

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08634

研究課題名(和文) TIGARを介した大腸癌微小環境におけるインスリンシグナル活性化の研究

研究課題名(英文) Study of insulin signal activation by TIGAR in colorectal cancer microenvironment

研究代表者

鶴田 淳 (Tsuruta, Atsushi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00721961

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)：本研究における大腸癌臨床検体を用いたTIGAR遺伝子プロモーターメチル化解析では、メチル化の比率が高い傾向にあったが、無再発生存期間(RFS)あるいは全生存期間(OS)のいずれに対してもメチル化群、非メチル化群の間に統計学的有意差は認めなかった。ただメチル化群はOSがより良好である傾向にあった。またTIGARタンパク発現とRFS、OSの間にも統計学的有意差は認めなかったが、TIGAR発現の高度な群において再発が起こりやすい傾向を認めた。臨床分野におけるTIGARと大腸癌との一定の関係を示唆することは出来たが、TIGAR活性による発がん機構の解明にまでは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53の下流に位置するTIGARの活性化は糖新生を亢進し、そのノックアウトマウスでは腫瘍増殖能が減少する。本研究においてTIGARは大腸癌において有意にメチルされる遺伝子の一つの可能性であることが分かった。ただ我々の限定的な研究においてはメチル化群と長期予後との明らかな因果関係を認めることは出来なかった。またTIGARタンパク高発現群は再発が起こりやすい傾向にあった。今後TIGAR活性による発がん機構を解明することによりTIGAR標の新規創薬・治療の開発に向けたさらなる基礎研究と今後の臨床応用への礎を構築できると考える。

研究成果の概要(英文)：TIGAR gene promoter methylation analysis using colorectal cancer clinical specimens demonstrated that there were no significant differences between methylated and unmethylated group about neither relapse free survival (RFS) or overall survival (OS). There was tendency that methylated group had better OS. Moreover, there were no significant differences between TIGAR protein expression and RFS or OS, but there was tendency that worse RFS was shown in the group of high expression of TIGAR. This study could demonstrate some definite relation between TIGAR and colorectal cancer, but could not elucidate unexplained parts of mechanism of carcinogenesis by TIGAR activation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 TIGAR インスリン抵抗性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

p53 の下流に位置する TIGAR の活性化は糖新生を亢進し、そのノックアウトマウスでは腫瘍増殖能が減少することを研究代表者らは世界に先駆けて確認し報告した。TIGAR の活性化は結果的にインスリン抵抗性に関係なく、糖新生による内在性高インスリン状態を癌微小環境に提供する。高インスリン血症が細胞増殖活性を増強し、発癌リスクを上昇させることは周知の事実であるが、高インスリン血症を伴わない場合においても TIGAR の活性化により同等のリスク上昇が惹起されていると我々は考えている。本研究では、この仮説を検証するために、大腸癌における TIGAR 遺伝子の Copy Number Variant (CNV)、プロモーターメチル化の解析を行い、TIGAR 活性による発がん機構を解明する。さらにマイクロ RNA やメトホルミンを用いた TIGAR 標的新規創薬・治療の開発に向けた基礎研究を行い、今後の臨床応用への礎を構築する。

### 2. 研究の目的

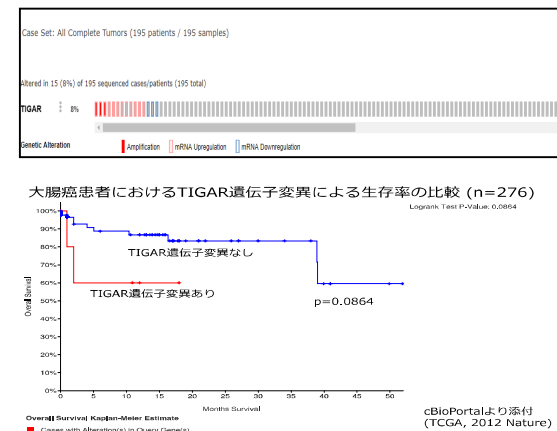
本研究は、TIGAR の活性化による大腸癌腫瘍進展の促進及び発癌リスクの上昇を遺伝子変異レベルでの解析による検討と、マイクロ RNA やメトホルミンを用いた TIGAR を標的とした新規創薬・治療の開発に向けた基礎研究を目的とする。

### 3. 研究の方法

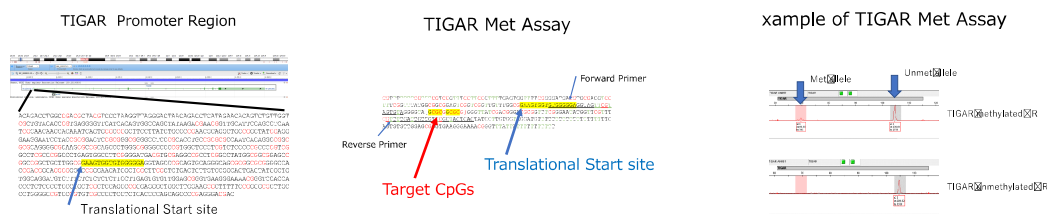
大腸癌臨床検体における TIGAR 遺伝子の CNV、メチル化解析による分類と臨床病理学的因子・予後の検討

TIGAR 遺伝子を抑制するマイクロ RNA (miRNA) 群を用い、マウスモデル・ヒト Cell line での TIGAR 遺伝子ノックダウンによる腫瘍増殖抑制効果の検討を行い、最適な TIGAR 遺伝子ノックダウン miRNA の選出

### 4. 研究成果



TIGAR の機能に注目すれば、その活性が強い場合は、糖新生による内在性高インスリン状態を常に癌微小環境に提供することになる。その結果、インスリン / IGF-1 受容体を介した MAPK-ERK 系の活性化を経て、細胞増殖促進とアポトーシス抑制が惹起される。我々はまず、この仮説が正しいかどうかを検証するために、cBioPortal から大腸癌症例の検討を行った (TCGA, Nature 2012 年のサンプル)。興味深いことに、195 例中 15 例 (8%) に TIGAR の amplification を認めた。更に興味深いことに、予後解析では、TIGAR amplification 群は統計的有意差をもって予後不良な傾向を認めた。



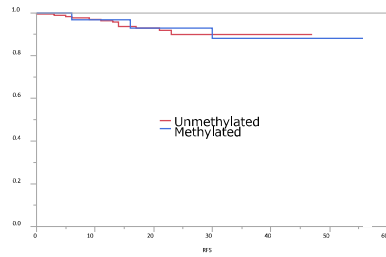
### Result of TIGAR Met Assay

- 274 CRC were analyzed
- 40 cases (14.6%) showed over 5% methylation = TIGAR Met Case

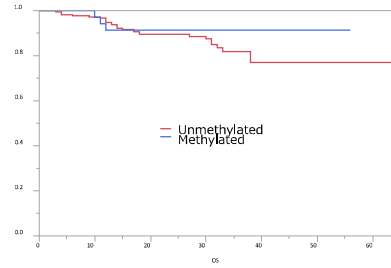
### Clinico-pathological Features

		TIGAR Methylation Status		P-value
		Met (n=40)	Unmet (n=234)	
Age	Mean (SD)	69.2 (10.3)	65.9 (13.3)	0.07
Gender	Female	18	107	0.9321
	Male	22	127	
UICC-Stage	I	7	69	0.2231
	II	12	53	
	III	14	58	
	IV	7	54	
Histology	Wel	12	92	0.5092
	Mod	22	108	
	Por	6	34	
Location	Right	12	79	0.6407
	Left	28	155	
KRAS/BRAF	BRAF	2	11	0.9965
	KRAS	13	76	
	Wild-type	25	147	

## RFS (Stage I-III with Curative Resection)



## OS (Stage I-IV)



大腸癌臨床検体におけるTIGAR遺伝子のCopy Number Variant (CNV)、メチル化解析による分類と臨床病理学的因子・予後の検討

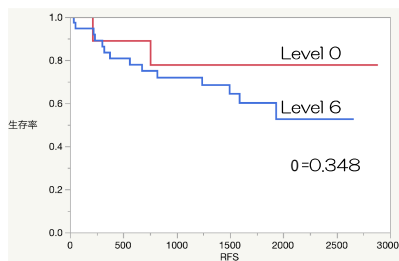
- ・大腸癌症例274検体を用いてメチル化解析を行った。40例（14.6%）に5%以上のメチル化を認めた。
- ・長期成績の解析ではStage I～IIIの無再発生存期間（Relapse free survival：RFS）およびStage I～IVの全生存期間（Overall survival：OS）についてメチル化群と非メチル化群の2群間で有意差は認めなかったが、OSにおいてメチル化群が非メチル化群に比べて良好な傾向を認めた。

進行大腸癌根治手術症例のTIGAR発現と生存期間の解析

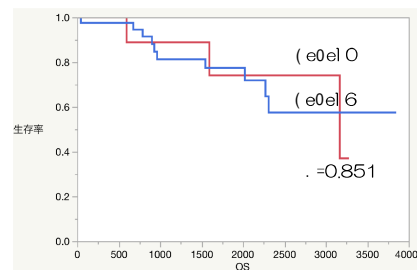
Stage II / III 106例 (Stage II C / III A / III B / III C = 3 / 5 / 74 / 24)

再発の有/無 = 35 / 71      RFS中央値 1385 ± 854日  
 転帰：生存/死亡 = 82 / 24      OS中央値 1575 ± 1024日

R ( S Sta. e3 64 )



OS Stage1 - III)



進行大腸癌根治手術症例のTIGAR発現と生存期間の解析

TIGAR発現を強度、範囲で評価しそれらの積算で判定 (Level 0～6段階)。  
 5年RFS (%) : Level 0 / 6 = 77.8 / 60.1 (p=0.348)  
 5年OS (%) : Level 0 / 6 = 74.1 / 77.4 (p=0.851)

RFS、OSで2群間に有意差は認めなかったものの、TIGAR発現の強い群は再発が起こりやすい傾向にあった。

## 結語

本研究においてTIGARは大腸癌において有意にメチルされる遺伝子の一つの可能性であることが分かった。ただ我々の限定的な研究においてはメチル化群と長期予後との明らかな因果関係を認めることは出来なかった。またTIGARタンパク高発現群は再発が起こりやすい傾向にあった。

今後TIGAR活性による発がん機構を解明することによりTIGAR標的新規創薬・治療の開発に向けたさらなる基礎研究と今後の臨床応用への礎を構築できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	永坂 岳司  (Nagasaka Takeshi)  (30452569)	川崎医科大学・医学部・准教授    (35303)	
研究分担者	眞部 紀明  (Manabe Noriaki)  (50403572)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	
研究分担者	上野 富雄  (Ueno Tomio)  (70284255)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	

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