

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590439

研究課題名（和文） 糖尿病による発がん促進現象の原因分析：インスリン欠損マウスを用いた実験的研究

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms for the promoting effect of diabetes mellitus on carcinogenesis: An experimental study using insulin-deficient mice

研究代表者

李 康弘 (GANG-HONG LEE)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：10261405

研究成果の概要（和文）：糖尿病はヒト発がんの疫学的危険因子である。本研究では、糖尿病発症の鍵を握るインスリンの発がんへの影響を明らかにすべく、遺伝的インスリン欠損による糖尿病マウスを利用した化学肝発がん実験および肺発がん実験を行った。インスリン欠損は肝発がんを促進する一方、肺発がんは抑制した。よって、インスリン欠損の発がんへの効果は臓器特異的であり、糖尿病による発がん修飾の機序は従来の想定よりも複雑であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Diabetes mellitus (DM) is an epidemiological risk factor for human carcinogenesis. In order to clarify the relationship between insulin, the key hormone relevant to DM, and carcinogenesis, we analyzed chemically induced liver and lung carcinogenesis in genetically insulin-deficient, diabetic mice. Relative to euinsulinemia, the insulin deficiency promoted liver tumor development, albeit decreasing lung tumors. Thus, the effects of insulin deficiency were found tissue-specific. The mechanisms of promotion by DM of carcinogenesis should be more complex than generally assumed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：肝がん、肺がん、糖尿病、インスリン、化学発がん

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病はいわゆる先進国型の疾病であり、日本でもその患者数が増加傾向にある。糖尿病患者は腎症、網膜症、神経症からなる三大合併症を生じるが、その他にも様々な病気のリスク増加を伴う。その中でも重要と考えられるものの一つが発がんの亢進である。

この現象は比較的古くから疫学的研究により明らかにされている。しかし、そのメカニズムの解明を正面に据えた研究は世界的に見ても意外に少ない。糖尿病研究者と発がん研究者との間に交流の少ないことが原因として挙げられる。

2型糖尿病の発生過程には、肥満を原因と

するインスリン抵抗性と代償性高インスリン血症、膵ランゲルハンス島β細胞のインスリン分泌機能低下などが複雑に関与する。よって、糖尿病による発がん促進のメカニズムに関しても、様々な可能性が考えられる。これらの可能性は大きく二つに分類される。a) 糖尿病そのものが発がんを促進する可能性と、b) 結果としての糖尿病ではなく、2型糖尿病発症に至るまでの過程が発がんを促進する可能性である。現在有力と目されている代償性高インスリン血症による発がん促進の仮説はb)を支持している。a)の可能性としては、高グルコース血症による腫瘍細胞へのエネルギー供給増加や酸化ストレス増大によるDNA障害が想定されている。

代償性高インスリン血症が発がん促進の原因であるか否かを検証するためには、1型糖尿病患者の発がんリスクを評価するのが良い。なぜならば、1型糖尿病の発生機序は2型糖尿病に比べ単純であり、基本的にはインスリン分泌不全のみが関与するからである。2型糖尿病において高インスリン血症が発がん促進に働いているとすれば、インスリンが欠乏する1型糖尿病患者に発がんリスクの増加は生じないか、あるいは、むしろリスク低下が観察されることになる。他方、上述のa)の可能性が主たる役割を果たしているならば、1型糖尿病患者でも発がんは促進されるべきである。ところが、1型糖尿病患者はその患者数が少ないこと、また、生存に必須であるインスリン投与を恒久的に行っていることから、目的とする研究の対象として、極めて難しい側面がある。

そこで、本研究では遺伝的にインスリン分泌を欠如する糖尿病モデルマウスであるAkitaを利用する。Akitaマウスは*Insulin 2*遺伝子の突然変異により、インスリン分泌不全を生じ、血中インスリンの欠如とともに糖尿病を発症する。この突然変異はdominant negativeの効果を示すため、糖尿病の遺伝様式は常染色体優性遺伝である。糖尿病の発生機序はヒト1型糖尿病に相当するにもかかわらず、Akitaマウスはインスリン投与を欠いても半年以上生存する。よって、このマウスを用いて発がん実験を行えば、ヒト1型糖尿病患者における発がんリスク評価の代替となり得る。

研究代表者はマウスの化学肝発がんおよび肺発がん実験について20年以上の豊富な経験を有することから、本研究でも肝、肺の化学発がん実験を行う。Akitaマウスは、肝発がん、肺発がんの両方に低感受性であるC57BL/6系統に由来するため、実際の実験では肝発がんを高感受性のC3H/Heマウスないし肺発がんを高感受性のA/JマウスとのF₁を使用する。

2. 研究の目的

(1) Akitaマウスの化学肝発がんおよび肺発がん感受性を正常対照との比較において明らかにする。発がん感受性の指標としては、個体あたり平均腫瘍数と平均腫瘍径を用いる。なお、我々の予備実験では、Akitaマウスが正常マウスとは異なる発がん感受性を示す可能性が示唆されている。

(2) Akitaマウスが正常対照と異なる感受性を示すことが確認されれば、その差が腫瘍細胞の発生率、増殖速度、アポトーシス頻度のいずれによって決定されるものであるかを調べる。

(3) インスリンが腫瘍細胞に及ぼす作用を直接的に調べるため、腫瘍を保有するマウスにインスリンを投与し、腫瘍細胞の増殖、アポトーシスに及ぼす影響を明らかにする。

(4) 上記(2)(3)の結果を考慮し、感受性差に関与する可能性のあるがん関連遺伝子、解糖系酵素、血中細胞増殖因子などの候補を絞り込み、それらの発現、濃度、突然変異を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) F₁マウスの作製

Akitaマウス雄をC3H/HeJマウス雌と交配し、(C3H/HeJ x Akita)F₁の雄を得た。また、同様にAkitaマウス雄をA/Jマウス雌と交配し、(A/J x Akita)F₁の雄を得た。Akitaの糖尿病遺伝様式から、これらF₁マウスのうち約半数はインスリン欠乏を示し、残りは正常のインスリン分泌を示すことになる。なお、Akita、C3H/HeJ、A/Jマウスはすべて日本SLC社から購入した。

(2) 肝腫瘍の誘発

雄の正常およびインスリン欠損(C3H/HeJ x Akita)F₁マウスに生後15日目において、化学肝発癌剤として、生理食塩水に溶解したdiethylnitrosamineを5 μg/g body weightの用量で腹腔内投与した。

Diethylnitrosamine投与したのち8ヶ月を経て、全マウスを過剰エーテル麻酔で安楽死させた。その際、尿糖検査試験紙にて尿糖の有無をチェックし、糖尿病個体と正常個体を識別し、肝腫瘍の解析を行った。

(3) 肝腫瘍の分析

各々のマウスから肝組織を摘出し、実体顕微鏡下で腫瘍数と腫瘍サイズを記録した。肝組織の一部は凍結保存し、残りはホルマリン固定した。また、一部のマウスについては、尾静脈より血液を採取してポータブル血糖測定器によって血糖値を調べるとともに、股動脈から大量の血液を得て血清検体を作製し凍結保存した。ホルマリン固定組織については、HE染色切片で顕微鏡的にも肝腫瘍を同定し、Enzmanらの提唱する三次元再構築法を用いて腫瘍数、腫瘍サイズの定量を行った。

また、腫瘍細胞の Ki-67 ラベリングインデックスと ssDNA 陽性アポトーシスインデックスを免疫染色標本にて定量した。解糖系の律速酵素である Pfkfb3

(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3)の解析は、固定組織切片を使用した免疫組織化学法および凍結生組織を使用したウェスタン法によって行なった。

(4)肺腫瘍の誘発と分析

雄の正常およびインスリン欠損 (A/J x Akita) F_1 に 6 週齢において、化学肺発癌剤として、水に溶解した urethane を 1 mg/g body weight の用量で腹腔内投与した。Urethane 投与したのち 4 ヶ月を経て、全マウスを過剰エーテル麻酔で安楽死させ、肺を摘出した。その際、肝発癌実験の時と同様に尿糖検査試験紙にて尿糖の有無をチェックし、糖尿病個体と正常個体を識別し、一部のマウスについては、尾静脈より血液を採取してポータブル血糖測定器によって血糖値を調べるとともに、股動脈から大量の血液を得て血清検体を作製し凍結保存した。摘出肺の表面に存在する肺腫瘍を実体顕微鏡下で同定し、その数と直径を定量した。

(5)血清タンパクの定量

凍結血清を使用して、insulin、Igf1、Igf1bp3、adiponectin、leptin の定量を ELISA 法で行なった。ELISA には市販のキットを用いた。

(6)インスリン投与実験

Diethylnitrosamine 投与後 8 ヶ月の肝腫瘍を有するインスリン欠損マウスにヒトインスリンを皮下注射した。注射は 1 日 2 回として、各回の用量は 4 U/mouse とした。これを 5 日間続け、上記の肝発癌実験と同様にマウスを安楽死させたのち、肝腫瘍の分析を行なった。

4. 研究成果

(1)肝発癌

①肝腫瘍の発生

正常マウス群、インスリン欠損マウス群の平均血糖値はそれぞれ 191 ± 16 mg/dL、 730 ± 20 mg/dL (平均 \pm 標準誤差)、平均体重はそれぞれ 38.8 ± 0.8 g、 32.3 ± 1.1 g であり、インスリン欠損マウスは糖尿病と痩せを呈していた。

発生した肝腫瘍の全てが肝細胞腫瘍であり、その 95%以上が肝細胞腺腫と診断され、残りは肝細胞癌と診断された。以下、これらの腫瘍を一括して肝腫瘍と呼ぶ。正常マウス群およびインスリン欠損マウス群における発生肝腫瘍の数および大きさに関するデータを表 1 に要約する。個体あたりに発生した肝腫瘍の総数の平均には両群で有意差を認めなかった。しかし、正常群に比べインスリン欠損群では発生した腫瘍の平均体積が 2.2

倍大きかった。また、個体あたりの肝腫瘍の総体積についても、その平均はインスリン欠損群で 2.2 倍大きかった。平均肝重量は腫瘍体積の差を反映してインスリン欠損群で有意に重かった。

②肝腫瘍における Ki-67 ラベリングインデックスと ssDNA 陽性アポトーシスインデックス 正常群およびインスリン欠損群から 5 匹ずつのマウスを無作為に抽出し、各々のマウスに発生した肝腫瘍のうち大きい方から 3 個ずつを選択して腫瘍細胞の Ki-67 ラベリングインデックスを定量した。すると、解析された腫瘍の組織切片上における平均面積がインスリン欠損群において有意に大きいにもかかわらず、Ki-67 ラベリングインデックスについては両群で有意差を見出せなかった。

一方、ssDNA 陽性アポトーシスインデックスについては、切片上の腫瘍面積あたりの数を定量した。すると、インスリン欠損群においては平均アポトーシスインデックスが正常群の 5 分の 1 であった。

③肝腫瘍における Pfkfb3 の発現

インスリン欠損マウスは高血糖状態にあるため、肝腫瘍細胞はそのエネルギー源として血中に豊富なグルコースを利用し、解糖系の亢進によりアポトーシスを免れている可能性がある。Pfkfb3 は解糖系の律速酵素の一つであり、ヒトの様々な癌細胞における発現亢進が報告されている。そこで、ウェスタン法により、インスリン欠損マウス群および正常マウス群の肝腫瘍とその周囲の非腫瘍性肝組織における Pfkfb3 タンパクの発現を調べ、デンストメーターで相対的に定量化した。その結果、非腫瘍肝については群間に有意差を認めなかったが、肝腫瘍についてはインスリン欠損群が正常群に比べ約 1.7 倍タンパク量が多かった。

さらに、ホルマリン固定肝組織を使用した免疫組織化学により Pfkfb3 タンパクを染色すると、インスリン欠損群の肝腫瘍は正常部に比べ染色性が高く、かつ、腫瘍内で均一な染色を示す傾向があった。一方、正常群の肝腫瘍では腫瘍の中心部で染色性が欠損する傾向を示した。

④血清中の癌関連タンパクの定量

Igf1 (insulin-like growth factor 1)、Igf1bp3 (insulin-like growth factor binding protein 3)、adiponectin、leptin は肥満ないし糖尿病による発癌修飾への関与が報告されている血中分泌タンパクである。未だ確定的な定説には至っていないが、Igf1 と leptin についてはその増加が、Igf1bp3 と adiponectin についてはその減少がそれぞれ発癌危険因子と推定されている。なお、adiponectin と leptin は主に細胞から分泌されるいわゆる adipokines であり、通常は肥満者では adiponectin が減少し、leptin

は増加する。

肝腫瘍を有する正常マウスおよびインスリン欠損マウスでこれらのタンパクと insulin の血清中濃度を ELISA 法により測定した。Insulin は正常マウス群では検出されたが、インスリン欠損マウス群では検出感度未満の濃度であった。Igf1、Igfbp3 の濃度は群間に有意差を認めなかった。他方、adiponectin はむしろ痩せ示すインスリン欠損群で正常群の約 3 分の 1 に減少しており、leptin は正常群では検出されたがインスリン欠損群では大部分のマウスで検出感度未満の濃度であった。

⑤インスリン投与実験

材料と方法の 6 に説明した如く、肝腫瘍を有するインスリン欠損マウスに 5 日間のインスリン皮下投与実験を行なった。この投与方法によると血糖値が 50~300 mg/dL にコントロールされることが予備実験で分かっている。対照実験としては、同様のインスリン欠損マウスに生理食塩水の皮下投与を行なった。

生理食塩水投与群とインスリン投与群で肝腫瘍の平均 Ki-67 ラベリングインデックスを分析すると、両群に有意差を見出せなかった。一方、平均 ssDNA 陽性アポトーシスインデックスについては、インスリン投与群は生理食塩水投与群の約 5 倍であった。

(2)肺発癌

正常対照の (A/J x Akita) F_1 マウス群における平均肺腫瘍数が 12.3 ± 0.9 個 (平均 \pm 標準誤差) であったのに対し、インスリン欠損の (A/J x Akita) F_1 マウス群では 6.6 ± 0.6 個であり、遺伝的インスリン欠損が肺腫瘍の発生を約 50%減少させることが明らかとなった (マン-ホイットニー-U テストによる P 値 = 1.6×10^{-6})。また、発生した肺腫瘍の平均直径は対照群で 0.84 ± 0.02 mm であったのに対し、実験群では 0.78 ± 0.03 mm であり、僅かながら後者の方が小さかった (P 値 = 0.035)。一方、マウスの平均体重は正常群が 37.9 ± 0.8 g、インスリン欠損群が 29.9 ± 0.5 g (P 値 = 3.1×10^{-10}) であり、インスリン欠損マウスでは痩せの傾向が認められた。Igf1 の血中濃度には両群で有意差を認めなかった (正常群 373 ± 19 ng/ml、インスリン欠損群 384 ± 10 ng/ml)。脂肪組織由来で発癌修飾因子の可能性が唱えられている cytokines を定量したところ、通常痩せている個体で高値を示す血中 adiponectin はむしろインスリン欠損マウスで低値であった (正常群 21.4 ± 1.0 μ g/ml、インスリン欠損群 12.5 ± 0.9 μ g/ml、 P 値 $< 1 \times 10^{-4}$)。また、血中 leptin はインスリン欠損マウスで極めて低値を示した (正常群 14.1 ± 1.2 ng/ml、インスリン欠損群 1.7 ± 0.2 ng/ml、 P 値 $< 1 \times 10^{-4}$)。一方、

発生した肺腫瘍について、細胞増殖マーカーである Ki-67 核タンパクの染色率を調べると、正常群、対照群で有意差を見出せなかった。しかしながら、肺腫瘍を有するインスリン欠損マウスに肝発癌実験と同様にインスリンを投与したところ、腫瘍細胞における Ki-67 染色率の増加を認めた (生理食塩水投与群 3.9 ± 0.2 %、インスリン投与群 12.0 ± 0.6 %、 P 値 $< 1 \times 10^{-5}$)。

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 34 件)

- ①Kuroda N, Mikami S, Pan CC, Cohen RJ, Hes O, Michal M, Nagashima Y, Tanaka Y, Inoue K, Shuin T, Lee G-H. Review of renal carcinoma associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions with focus on pathobiological aspect. *Histol Histopathol.* 27:133-140 (2012). 査読有
- ②Osanai M, Lee G-H. Enhanced expression of retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 in sunlight-damaged human skin. *Med Mol Morphol.* 44:200-206 (2011). 査読有
- ③Osanai M, Lee G-H. Nicotine-mediated suppression of the retinoic acid metabolizing enzyme CYP26A1 limits the oncogenic potential of breast cancer. *Cancer Sci.* 102:1158-1163 (2011). 査読有
- ④Hayashi Y, Osanai M, Lee G-H. Fascin-1 expression correlates with repression of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells and augments their invasiveness in combination with matrix metalloproteinases. *Cancer Sci.* 102:1228-1235 (2011). 査読有
- ⑤Osanai M, Sawada N, Lee G-H. Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. *Oncogene.* 29:1135-1144 (2010). 査読有
- ⑥Yamasaki K, Hayashi Y, Okamoto S, Osanai M, Lee G-H. Insulin-independent promotion of chemically induced hepatocellular tumor development in genetically diabetic mice. *Cancer Sci.* 101:65-72 (2010). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ①山崎光太郎、糖尿病モデルマウスにおけるインスリン非依存的肝発がん促進、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 康弘 (GANG-HONG LEE)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：10261405

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし