

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08532

研究課題名（和文）癌細胞におけるGLP-1受容体発現の生物学的意義の解明

研究課題名（英文）GLP-1 receptor expression in cancer cells

研究代表者

野見山 崇 (Nomiyama, Takashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10532559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、前立腺がんの進行とGLP-1受容体発現の相関を検証するとともに、レンチウイルス・ベクターを用いてGLP-1受容体を強制発現した際の前立腺癌増大への影響を検討した。ヒト前立腺がん組織におけるGLP-1受容体の発現は、Gleasonスコア進行度と逆相関した。レンチウイルス・ベクターでGLP-1受容体を前立腺癌細胞株に強制発現すると、細胞増殖がin vivo, in vitroで有意に抑制され、GLP-1シグナルがSKP2の発現を抑制し、p27Kip1の発現が上昇することで、細胞周期を抑制していることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病治療の目標は患者の寿命の延長とQOLの確保にある。わが国の糖尿病患者の死因第1位が癌であることを鑑みるに、癌の発症進展を抑制する糖尿病診療を行うかが、患者の寿命を延長する糖尿病診療をするかということに言い換えることも過言ではない。しかし、糖尿病治療薬の癌に対する影響の研究は、世界的にもまだ途に就いたばかりである。本研究はGLP-1シグナルが、前立腺癌の進行抑制に作用することを確証した貴重な研究であり、GLP-1やその受容体発現が前立腺癌の治療や予後予測の一助になる可能性を示唆した重要な研究と言える。今後臨床研究へと発展する可能性があり、また他の癌腫でも検証されることに期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：We examined the relationship between human prostate cancer severity and GLP-1R expression, as well as the effect of forced expression of GLP-1R using a lentiviral vector. GLP-1R expression levels were significantly inversely associated with the Gleason score of human prostate cancer tissues. Abundant GLP-1R expression and functions were confirmed in ALVA-41-GLP-1R cells. Exendin-4 significantly decreased ALVA-41-GLP-1R cell proliferation in a dose-dependent manner. DNA synthesis and G1-to-S phase transition were inhibited in ALVA-41-GLP-1R cells. SKP2 expression was decreased and p27Kip1 protein was subsequently increased in ALVA-41-GLP-1R cells treated with exendin-4. In vivo experiments performed by implanting ALVA-41-GLP-1R cells demonstrated that exendin-4 decreased prostate cancer growth by activation of GLP-1R overexpressed in ALVA41-GLP-1R cells. Forced expression of GLP-1R attenuates prostate cancer cell proliferation by inhibiting cell cycle progression in vitro and in vivo.

研究分野：糖尿病合併症・併存症

キーワード：糖尿病 前立腺癌 GLP-1 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の糖尿病患者の死因第一位は悪性新生物である。

(2) 糖尿病患者ではインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症や内臓脂肪の蓄積と高血糖に伴う酸化ストレスなどから癌の発症進展が促進されることは分かっているが、糖尿病治療薬の癌に対する影響は、メトホルミンの抗癌作用を示唆する研究以外、ほとんど行われていないのが現状であった。

(3) 我々は過去の研究で、ヒト前立腺癌組織に GLP-1 受容体が発現していること、GLP-1 受容体作動薬が前立腺癌細胞増殖を抑制することを見出し報告した<sup>1)</sup>。また、GLP-1 受容体作動薬とメトホルミンの併用が相乗効果で前立腺癌増大を抑制することや<sup>2)</sup>、GLP-1 受容体作動薬が乳癌増大も抑制することも見出し報告してきた<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト前立腺癌組織における GLP-1 受容体の発現と前立腺癌進行度の相関を検証する。

(2) GLP-1 受容体を内因性に発現していないヒト前立腺癌細胞株 ALVA-41 細胞に GLP-1 受容体を強制発現させた場合、前立腺癌細胞増殖が再現されるかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 福岡大学病院で手術をされた糖尿病のない前立腺癌患者 30 名 (20~85 才) の組織切片を用いて Gleason スコアを評価し、免疫染色も行った。本研究は福岡大学病院倫理委員会の承認を得ている (15-2-03)。

(2) ヒト GLP-1 受容体を発現するレンチウイルス・ベクターは、the pFLAG CMV-2 expression vector (Cat. # E7033 Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), pLVSIN-EF1 $\alpha$  (Cat. #6186, Clontech, Mountain View, CA, USA) を用いて作成した。

(3) 細胞増殖は成長曲線、細胞周期、BrdU アッセイを用いて検証し、遺伝子発現は定量的 RT-PCR を、タンパク発現は Western blotting を用いて検証した。

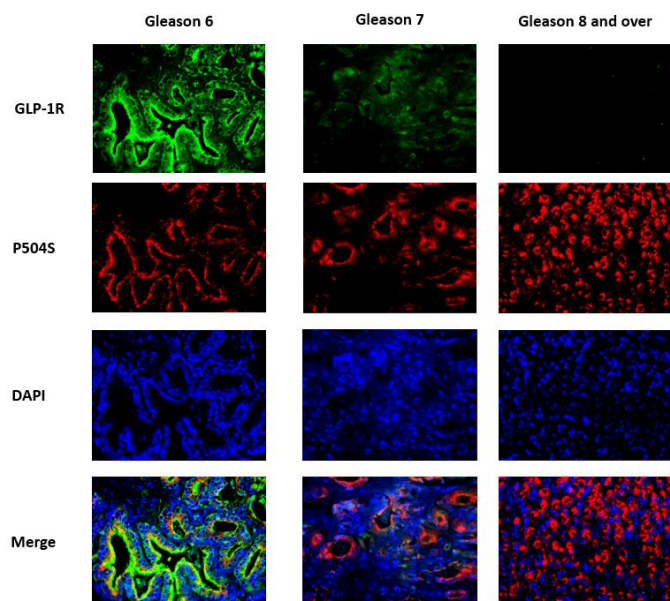
(4) Xenograft モデルを用いてヌードマウスの背部に癌細胞を播種させ、インフュージョンポンプで GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 (Ex-4) を投与した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト前立腺癌組織における GLP-1 受容体発現は癌の進行と逆相関する

既報同様に、ヒト前立腺に GLP-1 受容体の発現を認めた。Gleason スコアによる前立腺癌の進行度と GLP-1 受容体の発現は逆相関を認めた (図 1)。

図 1



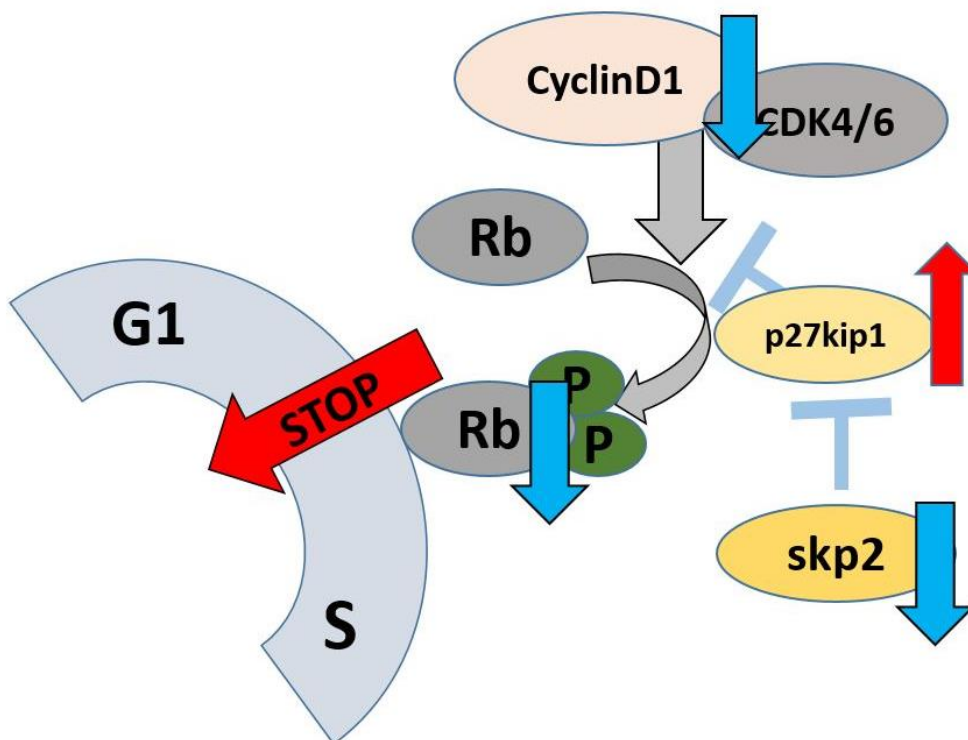
(2) 強制発現された GLP-1 受容体は前立腺癌細胞増殖を抑制する *in vitro*

内因性の GLP-1 受容体発現を認めない前立腺癌細胞株 ALVA-41 細胞にレンチウイルスでヒト GLP-1 受容体を強制発現させ、遺伝子発現とタンパク発現を確認した。Ex-4 によって細胞内 cAMP 濃度が上昇することから、強制発現された受容体が機能していることが分かった。GLP-1 受容体の強制発現と Ex-4 投与によって、ALVA-41 の増殖は有意に抑制された。

(3) 強制発現された GLP-1 受容体は細胞周期を抑制した

細胞周期を検討すると、GLP-1 受容体を発現された ALVA-41 は、S 期へのエントリーが抑制されていることが分かった。さらに、SKP 2 の発現を抑制することで、細胞周期の抑制因子である p27Kip1 のタンパク発現が上昇していることがメカニズムとして解明された。また、サイクリン D1 の発現低下も認めた。今回解明されたメカニズムのまとめを図 2 に示した。

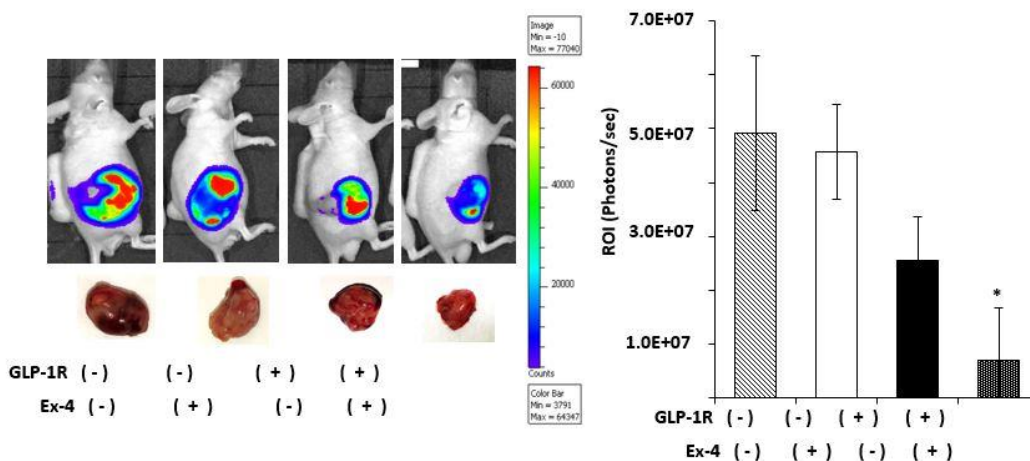
図 2



(4) 強制発現された GLP-1 受容体は前立腺癌細胞増殖を抑制する *in vivo*

GLP-1 受容体を強制発現された ALVA-41 細胞とコントロール ALVA-41 細胞を、Xenograft モデルを用いてヌードマウスに播種させ、Ex-4 をインフュージョンポンプで持続投与したところ、前立腺癌の増大を有意に抑制していることが分かった (図 3)。

図 3



<引用文献>

1. Nomiya T, Kawanami T, Irie S, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Murase K, Tsutsumi Y, Nagaishi R, Tanabe M, Morinaga H, Tanaka T, Mizoguchi M, Nabeshima K, Tanaka M, Yanase T. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates prostate cancer growth. *Diabetes* 2014 Nov;63(11):3891-905.
2. Tsutsumi Y, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Tanaka T, Murase K, Motonaga R, Tanabe M, Yanase T. Combined treatment with Exendin-4 and metformin attenuates prostate cancer growth. *PLOS ONE* 2015 Oct 6 ;10(10) :e0139709
3. Iwaya C, Nomiya T, Komatsu S, Kawanami T, Hamaguchi Y, Yoshinaga Y, Yamashita S, Tanaka T, Terawaki Y, Tanabe M, Nabeshima K, Iwasaki A, Yanase T. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates breast cancer growth by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Endocrinology* 2017 Dec 1 ;158(12) :4218-4232.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tanaka Y, Iwaya C, Kawanami T, Hamaguchi Y, Horikawa T, Shigeoka T, Yanase T, Kawanami D, Nomiya T.                        | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Combined treatment with glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 and metformin attenuates breast cancer growth. | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Diabetology International  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Shigeoka T, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Horikawa T, Tanaka T, Irie S, Motonaga R, Hamanoue N, Tanabe M, Nabeshima K, Tanaka M, Yanase T, Kawanami D. | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Activation of overexpressed GLP-1R attenuates prostate cancer growth by inhibiting cell cycle progression.   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>J Diabetes Investig   | 6. 最初と最後の頁<br>1137-1149 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/jdi.13247  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                  |
|---|------------------|
| 1. 著者名<br>Toru Shigeoka, Takashi Nomiya, Takako Kawanami, Yuriko Hamaguchi, Tsuyoshi Horikawa, Tomoko Tanaka, Shinichiro Irie, Ryoko Motonaga, Nobuya Hamanoue, Makito Tanabe, Kazuki Nabeshima, Masatoshi Tanaka, Toshihiko Yanase, Daiji Kawanami | 4. 巻<br>NA       |
| 2. 論文標題<br>Activation of overexpressed GLP-1R attenuates prostate cancer growth by inhibiting cell cycle progression  | 5. 発行年<br>2020年  |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Diabetes Investigation   | 6. 最初と最後の頁<br>NA |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/jdi.13247.   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Toru Shigeoka, Takashi Nomiya                                |
| 2. 発表標題<br>Forced Expressed GLP-1R Attenuates Prostate Cancer Growth    |
| 3. 学会等名<br>American Diabetes Association 78th Scientific Sessions（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|