

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月26日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790874

研究課題名（和文）インスリン抵抗性のBMPs誘導肝癌上皮間葉移行における細胞生物学的意義

研究課題名（英文）The cytobiological impact of insulin resistance on BMPs-related epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma

研究代表者

川口 巧（KAWAGUCHI TAKUMI）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00320177

研究成果の概要（和文）：インスリン抵抗性を有する肝疾患患者は高率に癌を発症することから予後不良である。近年、インスリン抵抗性は、心血管疾患の発症のみならず、癌の発症や悪性度に関与する上皮間葉移行にも関与する事が明らかとなっているが、インスリン抵抗性によって誘導される肝癌細胞の上皮間葉移行に分子機序は十分に解明されていない。また、インスリン抵抗性改善剤による肝発癌および肝癌細胞 EMT 抑制効果も未だ明らかでない。我々は、本研究において、interleukin-6 は、高インスリン状態で肝癌細胞の上皮間葉移行を誘導することを明らかにした。また、dipeptidyl dehydrolase-4 阻害剤は肝癌細胞の上皮間葉移行を抑制することを明にした。

研究成果の概要（英文）：Patients with chronic liver disease and insulin resistance frequently develop hepatocellular carcinoma, leading to poor prognosis. Recently, insulin resistance is reported to be involved in the development of not only cardio-vascular disease, but also epithelial-mesenchymal transition, which link to carcinogenesis and malignant potential of tumor cells. Although molecular mechanism(s) for an association of insulin resistance and epithelial-mesenchymal transition is not fully elucidated in hepatocarcinogenesis, we have demonstrated that interleukin-6 promoted epithelial-mesenchymal transition in a hepatoma cell line cultured with insulin in this study. We further showed that dipeptidyl dehydrolase-4 inhibitor suppressed interleukin-6-caused epithelial-mesenchymal transition in HepG2 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン抵抗性、肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性を有する肝疾患患者は

高率に癌を発症することから予後不良である。一方、上皮間葉移行（EMT）は、発癌や

癌細胞の悪化に深く関与する現象であり、bone morphogenetic proteins (BMPs) や interleukin-6 (IL-6) を介して誘導される。

BMPs や IL-6 発現はインスリンにより調節されていることから、インスリン抵抗性は EMT に関与することが推察される。また、近年、インスリン抵抗性を改善する様々な薬剤が臨床応用されているが、それらの薬剤は肝癌細胞の EMT に対しても抑制的に作用すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インスリン抵抗性によって誘導される肝癌細胞の EMT に関与する分子を同定することである。また、インスリン抵抗性改善剤の肝発癌および肝癌細胞 EMT 抑制効果を検討することである。

3. 研究の方法

1) 肝疾患患者における EMT 関連分子の変化

肝癌の危険因子である非アルコール性脂肪性肝疾患の患者を対象とした (n = 12)。早朝空腹時に採血を行い、インスリン抵抗性の指標である、homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) を評価した。また、血清 BMP2/4/7 および IL-6 値についても ELISA により測定した。

2) インスリン抵抗性が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

HepG2 肝癌細胞株の培養上清にインスリンおよび IL-6 を添加し、HepG2 肝癌細胞株の形態的变化を検討した。

3) インスリン抵抗性改善剤が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

EMT を誘導した HepG2 肝癌細胞株の培養上清にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、glucagon-like peptide-1 受容体アゴニスト (GLP-1)、ピオグリタゾン、もしくは dipeptidyl peptidase-4 阻害剤 (DPP4i) を添加し、肝癌細胞株の形態的变化を検討した。

4) インスリン抵抗性改善剤の肝癌動物モデルにおよぼす影響

コリン欠乏食飼 (CDAA) は、脂肪性肝炎・肝硬変を経て肝細胞癌を誘発する。さらに、本もでるにインスリンを連日皮下投与し、高インスリン血症を意図的に合併させることで、肝細胞癌 EMT 動物モデルが作成される。

本研究では、このインスリン持続投与 CDAA 給餌肝細胞癌動物モデルに対し、DPP4i を投与し、体重・食餌量・耐糖能異常・肝発がんの状況を比較検討した (n = 4)。

4. 研究成果

1) 肝疾患患者における EMT 関連分子の変化
肝癌の危険因子である非アルコール性脂肪性肝疾患の HOMA-IR、血清 BMP2/4/7 および IL-6 値を測定した。HOMA-IR 値は 11.4 ± 2.9 と高値であり、本研究の対象患者はインスリン抵抗性を合併している事が示唆された。

同患者における血清 BMP2/4/7 はそれぞれ、 $24.5 \pm 5.6 \text{ pg/mL}$ 、 $132 \pm 15 \text{ pg/mL}$ 、 $352 \pm 47 \text{ pg/mL}$ と基準値内であった。一方、血清 IL-6 値は $20.1 \pm 0.5 \text{ pg/mL}$ (基準値 4 pg/mL) と高値であった (図 1)。

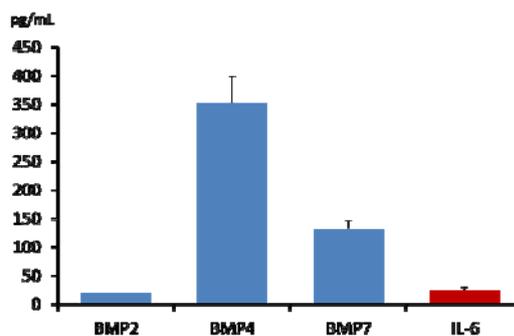


図 1) 肝疾患患者における EMT 関連分子の変化

2) インスリン抵抗性が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

インスリンと IL-6 が肝癌の EMT におよぼす影響を検討するため、HepG2 肝癌細胞株の培養上清にインスリンと IL-6 を添加し、培養した。その結果、コントロール群と比較して、インスリン+IL-6 群では EMT が示唆される紡錘形の HepG2 細胞数が有意に増加した (図 2)。

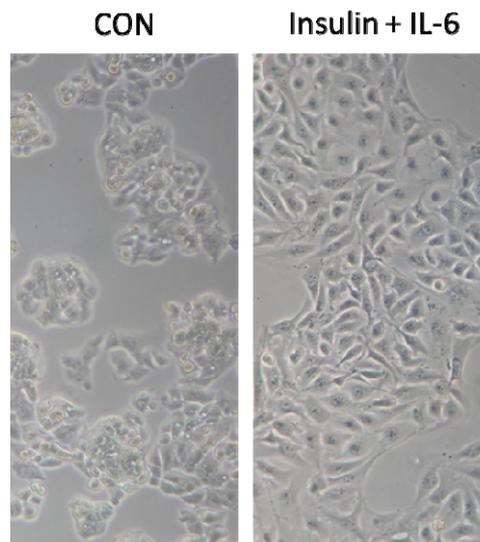


図 2) インスリン抵抗性が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

3) インスリン抵抗性改善剤が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

インスリン+IL-6 により誘導された HepG2 肝癌細胞株の EMT において、インスリン抵抗改善作用を有する薬剤の EMT 改善効果を検討した。

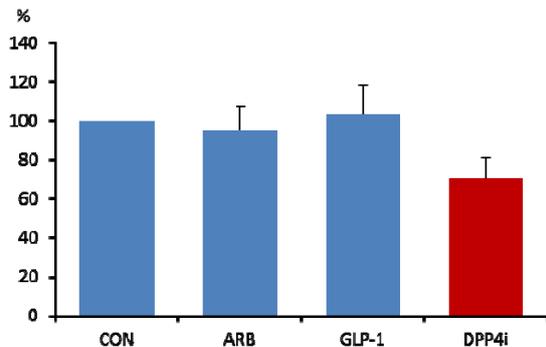
培養上清に ARB を添加した群では、コントロール群と比較して、インスリン+IL-6 誘導肝癌 EMT (紡錘形細胞数) に有意な変化は認められなかった。同様に、GLP-1 群も、コントロール群と比較して、インスリン+IL-6 誘導肝癌 EMT に有意な変化は認められなかった。

ピオグリタゾン添加したところ、アポトーシスを呈する細胞数が増加したことから、インスリン+IL-6 誘導肝癌 EMT への影響は評価が困難であった。一方、DPP4i を添加したところ、インスリン+IL-6 誘導肝癌 EMT に有意な減少が認められた (図 3)。

図 3) インスリン抵抗性改善剤が肝癌細胞株の EMT におよぼす影響

4) インスリン抵抗性改善剤の肝癌動物モデルにおよぼす影響

肝癌動物モデルに DPP4i を投与し、非投与群と体重・食餌量・耐糖能異常・肝発がんの状況を比較検討した。体重および食餌摂取量は DPP4i 投与群と非投与群の間に有意な差は認めなかった (体重 CON 23.2g vs. DPP-4i 22.5g; N.S., 食餌摂取量 CON 3.2g/day vs. 3.1 g/day; N.S.)。DPP4i 投与群の空腹時血糖値は、非投与群に比較して有意に低値であ



った。EMT 関連分子の発現は DPP-4 群で減少していたが、肝癌を発症した個体数には両群間に有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Sakata M, Kawahara A, Kawaguchi T, Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M. Decreased expression of insulin and increased

expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens. 査読有, J Gastroenterol. 2013;48:277-85. DOI: 10.1007/s00535-012-0633-9.

- 2) Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. Hepatology. 査読有, 2011 2;54:1063-70. DOI: 10.1002/hep.24412.

- 3) Kawaguchi T, Taniguchi E, Ito M, Sakata M, Sumie S, Sata M. Insulin resistance and chronic liver disease. World J Hepatol. 査読有, 2011;3:99-107. DOI: 10.4254/wjh.v3.i5.99.

- 4) Sumie S, Kawaguchi T, Kuromatsu R, Takata A, Nakano M, Satani M, Yamada S, Niizeki T, Torimura T, Sata M. Total and high molecular weight adiponectin and hepatocellular carcinoma with HCV infection. PLoS One. 査読有, 2011;6:e26840. DOI: 10.1371/journal.pone.0026840.

- 5) Kawaguchi T, Shiba N, Takano Y, Maeda T, Sata M. Hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions decreased fasting blood glucose and serum interleukin-6 levels in elderly people: a pilot study. Appl Physiol Nutr Metab. 査読有, 2011;36:276-83. DOI: 10.1139/h10-108.

- 6) Kawaguchi T, Shiba N, Maeda T, Matsugaki T, Takano Y, Ito M, Sakata M, Taniguchi E, Nagata K, Sata M. Hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions reduces steatosis, insulin resistance, and IL-6 levels in patients with NAFLD: a pilot study. J Gastroenterol. 査読有, 2011;46:746-57. DOI: 10.1007/s00535-011-0378-x.

- 7) Kawaguchi T, Taniguchi E, Ito M, Sumie S, Yamagishi S, Sata M. The pathogenesis, complications and therapeutic strategy for hepatitis C virus-associated insulin resistance in the era of anti-viral treatment. Rev Recent Clin Trials. 査読有, 2010;5:147-57. URL: <http://www.eurekaselect.com/86625/article>

〔学会発表〕（計5件）

- 1) 川口 巧, 伊藤 実, 佐田通夫. 肝発癌抑制を目指した耐糖能異常へのアプローチ: C型肝炎におけるインクレチン動態と肝細胞糖取り込みにおける GLP-1 シグナル伝達経路. 第48回 日本肝臓学会. 2012. 6. 7, 金沢市, 石川県.
- 2) Itou M, Kawaguchi T, Sakata M, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K, Torimura T, Tsuruta O, Sata M. GLP-1R agonist increased glucose uptake and inhibited GSK3 β phosphorylation through the AMPK signaling pathways in human hepatocytes. Digestive Disease Week 2012. 2012/5/19. San Diego, California, USA.
- 3) 川口 巧, 長尾由実子, 井出達也, 佐田通夫. 慢性肝疾患患者における BCAA・亜鉛含有食品のインスリン抵抗性改善効果. 第15回日本肝臓学会大会. 2011. 10. 20, 福岡市, 福岡県.
- 4) 川口 巧, 谷口英太郎, 佐田通夫. HCV 関連肝細胞癌と糖尿病治療薬の関連. 第15回日本肝臓学会大会. 2011. 10. 20, 福岡市, 福岡県.
- 5) Kawaguchi T, Shiba N, Maeda T, Matsugaki T, Takano Y, Itou M, Sakata M, Taniguchi E, Nagata K, Sata M. Hybrid-training of voluntary and electrical muscle contractions improves nonalcoholic fatty liver disease and reduces insulin resistance and interleukin-6 levels. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease. 2010. 10. 30, Boston, Massachusetts, USA.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 巧 (KAWAGUCHI TAKUMI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 00320177