

平成22年3月14日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790643

研究課題名(和文) 肝発癌における高インスリン血症および tuberin の細胞生物学的意義

研究課題名(英文) The impact of hyperinsulinemia and tuberin in the development of hepatocellular carcinoma

研究代表者

川口 巧 (KAWAGUCHI TAKUMI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00320177

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌患者は高インスリン血症を特徴とした糖尿病を高頻度に合併している。インスリンは細胞増殖作用を有するため、高インスリン血症が肝発癌に関わると考えられるが、その機序は未だ解明されていない。我々は、本研究において、培養細胞・実験動物・臨床検体を用いた実験より、高インスリン血症が肝細胞内の増殖関連分子を活性化することで、肝発癌に関与する事を解明した。

研究成果の概要(英文)：Hyperinsulinemia is frequently seen in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Since insulin is a growth-promoting hormone, hyperinsulinemia may be involved in the development of HCC. In this study, we revealed that insulin may associate with the development of HCC through activation of intracellular molecules related to cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病をはじめとする代謝異常症と発癌の関連が注目されている。本邦における主要な悪性新生物である肝細胞癌も、高頻度に糖尿病を合併しているが、その機序と意義は未だ不明である。最近、我々は、肝臓に糖質代謝調節転写因子 Carbohydrate responsive-element binding protein

(ChREBP)が高発現していることを発見し、肝臓が、膵臓や筋肉とともに糖質代謝において重要な臓器であることを明らかにした。また、本邦における肝癌の主要な原因ウイルスであるC型肝炎ウイルスのコアタンパク質が、suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)の発現を誘導し、プロテアソームにて肝細胞内インスリンシグナルの中心的な

子である insulin receptor substrate-1/2 (IRS1/2)を分解することで、インスリン抵抗性を介し高インスリン血症を引き起こすことを基礎的および臨床的に明らかにした。インスリンは血糖降下作用の他に、細胞増殖作用を有するため高インスリン血症が肝発癌に関わると考えられるが、その分子機序は未だ解明されていない。一方、結節性硬化症は全身の多発性腫瘍を特徴とする常染色体優性遺伝性の遺伝病であり、原因遺伝子として TSC2 遺伝子が同定されている。TSC2 遺伝子は、198kDa の蛋白質 tuberin をコードしているが、最近の研究結果より tuberin が細胞増殖を制御するインスリン情報伝達経路の1分子であることが解明された。このように、インスリンおよびインスリン情報伝達経路は細胞の増殖を調節する重要な因子であり、肝発癌阻止の新たな治療戦略となりうると考えられる。しかし、これまでに、高インスリン血症およびインスリン情報伝達経路をターゲットとした肝発癌機序および発癌抑制効果については十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は高インスリン血症および tuberin の肝発癌における細胞生物学的意義を検討することである。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* study: インスリン刺激による tuberin の発現量/活性と細胞増殖の関連
肝癌細胞株 (HepG2, Huh-7, Hep3B) の培養上清にインスリン (0, 10, 100 nM) を添加した後のインスリン情報伝達分子 (IRS, Akt, tuberin) のタンパク発現量およびリン酸化をウエスタンブロッティングにて評価する。また、同時にセルカウンター、フローサイトメトリー、免疫染色 (Ki67) にて細胞増殖を評価し、インスリンおよびの情報伝達分子との関連を検討する。

(2) *Human study*: 高インスリン血症および tuberin の発現量/活性と腫瘍サイズの関連
治療目的に切除された肝癌組織を用い、*in situ hybridization* および *real time-PCR*、ウエスタンブロッティングおよび免疫染色にて、tuberin を含むインスリン情報伝達分子を遺伝子・タンパク質レベルで評価する。また、術前のインスリン値および tuberin を含むインスリン情報伝達分子の変化との腫瘍サイズの関連につき臨床的に検討する。上記検討は当大学にて経過観察中で、インフォームドコンセントの得られた肝癌患者に対し行なう。

(3) *In vivo* study: 高インスリン血症改善および tuberin の発現/活性調節による肝発癌

阻止

コリン欠乏食肝癌ラットモデルは 48 週齢より肝細胞癌を発症する。同モデルを用いて、下記の方法により肝発癌抑制効果を検討する。

インスリン分泌を抑制する somatostatin analogue を投与し、48 週齢における肝発癌抑制効果を検討する。

Tuberin の肝発癌への影響を検討するため tuberin/mTOR の特異的阻害剤である rapamycin を用い、48 週齢における肝発癌抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) *In vitro* study: 肝癌細胞株 (HepG2, Huh-7, Hep3B) の培養上清にインスリン (0, 10, 100 nM) を添加した後、細胞数の変化、インスリン情報伝達分子 (insulin receptor substrate 1; IRS1, Akt, tuberin) のリン酸化をウエスタンブロッティングにて評価した。いずれの肝癌細胞株でもインスリン添加により dose dependent に細胞数の有意な増加が認められた (図1)。細胞内インスリンシグナルである IRS1 および Akt はインスリン添加にてリン酸化が亢進していた。同様に tuberin もリン酸化が亢進していた。

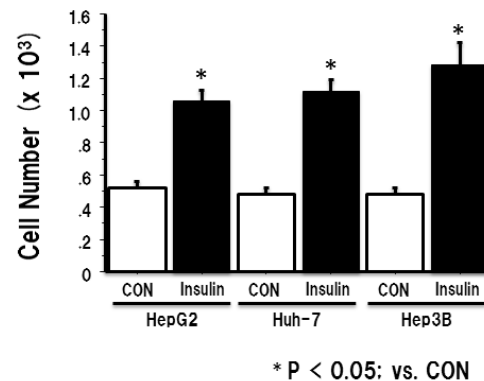


図1. インスリンによる肝癌細胞株増殖

(2) *Human study*: 抗 tuberin 抗体および抗リン酸化 tuberin 抗体を用いた免疫組織化学およびウエスタンブロッティング法により、非癌部組織と比較し、ヒト肝癌組織では tuberin の発現に変化は認めないものの、リン酸化 tuberin の発現亢進を認めた (図2)。また、術前の空腹時インスリン値とインスリン抵抗性の指標である homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) は肝癌組織における tuberin 活性と有意な相関を認めた。

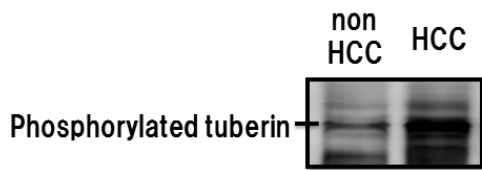
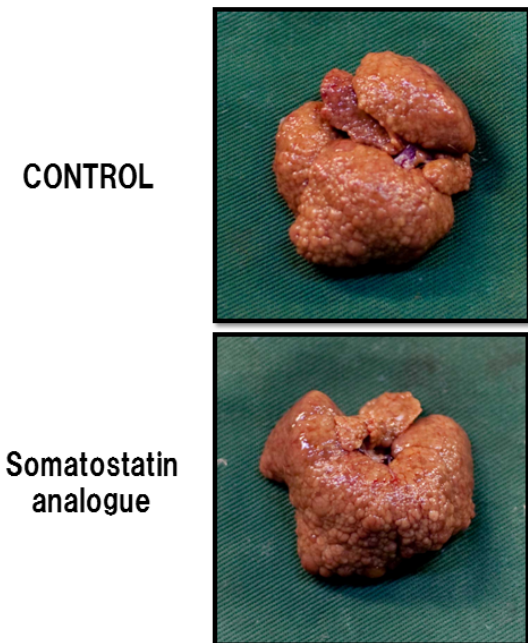


図2. 肝癌組織におけるリン酸化 tuberin の発現

(3) *In vivo* study: コリン欠乏食肝癌ラットに対し somatostatin analogue 投与を行ったが、非投与群と比較して発癌率に有意な差は認めなかった (図3)。しかし、somatostatin analogue 投与群では非投与群と比較して、肝癌細胞でのリン酸化 tuberin およびリン酸化 mTOR の発現抑制と TUNEL 陽性細胞の増加を認めた (図4)。また、rapamycin 投与によっても同様に TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。

図3. Somatostatin analogue 投与による肝の外観



以上の結果より、高インスリン血症とそれともなう tuberin および mTOR の活性化が肝発癌に関与することが示唆された。上記の研究結果より、インスリンおよびインスリン情報伝達経路は細胞の増殖を調節する重要な因子であり、肝発癌阻止の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

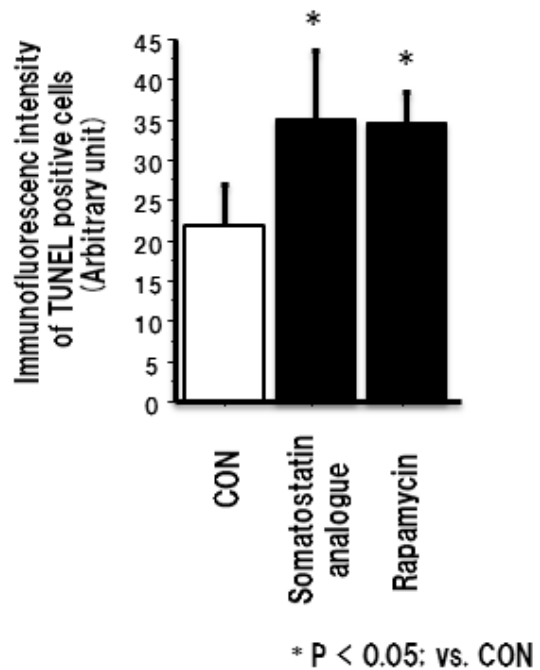


図4. Somatostatin analogue と rapamycin 投与による TUNEL 陽性細胞の変化

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 8 件)

- ① Kawaguchi T, Yamagishi S, Itou M, Okuda K, Sumie S, Kuromatsu R, Sakata M, Abe M, Taniguchi E, Koga H, Harada M, Ueno T, Sata M. Pigment epithelium-derived factor inhibits lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells. *Am J Pathol.* 査読有, 2010, 176, 168-76.
- ② Kawaguchi T, Taniguchi E, Morita Y, Shirachi M, Tateishi I, Nagata E, Sata M. Association of exogenous insulin or sulphonylurea treatment with an increased incidence of hepatoma in patients with hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 査読有, 2010, 30, 479-486.
- ③ Kawaguchi T, Yamagishi S, Sata M. Branched-chain amino acids and pigment epithelium-derived factor: novel therapeutic agents for hepatitis c virus-associated insulin resistance. *Curr Med Chem.* 査読有, 2009, 16, 4843-57.

- ④ Kawaguchi T, Kurumatsu R, Ide T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Abe M, Sumie S, Sata M. Thrombocytopenia, an important interfering factor of antiviral therapy and hepatocellular carcinoma treatment for chronic liver diseases. *Kurume Med J*. 査読有, 2009, 56, 9-15.
- ⑤ Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K, Tsuruta O, Ueno T, Sata M. Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 2008, 23, 244-51.
- ⑥ Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med*. 査読有, 2008, 22, 105-12.
- ⑦ Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Mutou M, Ibi R, Shiraishi S, Okada T, Uchida Y, Otsuka M, Tonan T, Fujimoto K, Oriishi T, Tanaka S, Takakura M, Sata M. Supplement improves nutrition and stresses caused by examination-associated fasting in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*. 査読有, 2008, 38, 1178-85.
- ⑧ Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Ibi R, Okada T, Mutou M, Shiraishi S, Uchida Y, Otsuka M, Umeki Y, Oriishi T, Hayabuchi H, Tanaka S, Takakura M, Sata M. Body cell mass is a useful parameter for assessing malnutrition and severity of disease in non-ascitic cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma or esophageal varices. *Int J Mol Med*. 査読有, 2008, 22, 589-94.

[学会発表] (計4件)

- ① Kawaguchi T et al. Pigment Epithelium-Derived Factor Suppresses Apoptosis through Lysosomal Degradation of Bcl-xL in HepG2 cells. The 60th Annual Meeting of the Association for the Study of Liver Disease, 2009.11.1, Boston, Massachusetts, USA.
- ② Kawaguchi T et al. Use of exogenous insulin or sulfonylureas is a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with diabetes mellitus. 44th Annual Meeting of the

European Association for the Study of the Liver. 2009.4.2, Copenhagen, Denmark.

- ③ Taniguchi E et al. Use of exogenous insulin or sulfonylureas is a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with diabetes mellitus. 55th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. 2008.11.1, San Francisco, CA, USA.
- ④ 川口 巧ら、体組成計を用いた肝疾患の重傷度評価、第11回 日本肝臓学会大会、2007年10月18日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 巧 (KAWAGUCHI TAKUMI)
 久留米大学・医学部・講師
 研究者番号：00320177