

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15791

研究課題名（和文）糖尿病患者の大腸癌発生・進展におけるグルカゴンの意義に関する基礎的・臨床的検討

研究課題名（英文）Significance of glucagon in the development of colon cancer in diabetic patients

研究代表者

八木 崇志 (Yagi, Takashi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：00781840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病患者の死因は癌が最も多く、糖尿病と癌の重要性が提言されている。しかし、その機序は不明な点が多い。本研究では、複数のヒト大腸癌組織切片、マウス、ヒト大腸癌細胞株でのグルカゴンレセプター（GCGR）の発現を確認し、またグルカゴンの添加が大腸癌細胞の増殖を促進することを示した。細胞内シグナル伝達経路、MAPK、AMPKをグルカゴンは変化させることが発見された。in vivo、in vitroの検討により、グルカゴンはGCGRへの結合を介し、MAPK、AMPKなどの細胞内シグナル伝達経路を制御し、大腸癌の増殖を促進していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までグルカゴンと癌に関する研究についてはほぼ皆無であった。本研究により、高グルカゴンが大腸癌細胞増殖を促進することが示され、グルカゴンの持つ新たなメカニズムが明らかとなった。グルカゴンという新たな切り口から糖尿病と大腸がんの関連について新しい知見が得られ、糖尿病患者における大腸がんの罹患リスク低減や珍奇治療法の開発に今後貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Many papers have shown that diabetes patients are associated with cancer risk. In addition, the highest mortality of diabetes is cancer. However how diabetes increases the risk has not been well understood.

In this study we demonstrated glucagon receptor expressed some human colon cancer tissues, human colon cancer cell lines and mouse colon cancer cell lines. Glucagon promoted cell growth via AMP-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン 大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症原因は、未だ明らかにされていない。最近になってグルカゴンがその病態に深くかかわっていることが明らかにされつつあり、糖尿病の病態としてグルカゴン中心説が新たに提唱されている。これは、今まで広く受け入れられてきたインスリンとグルカゴンがバランスを取って血糖調節を行っているという2ホルモン説とは異なる考えで、糖尿病におけるグルカゴンの役割が再注目されるという状況が生じている。糖尿病患者における死因は、日本人の一般人口と同様に悪性新生物によるものが増加傾向にあり、死因の第1位となっている(糖尿病 50:47-61,2007)。糖尿病患者における発がんメカニズムについては、高血糖、インスリン抵抗性、高インスリン血症、慢性炎症、酸化ストレス等がその要因として報告されている(Kasuga M et al. Cancer Sci 104, 2013)。これまで高グルカゴン血症の癌の発育・進展への直接的な役割は明らかにされていないが、グルカゴンは高血糖を誘導する作用とともに、細胞増殖に関連したシグナル伝達系を活性化していることが報告されており、癌の制御に関与していることが推測される。またグルカゴンは肝細胞に作用し、糖新生を促進することが知られているが、解糖系をエネルギー産生経路の主体とする癌細胞(ワールブルグ効果)に対して、どのような作用をもたらすのかについては明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病患者の大腸癌罹患リスクの上昇に着目し、グルカゴンの大腸癌の発育・進展へのメカニズムを明らかにすることを目的とする。これまでの糖尿病における癌研究は、高血糖、インスリン抵抗性、アディポカイン産生といった糖尿病患者の病態生理からの研究であり、高グルカゴン血症の癌への直接的な作用については全く研究がなされていない。高グルカゴン血症と大腸癌の研究を通して、グルカゴンの新たなメカニズムを検討することにより、グルカゴンの機能解析への応用も可能であり、がん研究にとどまらず、糖代謝メカニズムの解明にも役立つものと考えられる。

## 3. 研究の方法

グルカゴン受容体発現大腸癌細胞の同定、グルカゴン受容体 knockdown 細胞株の樹立とグルカゴンによる大腸癌細胞増殖能についての検討  
グルカゴン受容体の発現はmRNA、蛋白レベルで解析する。グルカゴン受容体発現大腸細胞を選択し、グルカゴン受容体 shRNA 発現ベクターを細胞に導入し、グルカゴン受容体 knockdown 細胞株を樹立する。グルカゴン受容体発現細胞、グルカゴン受容体 knockdown 大腸がん細胞へグルカゴンを添加し、グルカゴン刺激による増殖能の影響を明らかにする。また、グルカゴン濃度が維持されるような実験系としてマウス大腸がん細胞株とグルカゴン産生細胞株である TC-1,6 細胞の共培養を行い増殖への影響を比較検討する。

グルカゴンによる大腸癌細胞内シグナル活性の影響、糖尿病モデルマウスを用いたグルカゴンの大腸がん発育への検討  
グルカゴン刺激したグルカゴン受容体発現大腸癌細胞から蛋白を抽出し、グルカゴンの細胞内シグナル伝達系、主に受容体型チロシンキナーゼの主要なシグナル伝達系、AMPKシグナル伝達系への関与をWestern blot法により検討する。siRNAを用い、グルカゴン受容体を knockdown し、グルカゴンのシグナル伝達系への影響が抑制されるか調べる。マウス腫瘍移植実験では、グルカゴンの大腸癌発育・進展への関与を調べる。糖尿病モデルマウス、C57BL/6-D10のグルカゴン濃度を測定、高グルカゴン状態を確認し、樹立したグルカゴン受容体 knockdown 細胞を移植し、グルカゴンによる腫瘍増殖への影響を調べる。腫瘍増殖の検討後、マウスから腫瘍細胞を摘出し、Ki67染色を行いグルカゴンによる腫瘍増殖能の影響について評価する。

## 4. 研究成果

大腸癌組織・細胞における GCGR の発現を mRNA、蛋白レベルで確認された。グルカゴンの添加は大腸癌細胞の増殖を有意に促進し(図1) siRNAを用いて GCGR を約 30% ノックダウンしたマウス大腸癌細胞では、グルカゴン刺激による細胞増殖促進効果は消失した。グルカゴン産生細胞株、TC-1-6 細胞をマウス大腸癌細胞と共培養したところ、大腸癌細胞の増殖が有意に促進されたが、GCGR を

ノックダウンした大腸癌細胞では TC-1-6 細胞との共培養での増殖促進効果は減弱していた。

グルカゴン刺激は大腸癌細胞の MAPK/Erk のリン酸化を誘導することが確認され、GCCR ノックダウン細胞においてはこれが消失していた。糖尿病モデルマウスを用いて、GCCR をノックダウンした大腸癌細胞を皮下移植したところ、コントロール大腸癌細胞と比べ腫瘍増大速度の有意な低下が認められた。免疫染色ではグルカゴン受容体 knockdown 大腸癌細胞では Ki67 陽性細胞数の有意な減少が観察された(図2)。

本研究により、ヒト大腸癌細胞が GCCR を発現することが示された。さらに in vivo、in vitro の検討により、高グルカゴン血症が大腸癌増殖促進作用を有する可能性が示された。

図 1

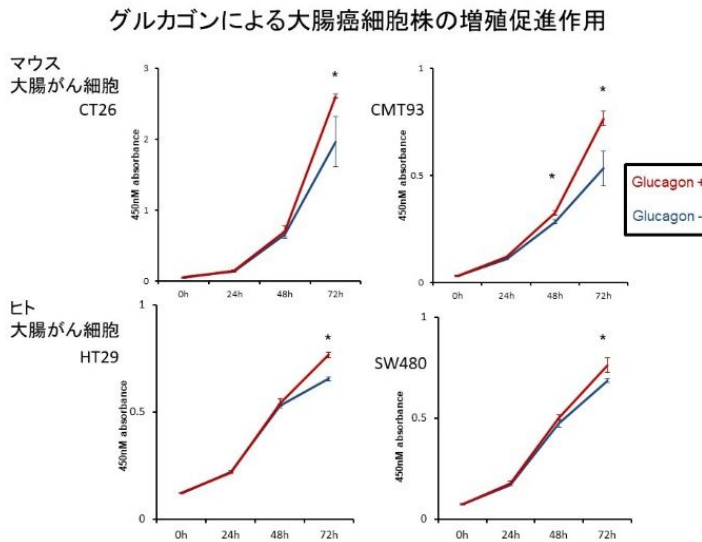
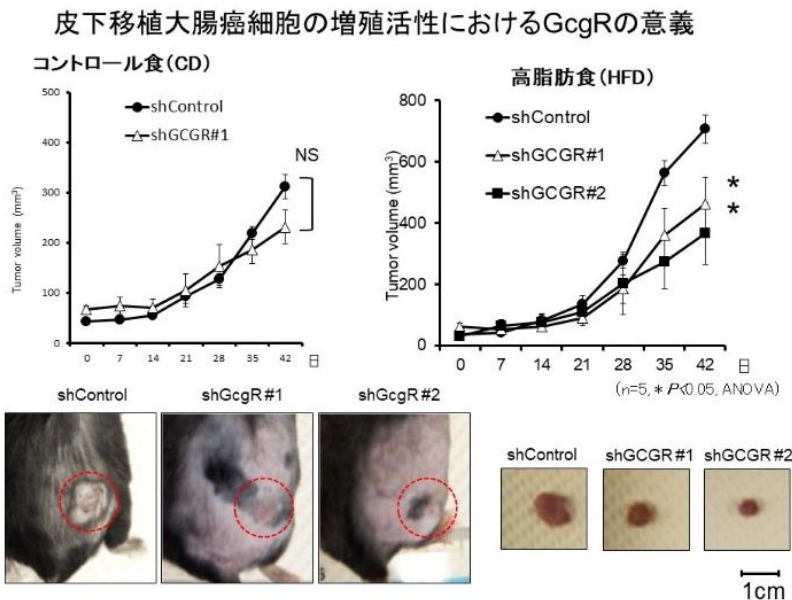


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Yagi, Eiji Kubota, Guo Tingting, Kento Ogawa, Hiroyuki Koyama, Daisuke Aotani, Hiromi Kataoka, Tomohiro Tanaka
2. 発表標題 Canagliflozin but not Empagliflozin activates AMPK and suppresses colon cancer cell growth
3. 学会等名 american diabetes association 79th scientific sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 崇志、久保田英嗣、小山 博之、青谷大介、田中 智洋
2. 発表標題 SGLT2阻害薬が大腸がん細胞増殖へ及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 崇志、Guo Tingting、小川健人、小山 博之、青谷大介、田中智洋
2. 発表標題 カナグリフロジンはAMPKを介し大腸がん細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 智洋 , 八木 崇志 , 竹田 勝志 , 小川 健人 , Guo Tingting , 小山 博之 , 青谷 大介 , 久保田 英嗣 , 片岡 洋望
2. 発表標題 カナグリフロジンによる大腸ガン増殖抑制作用の分子メカニズム
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 崇志、久保田英嗣、小山 博之、青谷大介、田中 智洋、城卓志
2. 発表標題 糖尿病患者の大腸癌リスク上昇における高グルカゴン血症の意義
3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------