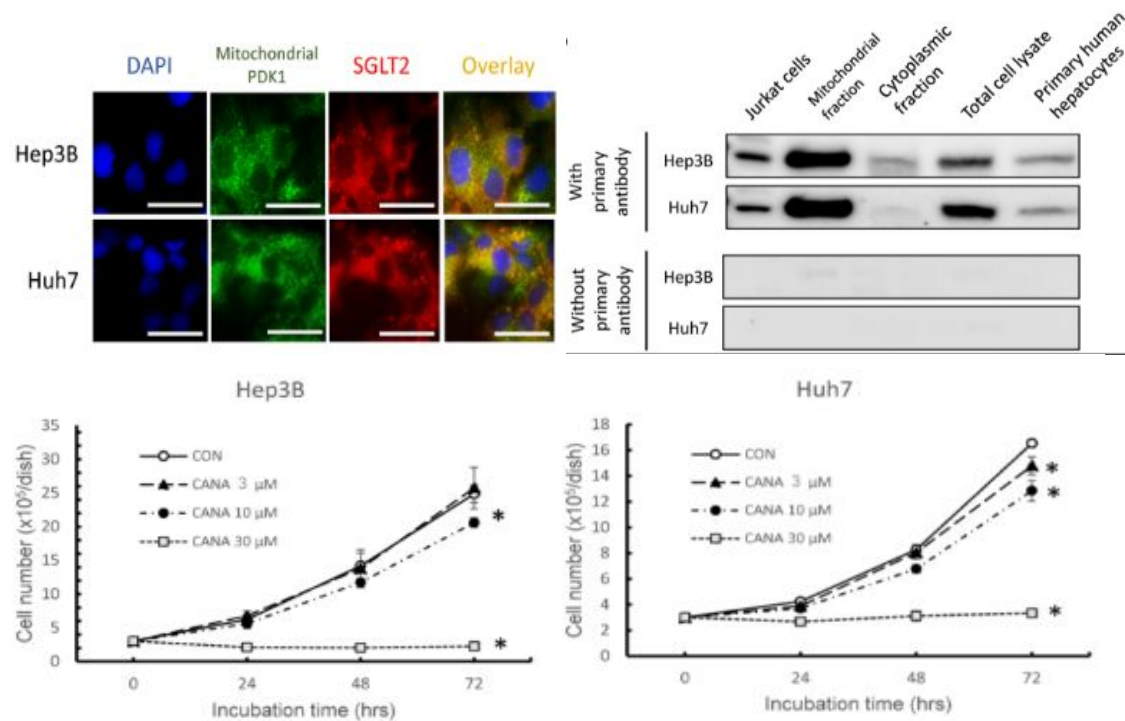
肝癌細胞株 (Hep3B) の培養上清において SGLT2 投与群 (10 μ M) (n=5) とコントロール群 (n=5) を準備し、培養 48 時間後の肝癌細胞株において、メタボローム解析およびプロテオーム解析を行い、これらのデータを網羅的に比較検討した。

(6) ヒト肝癌細胞株における SGLT2i によるケモカインの変化

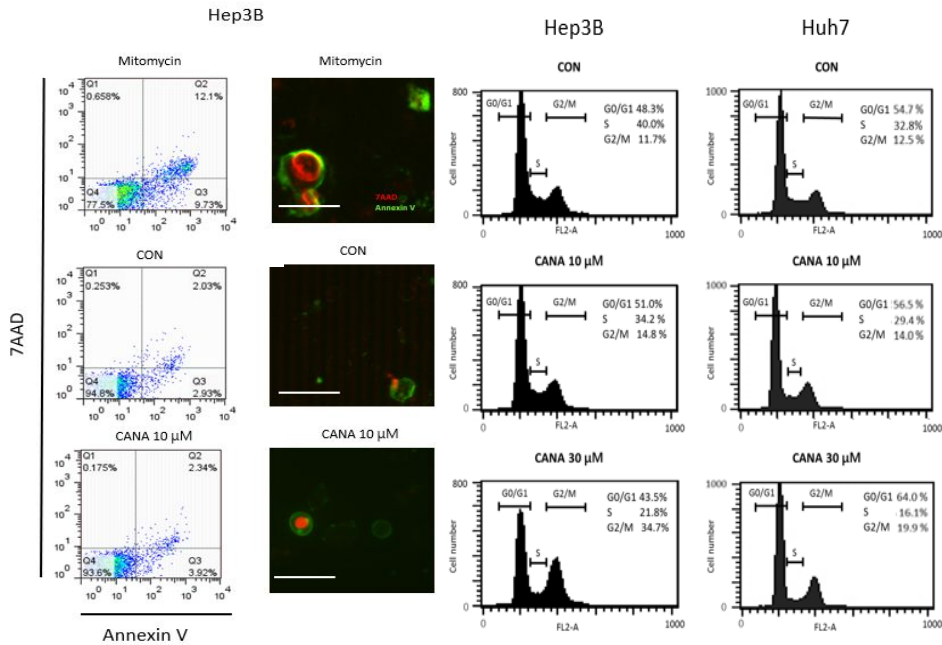
肝癌細胞株 (Hep3B) の培養上清において SGLT2 投与群 (10 μ M) (n=5) とコントロール群 (n=5) を準備し、培養 48 時間後の肝癌細胞株の培養上清において、マルチオミックス解析を行い SGLT2 阻害剤投与群におけるケモカインの変化を確認した。

4. 研究成果

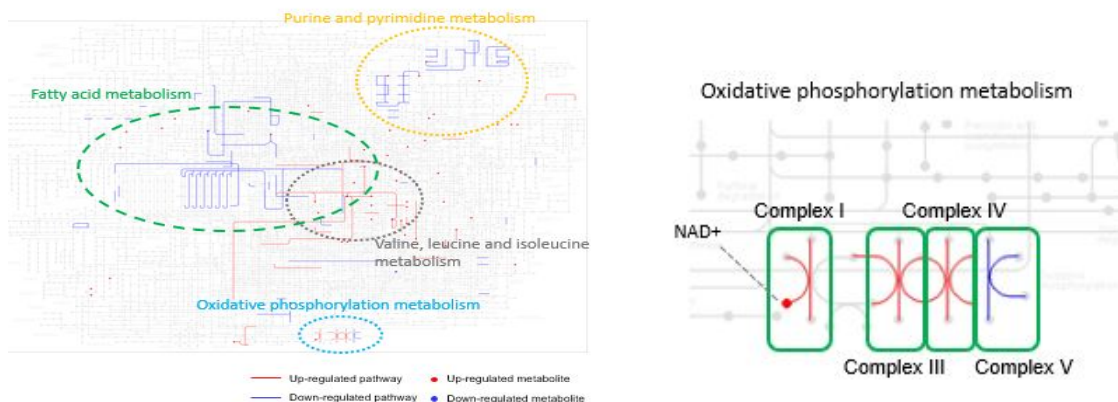
SGLT 1, 2 は、肝癌細胞株において細胞質に発現していることが明らかとなった。また、二重染色および細胞分画を用いた SGLT2 の局在の確認では、ミトコンドリア内に SGLT2 が発現していることが明らかとなった。肝癌細胞株は、培養上清内に SGLT2i を投与することで濃度依存性に肝癌細胞の増殖抑制効果があることが明らかとなった。

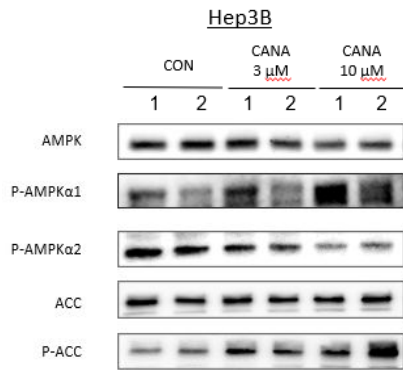
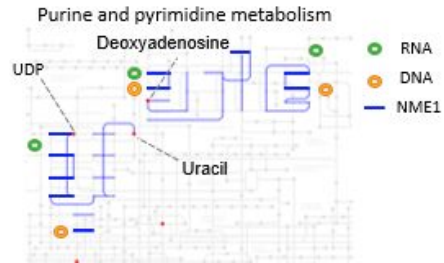
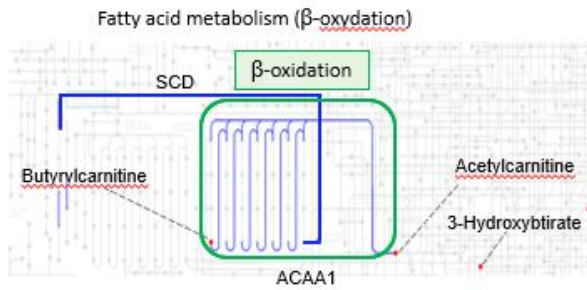


SGLT2i 投与群とコントロール群の 2 群において肝癌細胞株に 7AAD および annexin V で染色した後にフローサイトメトリーを用いてアポトーシスの有無を確認したところ、SGLT2i 投与群において、アポトーシス細胞の数は有意差を認めなかった。2 群における肝癌細胞株に PI で染色した後にフローサイトメトリーを用いた結果、SGLT2 阻害剤投与群において、G2-M 期の細胞数が有意に増加していた。

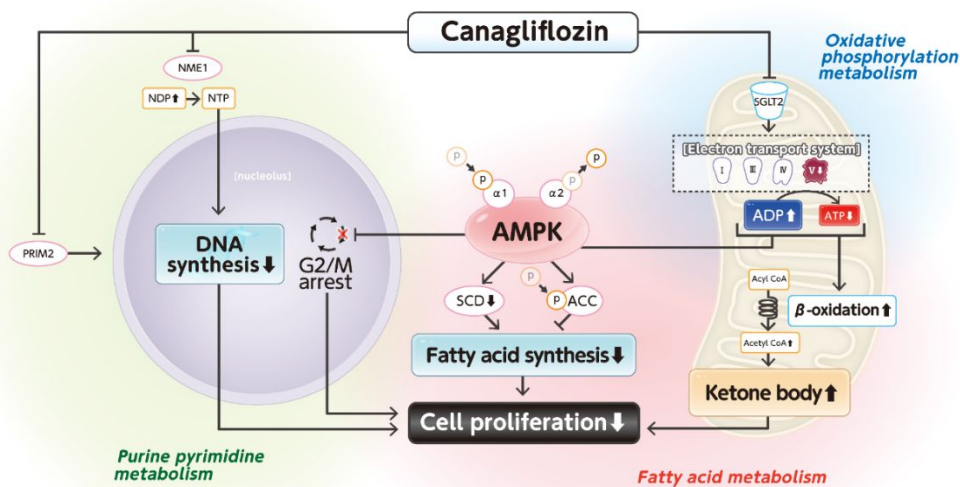


2群における肝細胞株のメタボローム解析では85種類の代謝物質がSGLT2i投与時に有意な変化を認めた。最も変化を認めていたのは脂質代謝経路であり、次にバリン、ロイシン、イソロイシンの経路およびプリンピリミジンの経路で有意に変化している代謝物質が多かった。2群における肝細胞株のプロテオーム解析では68種類の代謝酵素がSGLT2i投与時に有意な変化を認めた。中でも電子伝達系の代謝酵素が最も有意に変化しており(11種類)、その他にプリンピリミジンといったDNA、RNA合成経路および脂質代謝経路における代謝酵素の変化が大きかった。これらのメタボローム解析およびプロテオーム解析の結果を合わせると、(1)電子伝達系、(2)脂質経路、(3)プリン、ピリミジン経路、(4)バリン、ロイシン、イソロイシン経路の4経路が、SGLT2iが投与されることで、肝細胞内で大きく変化していた。さらに脂肪酸の経路の変化を確認するために5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)の活性及びACCの変化をウエスタンブロットで確認を行ったところ、AMPKおよびacetyl-CoA carboxylase (ACC)の活性を認めた。この経路では脂肪酸合成が抑制される経路である。これらのことをまとめると、SGLT2iはミトコンドリア内にあるSGLT2を介して電子伝達系でのATP合成を抑制し、その結果酸化の亢進とケトン体の産生およびAMPKの活性化を起こした。ケトン体は近年癌組織及び癌細胞の増殖抑制効果があるとされており、癌増殖抑制に働いている可能性が示唆された。AMPKはAMPK-ACC経路を介して脂肪酸合成を抑制する。また、stearoyl-CoA desaturase (SCD)を介して細胞膜の合成を抑制することからこのふたつの経路が癌増殖抑制効果を認めている可能性が示唆された。さらにAMPKはG2/M arrestを起こすことで細胞周期を抑制すること、プリン、ピリミジン経路の抑制により細胞増殖機能の低下を起こす可能性が示唆された。

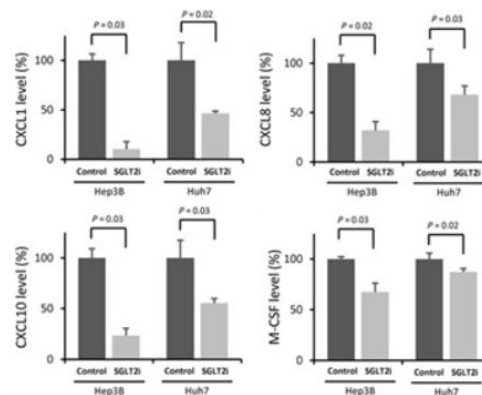
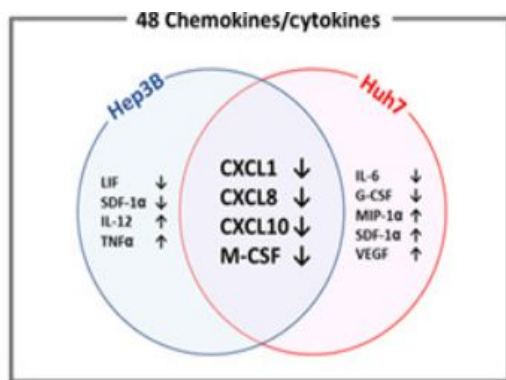




これらの複数の代謝経路の変化から、SGLT2i は肝癌細胞株の増殖抑制の可能性が考えられた。



さらに SGLT2i 投与群とコントロール群の 2 群において肝癌細胞株(Hep3B, Huh7)のケモカインの変化を確認したところ、SGLT2i 投与群において Hep3B と Huh7 において共通して CXCL1, CXCL8, CXCL10, MCSF が有意に低下していることが明らかとなった。



これらの研究成果から、肝細胞癌は、SGLT2 阻害剤により細胞内の複数の代謝の変化を起こすことおよび、癌増殖に影響のあるサイトカインの分泌が低下し、癌の微小環境に影響を与えることで肝癌の増殖を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano D, Kawaguchi T, Tsutsumi T, Hayakawa M, Yoshio S, Koga H, Torimura T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of SGLT2 inhibitor on tumor-releasing chemokines/cytokines in Hep3B and Huh7 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 270-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2 阻害剤が肝細胞癌の増殖に及ぼす影響：メタボロームとプロテオームを用いたMulti-omics 解析
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響； Multi-omicsを用いた解析
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 マイオカインdecorinが肝がん患者のサルコペニアと予後におよぼす影響
3. 学会等名 29th JDDW（第25回日本肝臓学会大会・第63回日本消化器病学会大会・第19回日本消化器外科学会大会）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Nakano D
2. 発表標題 "SGLT2 INHIBITOR ALTERED METABOLIC REPROGRAMMING AND SUPPRESSED PROLIFERATION OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA: A METABOLOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS"
3. 学会等名 The Liver Meeting Digital Experience 2021 (The 72th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤がNASH関連肝癌マウスモデルの腫瘍増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 肝臓と糖尿病、代謝研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 九州メタボローム研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2 inhibitor Altered Metabolic Reprograming and Suppressed Proliferatoin of Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中野 暖
2. 発表標題 SGLT2阻害剤が肝細胞癌の増殖と代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------