

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670336

研究課題名(和文) TRAIL経路活性化による糖尿病患者のための分子標的癌予防法の開発

研究課題名(英文) Development of the molecular targeting cancer prevention for diabetics by the activation of TRAIL pathway.

## 研究代表者

友杉 真野(堀中真野)(Tomosugi(Horinaka), Mano)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80512037

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)：本研究課題では、糖尿病による免疫力低下の結果、抗腫瘍免疫を担うサイトカインであるTRAILの減少が生じ、それにより発がんに至る可能性について検証を行った。2型糖尿病モデルラットおよびマウスの臓器サンプルを用い、正常個体とのTRAIL mRNAの発現量比較解析を行った。その結果、糖尿病モデル動物の大腸と膵臓由来のcDNAサンプルで、正常に比してTRAIL発現量が低いという結果が示された。一方、糖尿病治療薬であるメトホルミンがヒト膵臓癌細胞に対し、TRAIL誘導性アポトーシスを増強することを見出した。

研究成果の概要(英文)：TRAIL is a cytokine which can induce apoptosis against cancer cells and contribute to cancer prevention. We examined whether the decline of immunity due to diabetes resulted in the down-regulation of TRAIL expression causing subsequent carcinogenesis. We compared the expression of TRAIL mRNA of the organ samples from a type 2 diabetes model of the rat and mouse with those from normal animals. As the results, TRAIL expressions of cDNA samples derived from large intestine and pancreas of the diabetes model animals were lower than those from normal animals. On the other hand, a diabetes therapeutic drug metformin enhanced the TRAIL sensitivity for several human pancreatic cancer cells.

研究分野：がん予防

キーワード：がん 糖尿病 予防 TRAIL

### 1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病人口は2012年時点で約4億人弱、日本でも約700万人と報告された。2013年には、日本糖尿病学会と日本癌学会の合同委員会である「糖尿病と癌に関する委員会」の報告によると、8つの日本人対象のコホート研究をプール解析した結果、糖尿病患者のがん罹患リスクは、非糖尿病患者と比べ、男女ともに1.19倍と、有意な差が示された。国民の4人に1人以上が糖尿病かその予備群であることが、厚生労働省の調査報告によって明らかにされた今、がん予防を考える立場からも深刻な問題である。

糖尿病罹患による発がん率の上昇を十分に説明する分子メカニズムについては、現在のところ完全には解明されていない。唯一、AMPK活性化を介したインスリンやIGF-1産生の抑制によってがん細胞の増殖を抑えているというメカニズムから、糖尿病治療薬のメトホルミンが注目を集めている (Clin. Sci., 122, 253, 2012)。しかしながら、現時点ではメトホルミン治療とがん発症率との間には、相関性は不十分であるとのことから、今後さらなる調査を要するとの判断が下された (「糖尿病と癌に関する委員会」, Cancer Sci., 104, 965, 2013)。

一方、糖尿病患者の血清中 TRAIL レベルの低下 (Diabetes Res. Clin. Pract., 96, e84, 2012) や、糖尿病合併症の一つである冠動脈疾患の患者における血清中 TRAIL レベルの低下が報告され (Thromb. Res., 125, 322, 2010)、血中 TRAIL は糖尿病合併症のマーカー候補として注目されている。

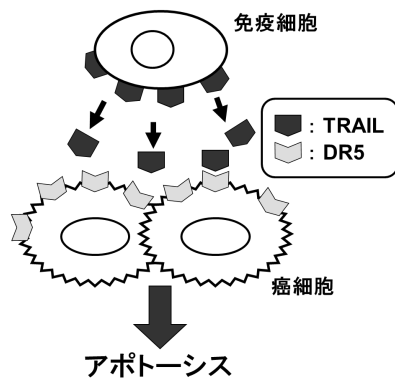


図1 TRAIL経路による癌細胞特異的アポトーシス誘導

TRAIL は受容体である DR5 に結合することで、標的とする癌細胞特異的にアポトーシスを誘導する (図1)。これまで数々の研究により、DR5 が腫瘍にのみ高発現していることが明らかにされ、腫瘍細胞特異的に抗腫瘍効果を示すサイトカインとしてがん研究で特に注目を集めてきた。実際、TRAIL や DR5 のノックアウトマウスでは発がん率の増加が認められたことから (J. Immunol., 175, 5586, 2005; J. Clin. Invest., 118, 100, 2008) TRAIL および DR5 はがん予防において最も重要な分子の一つであると考えられている。

そこで、今回、糖尿病の症状の一つとして挙げられる『免疫力の低下』と、『体内 TRAIL 量の低下』に着目した。

### 2. 研究の目的

現在、最も注目されている問題の一つは、糖尿病の既往と発症率との関連性である。多くの要因からの複合的な事象と考えられているが、本研究では上記の「糖尿病患者において血中 TRAIL の濃度が低下している。」という事象に着目した。すなわち、糖尿病発症によって体内免疫力の低下が生じることで、抗腫瘍免疫を担う体内 TRAIL 量が低下することによりがんになりやすくなっているのではないかと考えた。本研究では、上記仮説に沿って実験を行うことで、糖尿病から誘発される癌における TRAIL の意義を検証する。得られた結果によっては、糖尿病患者における分子標的癌予防法の一つとして、TRAIL 経路活性化を提案したい。

### 3. 研究の方法

1) 代表的 2 型糖尿病モデル動物として広く用いられている、ZDF ラット (レプチン受容体変異) および db/db マウス (レプチン受容体変異) の臓器由来の cDNA を用い、正常個体との比較によって TRAIL mRNA の発現解析を行った。

2) 糖尿病が発癌におけるリスクファクターとされる膵臓に対して着目する。ヒト膵臓癌細胞株に対し、糖尿病治療薬であるメトホルミンが TRAIL 経路活性化能を有するか否か、検討した。

まず、TRAIL 誘導性アポトーシス増強効果について検討するため、メトホルミンと TRAIL の併用曝露後、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞の割合を解析した。

TRAIL 受容体である DR5 の発現へのメトホルミンの影響を検討した。Western blotting、フローサイトメトリー解析により、タンパク質レベルの DR5 発現量の変化を評価した。さらに、real time RT-PCR 解析により、mRNA レベルの DR5 の発現量への影響も評価した。

### 4. 研究成果

1) 糖尿病モデルラット由来の組織サンプルの内、眼と膵臓では正常と比較して TRAIL 発現量は低かった (図2: ラット膵臓)。一方、腎臓、大動脈、肝臓では、正常と比較して TRAIL 発現量は高かった (特に肝臓サンプルで顕著な傾向)。臓器によって、糖尿病個体における TRAIL 発現量の変動は差があると考えられる。

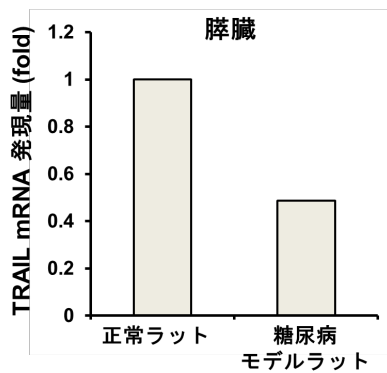


図2 糖尿病モデル個体と正常個体の膵臓におけるTRAIL mRNA発現量の比較 (未公表)

糖尿病モデルラットの結果を受けて、糖尿病モデルマウス由来の組織サンプルとして膵臓と、以下の理由により大腸癌を対象癌として視野に入れ、新たに大腸の TRAIL mRNA 発現量について検討することとした。

(大腸癌も、膵癌と同様、糖尿病既往と発癌率については正の相関が報告されている。本研究の今後の方針として、動物発癌実験を計画していたが、化学発癌ではマウスおよびラットにヒト膵癌の大多数である膵管癌を発生させることが困難とされる。一方、糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いた大腸発癌モデルは、糖尿病と大腸発癌の関連を検討するための有用なモデルとして頻用されている。)

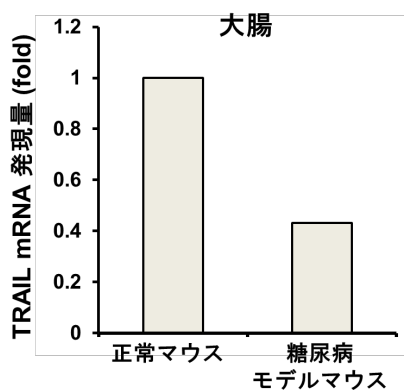


図3 糖尿病モデル個体と正常個体の大腸におけるTRAIL mRNA発現量の比較 (未公表)

その結果、糖尿病モデルマウスの膵臓と大腸由来の cDNA サンプルで、正常に比して TRAIL 発現量が低いという結果が示された (図3: マウス大腸)。すなわち、前述の糖尿病患者における報告と同様に、ラット・マウスのいずれの動物モデルにおいても、糖尿病発症が体内 TRAIL 発現の低下をもたらしている可能性が考えられる。

2) ヒト膵癌細胞株として、PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1 を使い、メトホルミンが TRAIL 感受性増強作用を有するか否か、フローサイトメトリーによって解析した。その結果、いずれの細胞においても、有意にメトホルミンと TRAIL 併用によるアポトーシス増強効果が認められた (図4)。

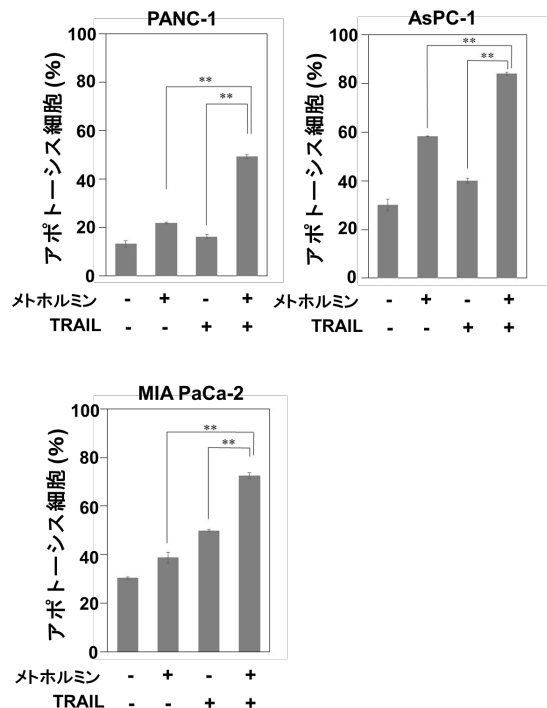


図4 ヒト膵臓癌細胞株におけるメトホルミンによるTRAIL感受性増強効果

メトホルミンによって TRAIL 誘導性アポトーシスの増強が認められたことから、TRAIL の受容体である DR5 の発現への影響について検討した。Western blotting の結果、メトホルミン濃度依存的に DR5 の発現増強効果が認められた (図5)。

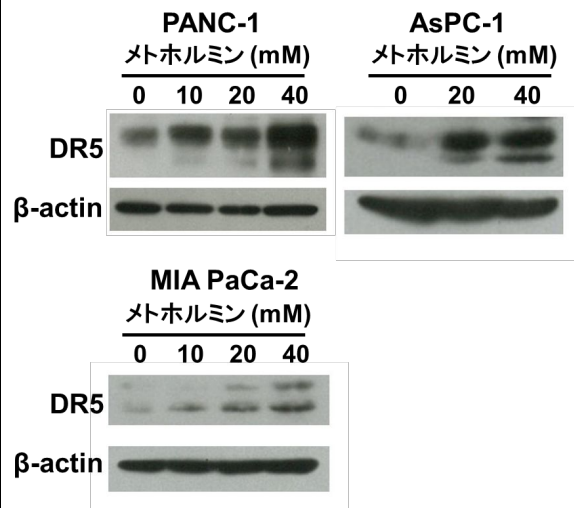


図5 ヒト膵臓癌細胞株におけるメトホルミンによるDR5発現増強効果

さらに、フローサイトメトリー解析によって、ヒト膵癌 PANC-1 細胞において、細胞表面における DR5 の発現増強効果も認められた(図6)。

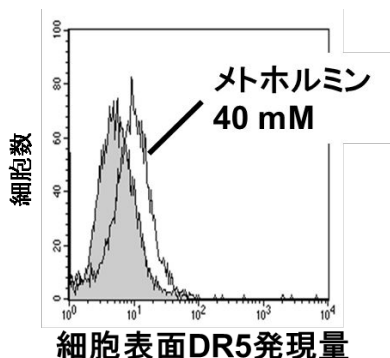


図6 ヒト膵臓癌細胞株におけるメトホルミンによる細胞表面DR5発現増強効果

また、DR5 mRNA の発現へのメトホルミンの影響を検討した結果、メトホルミン濃度依存的な DR5 mRNA の発現誘導効果が認められた(図7)。

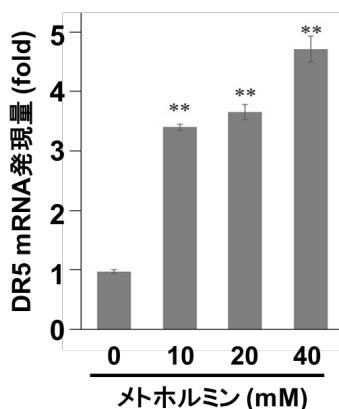


図7 ヒト膵臓癌細胞株におけるメトホルミンによるDR5 mRNA発現増強効果

#### 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1件)

Ryoichi Tanaka, Mitsuhiro Tomosugi, Mano Horinaka, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai.

Metformin causes G1-Phase arrest via down-regulation of miR-221 and enhances TRAIL sensitivity through DR5 up-regulation in pancreatic cancer cells.

PLoS One. 2015 May 8;10(5):e0125779.

doi: 10.1371/journal.pone.0125779.

査読有

〔学会発表〕(計1件)

堀中真野、田中良一、友杉充宏、曾和義広、

酒井敏行

メトホルミンはヒト膵癌細胞に対し、miR-221 抑制を介した G1 期停止作用と、DR5 発現誘導を介した TRAIL 感受性増強作用を有する

第 15 回分子予防環境医学研究会

(会場: 自治医科大学 地域医療情報研修センター、栃木県下野市)

2016 年 1 月 30 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

友杉(堀中) 真野

(TOMOSUGI (HORINAKA), Mano)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80512037

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: