

令和元年6月20日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05260

研究課題名(和文) 糖尿病による癌リスク増大機序の解明と、分子標的癌予防法の提案

研究課題名(英文) Study of the mechanism of cancer-risk increase due to diabetes and suggestion of the molecular-targeting cancer prevention for the cancer

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、糖尿病とレプチン、抗腫瘍免疫を担うサイトカインであるTRAILの関係性について検証を行った。2型糖尿病モデルマウスの臓器サンプルを用い、TRAILおよびレプチンのmRNAの発現量解析を行った結果、糖尿病モデルマウスの臓器サンプルで、対照個体に比してTRAIL発現量が低くレプチン発現量が高いという結果が示された。また、ヒト正常末梢血単核球を対象にレプチンを添加することで、TRAIL産生量の減少が部分的に認められた。さらに糖尿病患者検体や腫瘍部において発現上昇が報告されている、アポトーシス抑制分子PEDに着目し、PED発現抑制成分のスクリーニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では複数の疫学研究の結果から「日本人糖尿病患者の癌罹患リスク増大」が報告され、重大な社会的問題として取り上げられているが、その分子機序については現在も十分に明らかとされていない。本研究課題の成果は、癌予防に寄与するサイトカインであるTRAILの発現低下が、その一機序の説明になりうるかもしれないことを示している。研究代表者らが取り組んでいる、TRAIL経路の活性化による癌予防法の提案・応用に向けて、今回の研究成果が生かせられると考えている。

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 have focused on TRAIL and examined whether the decline of immunity due to diabetes resulted in the down-regulation of TRAIL expression causing subsequent carcinogenesis and the up-regulation of leptin expression.

We compared the expression of TRAIL mRNA of the organ samples from a type 2 diabetes model of the mouse with those from the control mouse. As the results, TRAIL expressions of cDNA samples derived from lung of the diabetes model animals were lower than those from control mouse. Next, we showed the suppressive effect of leptin against the IFN-activated PBMCs to produce TRAIL. Furthermore, we focused on PED which were reported to be overexpressed in type 2 diabetes mellitus and mediate TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. Therefore, we tried the screening of the down-regulator of PED expression.

研究分野：がん予防医学

キーワード：がん予防 糖尿病 TRAIL

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

1. 研究開始当初の背景

- (1) 2014年の報告によると、世界の糖尿病人口は約4億人弱、2035年には6億人にまで達すると予測されており (IDF Diabetes Atlas 6th Edition 2014 update)、糖尿病の予防対策を推し進める政策が、世界規模で求められている。さらに、2013年の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」の報告では、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、糖尿病患者の癌罹患リスクは、非糖尿病患者に比して、有意に高いことが示されている。国民健康・栄養調査結果 (厚生労働省) から、日本人の糖尿病患者とその予備群とされる人は、およそ2000万人に上ることが報告されている今、癌予防を考える立場からも、こういった状況は深刻な問題である。
- (2) 研究代表者は、これまで、抗腫瘍性サイトカインのTRAILの癌予防への寄与について研究を続けてきた。TRAILは、特異的受容体 (DR5) への結合を介し、癌細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導する。TRAILの主な産生細胞は、活性化T細胞、NK細胞、樹状細胞、好中球などであるが、その他にも腫瘍細胞を含む様々な細胞、組織で発現が確認されている。研究代表者が前年度までに取り組んでいた挑戦的萌芽研究 (課題番号: 26670336) の成果として、2型糖尿病モデルラットの各種臓器由来のサンプルと正常個体サンプル間でTRAIL mRNAの発現量比較解析を行い、眼と膵臓では糖尿病個体サンプルのTRAIL発現量が低いという結果が得られていた。さらに2型糖尿病モデルマウスのサンプルを用い、同様にTRAIL mRNAの発現量比較解析を行った結果、糖尿病マウス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。すなわち、前述の糖尿病患者における報告と同様に、マウス・ラット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た。さらに、岐阜大学大学院医学系研究科消化器病態学より提供された糖尿病モデルマウスのホルマリン固定パラフィン包埋組織サンプルを用い、免疫組織学的検証を行った。解析の結果、糖尿病個体と、正常個体サンプルとの間に顕著なTRAIL発現量の差は認められなかった。

2. 研究の目的

本邦では複数の疫学研究の結果から「日本人糖尿病患者の癌罹患リスク増大」が報告され、重大な社会的問題として取り上げられているが、その分子機序については現在も十分に明らかとされていない。本研究課題の研究代表者らは癌予防研究を続ける中で、『糖尿病による癌リスク増大』と『糖尿病患者における血清中TRAIL量の低下』という既報に着目した。TRAILは、発癌予防に寄与しうるサイトカインとして抗腫瘍免疫を担っている。糖尿病によって体内TRAILの減少が生じ、発癌の一因となっているという可能性が考えられる。本研究課題では、『「糖尿病」 「癌の発症・増悪」 「TRAIL経路」の関連性の解明』と『発癌ハイリスク集団である糖尿病患者のための分子標的癌予防法の開発』を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 肥満モデルマウス膵臓サンプルを用いたTRAILとレプチンのmRNA発現量の比較 (real time RT-PCR)
岐阜大学大学院医学系研究科消化器病態学より提供された、高脂肪食 (HFD) による2型糖尿病・肥満モデルマウスのホルマリン固定パラフィン包埋組織サンプル (膵臓) よりRNAを抽出し、real time RT-PCRによる発現量比較試験を行った。
- (2) db/dbマウス、対照マウスの肺におけるTRAILとレプチンのmRNA発現量の比較 (real time RT-PCR)
14週齢の雄のdb/dbマウス (レプチン受容体Ob-Rb異常マウス)、db/+マウス (対照マウス) を安楽死させ、全血採血後、各種臓器 (膵臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、腸間膜リンパ節 (MLN)) を摘出し、氷冷した。各臓器重量を測定後、gentleMACS Dissociatorにて破碎し、RNA抽出・精製・cDNA化した後、real time RT-PCRによる発現量比較試験を行った。
- (3) HFDを与えたマウス (DIOマウス) と、対照 (正常) マウスの各種臓器におけるTRAIL mRNA発現量の比較 (real time RT-PCR)
16週齢の雄の高脂肪食を与えたC57BL/6マウス (DIOマウス)、通常食を与えたC57BL/6マウス (対照マウス) を安楽死させ、全血採血後、各種臓器 (膵臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、腸間膜リンパ節 (MLN)) を摘出した。以降、(2)と同様の方法により、real time RT-PCRによる発現量比較試験を行った。
- (4) DIOマウスと、対照 (正常) マウスの肺におけるTRAIL陽性NK細胞の比較 (FACS)
(3)で回収した肺の一部をシングルセル化して、各種抗体を用い、TRAIL陽性NK細胞

胞の population を FACS 解析し、群間比較を行った。

(5) TRAIL 産生細胞集団におけるレプチンの影響の検討(FACS、real time RT-PCR)
ヒト PBMC における細胞表面 TRAIL 発現量へのレプチンの影響について、細胞表面の膜型 TRAIL の発現変動について FACS 解析で評価した。また、mRNA 発現量の変動についても、real time RT-PCR による検討を行った。

(6) 糖尿病に関係する分子を標的としたヒト肺癌細胞を用いた TRAIL 感受性増強成分の探索 (real time RT-PCR、WST-8 assay)

糖尿病患者は、体内 TRAIL 発現量が低い。さらに、糖尿病が関係する癌の場合、癌細胞は TRAIL 抵抗性を獲得している可能性が指摘されている。そこで、PED (phosphoprotein enriched in diabetes) に注目した。PED は 2 型糖尿病において脾細胞をはじめとしたさまざまな細胞で高発現している (EMBO J. 1998; 17: 3858-66.)。肺を含む種々の腫瘍部で PED の発現亢進が報告されている。アポトーシス耐性に関連した機能としては、FLIP に近い (Rev Recent Clin Trials. 2009;4:34-41.)。肺の腫瘍部および肺癌細胞では、PED が高発現しており、TRAIL 誘導性アポトーシス耐性に寄与している。PED は DED (death effector domain) を有しているため、FADD に結合することで DISC 形成を阻害している (J Cell Mol Med. 2008;12: 2416-26.)。

糖尿病患者の腫瘍細胞側の TRAIL の感受性を高めるためには、PED の発現抑制も必要かもしれない。慢性リンパ性白血球細胞に対し、HDAC 阻害剤は PED 発現を抑制することで TRAIL 感受性を増強することが報告されている (Int J Cancer. 2007;120:1215-22.)。まずは既報を参考に、HDAC 阻害剤の肺癌細胞における PED 発現抑制作用を検証し、PED 発現抑制成分のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 肥満モデルマウス脾臓サンプルを用いた TRAIL とレプチンの mRNA 発現量の比較 (real time RT-PCR)

TRAIL とレプチンとの関連が示唆される (図 1)。

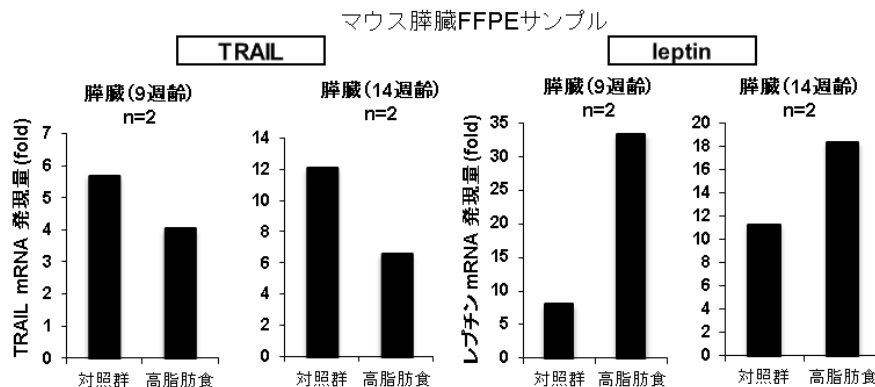
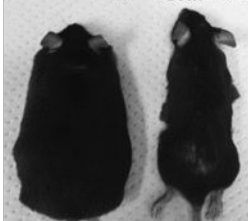


図1 糖尿病モデル個体と正常個体の脾臓におけるTRAIL およびレプチンmRNA発現量の比較 (未公表)

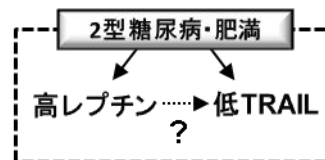
(2) db/db マウス、対照マウスの肺における TRAIL とレプチンの mRNA 発現量の比較 (real time RT-PCR)

肺をはじめとする複数の臓器において、対照マウスに比して db/db マウスで TRAIL mRNA 発現量は有意に低く、逆にレプチン mRNA 発現量は有意に高いという結果が得られた (n=5、データ未公表)。2 型糖尿病・肥満において、TRAIL とレプチンとの関連性が示唆される。

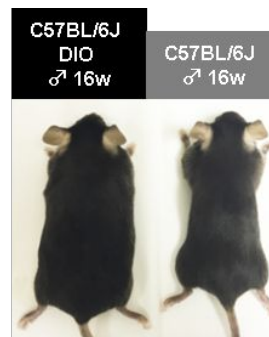
db/dbマウス 対照マウス



db/dbマウス
レプチン受容体異常
⇒高レプチン血症、肥満



- (3) HFD を与えたマウス (DIO マウス) と、対照マウス (正常) の各種臓器における TRAIL mRNA 発現量の比較 (real time RT-PCR)
db/db マウスと対照マウスとの比較で認められたほどの TRAIL 発現量の差は認められなかった (n=5、データ未公表)



肥満個体(食事モデル)と正常個体

- (4) DIO マウスと、対照マウス(正常)の肺における TRAIL 陽性 NK 細胞の比較 (FACS)
TRAIL 陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった (n=5、データ未公表)

- (5) TRAIL 産生細胞集団におけるレプチンの影響の検討(FACS、real time RT-PCR)
ヒト PBMC にレプチンを前処理することによって、IFN- γ による TRAIL 発現誘導能に対し、細胞表面 TRAIL 発現量および TRAIL mRNA 発現量に対し、抑制効果が認められた (いずれもデータ未公表)。TRAIL の発現に対するレプチンの負の影響は、転写制御、mRNA の安定化、さらにはプロモーターレベルでの制御の可能性が示唆される。

- (6) 糖尿病に関係する分子を標的としたヒト肺癌細胞を用いた TRAIL 感受性増強成分の探索 (real time RT-PCR、WST-8 assay)

Natural Product Library(L1400、selleck 社)を用い、PED 発現抑制成分のスクリーニングを行った。陽性対照として、既報により PED 発現抑制効果が報告されているトリコスタチン A (TSA) を用いた。

最初に 3 種類のヒト肺癌細胞を対象に、TSA による PED 発現抑制作用を検討し、最も抑制作用が顕著であった H460 を用いることとした。この試験の中で、TSA と同時に比較した化合物 X (HDAC 阻害剤) についても PED 発現抑制作用が認められた。この化合物 X についての既報は無く、新規性を有している。一方、Natural Product Library の 173 化合物を対象に PED 発現抑制効果を検証した結果、30 種類の化合物に、再現性をもってその可能性が示された。そこで、これらの化合物を対象に、TRAIL 感受性増強作用について WST-8 assay にて検討した結果、一種類の化合物 (No.57) が、TRAIL との顕著な併用効果を示した (図 2)。しかしながら、この化合物を単独で再購入し、試験を行ったが PED 発現抑制作用は確認できなかった。この化合物は、既に別のアポトーシス経路への制御により、細胞は異なるが TRAIL との併用効果は報告されているため、本研究ではこれ以上の検討は控えることとした。

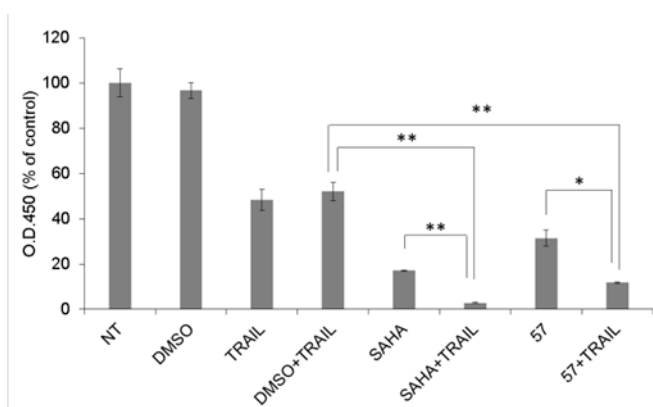


図2 ヒト肺癌細胞に対する化合物No.57のTRAIL感受性増強作用 (未公表)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Ono H, Sowa Y, Horinaka M, Iizumi Y, Watanabe M, Morita M, Nishimoto E, Taguchi T, Sakai T.

The histone deacetylase inhibitor OBP-801 and eribulin synergistically inhibit the growth of triple-negative breast cancer cells with the suppression of survivin, Bcl-xL, and the MAPK pathway.

Breast Cancer Research and Treatment, 査読有

2018 Aug;171(1):43-52.

doi: 10.1007/s10549-018-4815-x.

Takamura T, Horinaka M, Yasuda S, Toriyama S, Aono Y, Sowa Y, Miki T, Ukimura O, Sakai T.
FGFR inhibitor BGJ398 and HDAC inhibitor OBP-801 synergistically inhibit cell growth and induce apoptosis in bladder cancer cells.
Oncology Reports, 査読有
2018 Feb;39(2):627-632.
doi: 10.3892/or.2017.6127.

〔学会発表〕(計 4 件)

堀中真野, 曾和義広, 三木恒治, 浮村理, 酒井敏行. FGFR inhibitor BGJ398 and HDAC inhibitor OBP-801 synergistically induce apoptosis in bladder cancer cells. (FGFR 阻害剤 BGJ398 と HDAC 阻害剤 OBP-801 との併用による、ヒト膀胱癌細胞に対するアポトーシス増強作用)
第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日 ; 大阪. 口演.

小野寿子, 曾和義広, 堀中真野, 飯泉陽介, 渡邊元樹, 田口哲也, 酒井敏行. The novel combination treatment of a HDAC inhibitor OBP-801 with eribulin for triple-negative breast cancer cells. (トリプルネガティブ乳癌細胞に対する新たな併用療法 HDAC 阻害剤 OBP-801 とエリブリン)
第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日 ; 大阪. ポスター.

堀中真野.
食べて防ごう！ がん化学予防への挑戦！
おかやまバイオアクティブ研究会第 53 回シンポジウム. 招聘講演 2018 年 6 月 14 日 ; 岡山.

堀中真野, 飯泉陽介, 渡邊元樹, 増田光治, 曾和義広, 酒井敏行.
The strategy of molecular-targeting cancer prevention (がんの分子標的予防戦略)
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ 2017 年 12 月 7 日 ; 神戸. 口演.

〔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 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://fkpu-m-pubmed.com/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。