

論文の内容の要旨

論文題目 肝臓におけるインスリン受容体基質の役割の解明

氏名 桜井 賛孝

近年の疫学的研究により糖尿病と癌の関連が多く報告されている中で、特に肝臓において、その関連性が強い。糖尿病で癌になりやすい原因として高血糖、高インスリン血症や、肥満や局所の慢性炎症、酸化ストレス、ER ストレスの増大などが挙げられ、発癌する臓器によってその影響は異なる。糖尿病と肝臓の関連のメカニズムに関しては、脂肪肝による慢性炎症の影響はよく検討されているが、インスリンシグナルがどの程度寄与しているかはいまだ不明な点が多い。インスリンや IGF1 は受容体に結合した際にチロシンキナーゼにより自己リン酸化され、リン酸化したチロシン残基にインスリン受容体基質(IRS: insulin receptor substrate)が結合し、IRS がリン酸化されることで、下流の PI3K、Akt が活性化される。IRS には IRS1～IRS4 までの 4 つのアイソフォームが存在するが、肝臓特異的 IRS1 欠損マウス(LIRS1KO)、肝臓特異的 IRS2 欠損マウス(LIRS2KO)を用いた当研究室の研究結果により、肝臓では IRS1 と IRS2 がシグナル伝達に重要であることが明らかになった。この研究の中で、LIRS1KO は通常食下では耐糖能異常をほとんど認めず、脂肪肝も伴わないことが明らかになっている。そこで我々は LIRS1KO に薬剤で肝臓癌を誘発し、通常食下で観察すること

により高血糖や脂肪肝などの肝癌における交絡因子を除外した状態で **IRS1** の肝癌での役割、ひいてはインスリンシグナルの役割を解明することを目的とした。

本研究では、まず 15 日齢の野生型マウスにジエチルニトロサミン(DEN)を腹腔内注射(25mg/kg)により単回投与し 10 ヶ月後に誘発された肝癌におけるインスリンシグナル関連を評価した。対照群には野生型マウスに同様の手法で生理食塩水を投与した。DEN で誘発した肝癌では対照群の正常肝に比べてインスリン受容体(IR)の mRNA、蛋白発現増加を認めた。IR は、exon 11(36bp)を有するアイソフォーム B 型と exon 11(36bp)が欠損したアイソフォーム A 型が存在する。正常肝と肝癌の mRNA 由来の cDNA を IR の exon 11 をまたぐように設計したプライマーで PCR を施行しアイソフォームを評価したところ、通常の B 型だけでなく、インスリン、IGF1、IGF2 に対して感受性が高いアイソフォーム A 型が肝癌では出現していた。インスリンシグナル等の下流に位置する Akt に関してウェスタンブロット法で評価したところ、正常肝に比べて肝癌において、また、肝癌を誘発した同一肝内における非腫瘍部に比べて腫瘍部において Akt の蛋白発現増加とリン酸化の亢進を認めた。また、肝癌を誘発した同一肝内において腫瘍部では非腫瘍部に比べて **IRS1** の mRNA の発現が有意に増加しており、肝癌におけるインスリンシグナル亢進に **IRS1** が関与していると推察された。

続いて、**IRS1** の肝癌形成に対する影響を検討するため、15 日齢の対照群(**IRS1 flox**)と KO 群(**LIRS1KO**)に DEN を腹腔内注射(25mg/kg)により単回投与し 10 ヶ月後に誘発された肝癌を肉眼的に比較したところ、**LIRS1KO** は対照群よりも腫瘍による肝重量の増加が有意に少なく、また、腫瘍

数、最大腫瘍径がいずれも有意に小さかった。血中の ALT 値も有意に低く、全体として、LIRS1KO は対照群よりも腫瘍形成が抑制されていると考えられた。病理学的評価でも同様に腫瘍の増大が抑制されている所見を認めた。LIRS1KO の腫瘍部では IRS1 のノックアウトは維持されており、IRS2 蛋白発現の代償性の増加も認めなかった。LIRS1KO では対照群に比べて腫瘍部での Ki-67 染色の陽性率が有意に低く、また PCNA の蛋白発現量も低下しており、IRS1 が欠損した肝癌は増殖能が低下していた。また、LIRS1KO の腫瘍部では対照群の腫瘍部に比べて Akt、S6 キナーゼ、GSK3 β の蛋白発現とリン酸化レベルが低下しており、インスリンシグナルが低下していると考えられた。その他、腫瘍部での炎症(IL-6、TNF α など)や局所浸潤(各種 MMP や VEGF など)に関連する遺伝子発現の有意な低下を認めた。

次に、癌の糖代謝に関して評価した。一般的に腫瘍細胞における解糖系を主体とする糖代謝への変化、それに伴うペントースリン酸経路の亢進を、ワールブルグ効果と言う。この変化に関与しているヘキソキナーゼ 2、PKM2(pyruvate kinase M2 isoform)の mRNA 発現は、LIRS1KO の腫瘍部で対照群の腫瘍部より有意に抑制されており、逆にペントースリン酸経路の遺伝子(G6pdx; glucose-6-phosphate dehydrogenase)や電子伝達系の遺伝子(Atp5b; ATP synthase subunit beta, mitochondrial)の mRNA 発現は有意に高値であったため、IRS1 が欠損した肝癌はワールブルグ効果が減弱していることが示唆された。

次に、LIRS1KO の肝癌の特徴を網羅的に解析するため、LIRS1KO と対照群の腫瘍部の mRNA を用いてマイクロアレイ解析、GO 解析を行ったところ、脂質代謝関連遺伝子群で両群の差を多く認め

たため、DEN で誘発した肝癌の脂質代謝に注目した。そこで、まずは先の実験系で用いた、野生型マウスに DEN で誘発した肝癌と対照群(生食投与群)の正常肝で脂質代謝関連遺伝子の発現を mRNA レベルで比較したところ、肝癌では、SREBP1c、FAS の増加傾向、ACC の有意な増加を認め、脂肪合成が亢進していると考えられたが、一方で脂肪分解(ATGL、HSL、DAGL、Mgll、Ces3a)・ β 酸化(CPT1a、MCAD、ACOX1)の遺伝子発現の低下を認めた。そして、LIRS1KO の腫瘍部では対照群(IRS1 flox)の腫瘍部に比べて、脂肪合成の遺伝子発現に差は認めなかったが、DAGL、Mgll、Ces3a、CPT1a、MCAD、ACOX1 が有意に高く、癌化に伴う脂肪分解・ β 酸化の遺伝子発現の低下が抑制されていた。LIRS1KO と対照群(IRS1 flox)の非腫瘍部と腫瘍部における中性脂肪含量を測定したところ、いずれの群においても腫瘍部では中性脂肪含量が増加していたが、LIRS1KO では、対照群(IRS1 flox)と比較して非腫瘍部に対する腫瘍部の中性脂肪含量の増加率が低い傾向であった。また、細胞膜脂質合成に関与する遺伝子発現(コリンキナーゼ)は LIRS1KO の腫瘍部で低い傾向であり、細胞膜脂質の合成低下が示唆された。

以上の結果より、肝癌で亢進しているインスリンシグナルが IRS1 の欠損により低下することで、肝癌の増大、進展、それに伴う炎症を抑制することができ、これらにはワールブルグ効果の減弱や、癌化に伴う脂肪分解・ β 酸化の低下の抑制が関与していると示唆された。一連の変化に IRS1 がどのように関与しているか、また対照群(IRS1 flox)と KO 群(LIRS1KO)の腫瘍部の比較から得られた一連の結果が癌化した時にのみ認められる差なのかどうかは今後検証する予定である。