



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1638号
学位記番号	第1173号
氏名	八木 崇志
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	Glucagon promotes colon cancer cell growth via regulating AMPK and MAPK pathways (グルカゴンは AMPK、MAPK を介して大腸がん細胞の増殖を促進する) Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 12), pp: 10650-10664
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 高橋 智, 城 卓志

論 文 内 容 の 要 旨

目的：近年、糖尿病患者の死亡原因は癌が最も多く、癌罹患リスクの増大が大きな問題となりつつある。そのため、糖尿病と癌に関する研究の重要性が提言されている。2型糖尿病患者では全癌罹患リスクは1.2倍、大腸癌リスクは1.4倍にまで上昇するが、その機序には不明な点が多い。最近になり、糖尿病患者における高グルカゴン血症が注目されつつある。グルカゴンは、Gタンパク共役型受容体であるグルカゴン受容体（GCGR）を介して、Gs-cAMP系を活性化し肝糖産生を促進するだけでなく、細胞増殖に関連するシグナルへ影響を及ぼすことが報告されている。我々は2型糖尿病患者の大腸がんリスク上昇の原因の一つとしてグルカゴンが関わっているのではないかと仮定し、2型糖尿病患者における大腸癌の進展に及ぼす分子機序を解析した。

方法：複数のヒト大腸癌組織切片、計9種類のマウスおよびヒト由来大腸癌細胞株におけるGCGRのmRNA・タンパク質の発現を検討した。次にグルカゴンの添加が大腸癌細胞の増殖に及ぼす影響を評価し、これを担う細胞内シグナル伝達経路を解析した。さらに、食餌誘導性糖尿病モデルマウスにGCGRをノックダウンした大腸癌細胞を移植し、グルカゴン-GCGR経路が*in vivo*での大腸癌進展に及ぼす影響を解析した。

結果：①免疫染色とWestern blot法により大腸癌組織・細胞におけるGCGRの発現が確認された。②グルカゴンの添加は大腸癌細胞の増殖を有意に促進した。siRNAを用いてGCGRを約30%ノックダウンした細胞では、グルカゴン刺激による細胞増殖促進効果は消失した。グルカゴン産生活性が知られる α 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 α 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。③グルカゴン刺激は大腸癌細胞のMAPK/Erkのリン酸化を誘導、AMPKは抑制することが確認され、GCGRノックダウン細胞においてはこれが消失していた。④食餌誘導性糖尿病モデルマウスを用いて、GCGR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GCGRノックダウンマウス大腸癌細胞ではKi67陽性細胞数の有意な減少が観察された。

結語：本研究により、ヒトおよびマウス大腸癌細胞がGCGR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、グルカゴン-GCGR-cAMPが、その下流のシグナルであるMAPK、AMPKのリン酸化を調節し、大腸癌増殖促進作用を有することが示された。2型糖尿病患者での大腸癌におけるグルカゴンの重要性が実証され、今後グルカゴンが大腸癌の治療標的となる可能性が示唆された。

【背景・目的】糖尿病患者は血管障害で死亡することが多い。最近の報告では糖尿病患者の死因は悪性新生物が多く、糖尿病と癌が重要な課題となっている。以前から糖尿病の病態の中心はインスリンであるとされてきたが、最近ではグルカゴンであるという説にかわりつつある。グルカゴン受容体 (GcgR) は肝臓だけでなく全身のあらゆる臓器に存在しており、ある種の細胞では細胞増殖促進作用も有している。今回我々は2型糖尿病患者における大腸癌罹患リスク上昇の原因の一つとして高グルカゴン血症が関わっているのではないかと仮定し研究を行なった。

【方法】ヒト大腸癌組織切片、7種類のヒト、2種類のマウス大腸癌細胞株におけるGcgRのmRNA・タンパク質の発現を検討した。次にグルカゴン刺激が大腸癌細胞の増殖に及ぼす影響を評価し、これを担う細胞内シグナル伝達経路を解析した。さらに、高グルカゴン血症を示す食餌誘導性糖尿病モデルマウスにGcgRをノックダウンした大腸癌細胞を移植し、*in vivo*においてグルカゴンが大腸癌細胞増殖に及ぼす影響を解析した。

【結果】ヒト大腸癌組織、ヒト・マウス大腸癌細胞株における GcgR の発現が確認された。グルカゴンは大腸癌細胞の増殖を有意に促進し、GcgR を約 30%ノックダウンした細胞では、グルカゴン刺激による細胞増殖促進効果は消失した。グルカゴンは細胞内 cAMP を上昇させ、AMPK のリン酸化は抑制、ERK1/2 のリン酸化は促進させることが確認された。高グルカゴン血症を示す肥満糖尿病モデルマウスへの GcgR ノックダウンマウス大腸癌細胞の皮下移植では、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 GcgR ノックダウンマウス大腸癌細胞はコントロール細胞と比べ Ki67 陽性細胞数の有意な減少が観察された。また、コントロール大腸癌細胞と比べ GcgR ノックダウンマウス大腸癌細胞は S6K、ERK のリン酸化の抑制、AMPK のリン酸化の促進が確認された。

【結語・考察】*in vivo*、*in vitro* の検討により、グルカゴンが大腸癌細胞増殖促進作用を有する事が示された。これらの知見はグルカゴンが2型糖尿病患者における大腸癌の治療に貢献することが期待される。

審査委員会では、第一副査（高橋智教授）より「グルカゴンによる細胞増殖の影響が早期からではない理由」、「使用したグルカゴンの濃度の妥当性」、「マウスでのグルカゴン以外のホルモン、インスリンの測定は行なったか、その影響について」など論文の方法と結果に関する10項目の質問、次に主査（瀧口修司教授）より「2型糖尿病患者では大腸癌以外の癌リスクも上昇するが、今回大腸癌に注目した理由」、「グルカゴンの細胞増殖に関する研究はすでに存在しているが、今回の研究の新規性」、「今回の研究結果を2型糖尿病患者の大腸癌治療にどう結びつけるか」など研究結果と臨床面との関係、今回の研究を踏まえた今後の研究に関して9項目の質問があった。また指導教授である第二副査（城卓志教授）より「これまで血中グルカゴンが正確に測定できなかった原因」や「2型糖尿病で高グルカゴン血症が出現するメカニズム」など研究結果に関する質問とともに、主科目を中心とした質問があり、良好な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野（消化器代謝内科学）に関する知識を習得しているものと判断された。本研究結果より、グルカゴンが大腸癌細胞増殖促進作用を有することが示され、2型糖尿病患者における大腸癌治療に貢献することが期待され、臨床的にも意義のある研究と考えられた。よって本論文の筆頭著者には博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口修司

副査 高橋智、城卓志