

肝癌発生におけるメタボリック症候群関連因子、インスリン抵抗性、 インスリン様増殖因子の関与、および治療標的としての検討

札幌しらかば台病院

消化器科部長

札幌医科大学 消化器・免疫・リウマチ内科学講座

非常勤講師 兼務

足立 靖

(共同研究者)

札幌医科大学・消化器内科 大学院生 松永 康孝

札幌医科大学・消化器内科 講師 佐々木 茂

東京大学・医科学研究所 特任講師 野島 正寛

東京大学・医科学研究所 特任教授 今井 浩三

はじめに

肝癌は、我国において2011年の罹患率は6位であり（地域がん登録によるがん罹患データによる）、2013年の死亡率で5位と報告され（人口動態統計によるがん死亡データによる）、罹患率・死亡率ともに多い腫瘍である。我が国における原発性肝癌のうち、肝細胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）が9割と大部分を占める。また、HCCの原因としては、肝炎ウイルスによる慢性肝炎・肝硬変が約8割を占めるとされる。5-7割がC型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染に起因すると試算され、また、1-2割がB型肝炎ウイルス（HBV）に起因すると考えられている。

非B型非C型肝炎細胞癌（NBNC-HCC）の半数がアルコール性肝障害に関連する発癌で、23%は非アルコール性脂肪肝（NASH, NAFLD）および糖・脂質代謝異常を有している。NBNC-HCCは近年増加傾向にあり、臨床の場において突然、進行癌として発見されることもある。

最近、日本糖尿病学会と日本癌学会は共同で、糖尿病（DM）はHCC等消化器癌の発生リスクとなり、DMと消化器癌に関する研究を推進するが重要だと発表した^[1]。その発癌機序として、インスリン抵抗性・高インスリン血症に伴い、インスリン様増殖因子（insulin-like growth factor, IGF）シグナルが活性化されることが肝要であると報告された。メタボリック症候群はその基盤にインスリン抵抗性があり、DMと同様のリスクがあるため、NASH発癌に関与していると考えられる。一方、慢性ウイルス性肝疾患に罹患していても、かならずしも発癌しないことから、メタボリック症候群関連因子、インスリン抵抗性、IGF等の関与が推察される（図1）。

IGFsおよびインスリン様増殖因子受容体 (IGF-1 receptor, IGF-1R) は各種癌で過剰発現している^[2]。IGF-1Rからのシグナル変化は、細胞増殖を刺激し、アポトーシスを回避することになるため、癌細胞の生存に有利に働く。リガンドであるIGF1, IGF2は血清中ではIGF結合蛋白 (IGF binding protein, IGFBP、中でもIGFBP3が最多) と結合し、不活化されている。その際、IGFとIGFBPは1:1で結合している。FreeのIGFの半減期は短いですが、IGFBP結合時には分解されないため、寿命が延びる。マトリライシン (matrix metalloproteinase-7, MMP7) 等の酵素によりIGFBPが切断され、IGFsがfreeの活性体となることで、IGF-1Rに結合可能となる。IGF-1Rはリン酸化を受け、下流にシグナルが伝達される (図2)。代表的な下流経路にphosphatidyl inositide 3-kinase (PI3-K) / Akt-1系とMitogen-activated protein kinase (MAPK) 系がある。血清中のIGF1高値と、IGFBP3の低値が大腸癌をはじめとする種々の癌の危険因子となることが明らかになっている^[3]が、肝癌における報告は無い。

IGF-1Rシステムを標的とした治療は、モノクローナル抗体 (mAb)、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 等をはじめとして様々な試みがされており、その一部の薬剤で臨床試験が行なわれている。我々はこれまで、IGF-1Rシグナルを制御するためにIGF-1Rに対するdominant negative (IGF-1R/dn) を用いて、消化器癌に対する基礎的な検討を行い報告してきた^[4-6]。

今回、多施設共同による症例対照研究から、肝がん発生におけるリスク要因を明らかにすることを目的とした。特に肝炎ウイルス以外の発癌関連因子を見出すことが大切であり、複

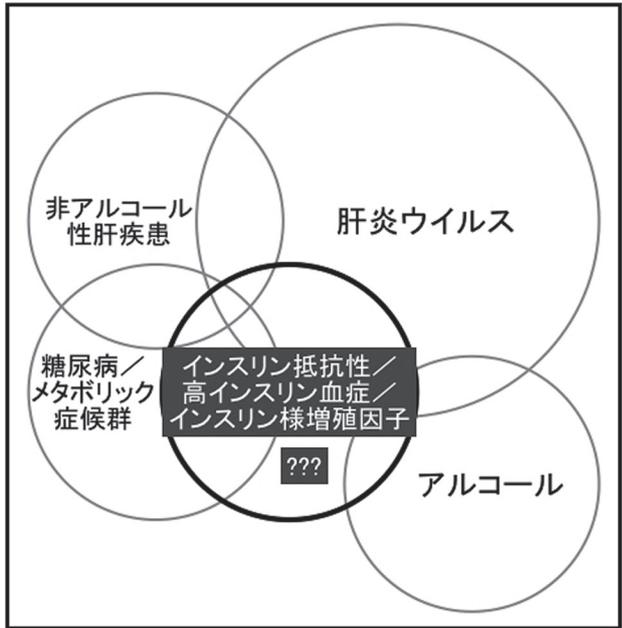


図1. 肝発癌の要因

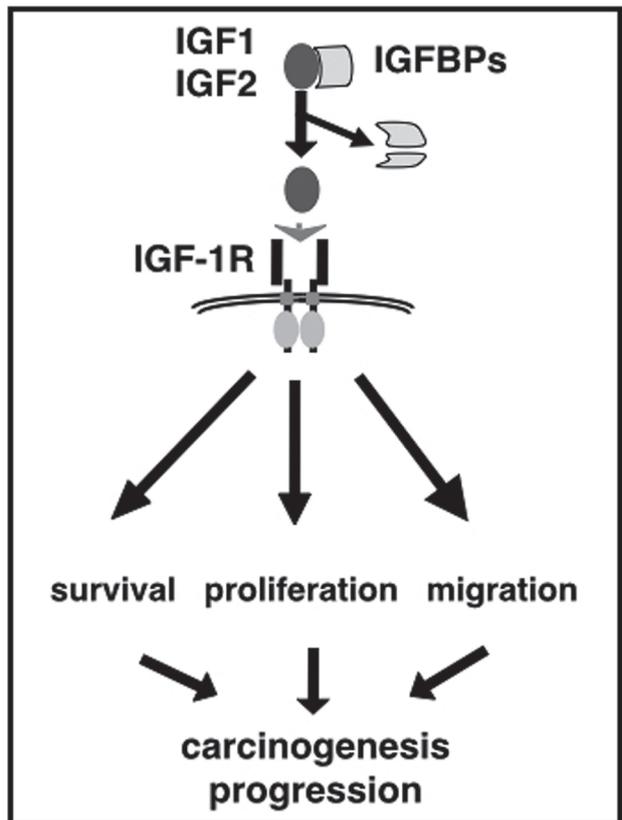


図2. インスリン様増殖因子シグナル

数の候補分子のなかから、今回は、IGF1, IGFBP3について検討した。さらに、見出されたリスク因子IGF1, IGFBP3に関連する分子として、IGF-1Rを標的とした治療を、肝癌細胞株を用いて基礎的に検討した。

結 果

多施設共同による症例対照研究で、ICD10においてC22で定義される肝および肝内胆管癌を罹患した人もしくは死因がC22の人を症例とし、その性、年齢、地域を一致させた人を対照とした。解析には条件付きロジスティック回帰法を用いた。

症例91名と対照263名で解析を行なった。両群間で、年齢・性・身長・体重・body mass index (BMI)、喫煙歴、飲酒習慣に有意差は無かった。症例群のなかで肝炎ウイルスに感染がある割合は65%で、対照群においては17%であり、症例群で肝炎ウイルス感染率が有意に高かった。血清IGF1値は対照群において、やや高い傾向があったが、有意差は無かった。一方、血清IGFBP3値は対照群において明らかに高かった ($p < 0.0001$)。

血清IGF1高値群で肝癌罹患リスクが低下する傾向があったが、有意差は無かった。なお、肝炎ウイルス罹患、喫煙、飲酒、BMIにより調整すると、その傾向は弱まった。血清IGFBP3高値群で肝癌リスクは低かった ($p = 0.001$)。この傾向は肝炎ウイルス罹患、喫煙、飲酒、BMIにより調整したあとも同様であった ($p = 0.003$)。

IGF1/IGFBP3モル比は活性型のfree IGF1量を反映すると言われているので、IGF1/IGFBP3モル比と肝癌罹患について解析した。IGF1/IGFBP3モル比高値群では肝癌罹患リスクは明らかに高値であった ($p = 0.0086$)。しかし、この傾向は肝炎ウイルス罹患、喫煙、飲酒、BMIにより調整すると弱くなり、有意差を認めなくなった ($p = 0.224$)。

よって、血清IGFBP3低値とIGF1/IGFBP3モル比高値は、特にIGFBP3低値は、肝炎ウイルス感染とは独立した、肝癌発症リスクを反映している可能性があった。

続いて、肝癌細胞株を用いたin vitroの解析を行なった。RT-PCRによりmRNA発現の解析を行い、肝癌細胞株でIGF1は63%、IGF2は44%、IGF-1Rは89%発現していることを見出した。

肝癌細胞株であるPLC/PRF/5を用いて、colony formation assayによるin vitro腫瘍形成能を検討したところ、IGF-1R/dnの発現により肝癌細胞のコロニー数は著明に減少した。また、trypan blue assayで解析したところ、IGF-1R/dnは培養肝癌細胞の増殖を明らかに抑制した。一方、肝癌細胞株のPLC/PRF/5, HuH7などを用いて、Caspase-3 assay等を行い、アポトーシス誘導能を評価した。熱刺激、エタノール等のストレスにより誘導されるアポトーシスはIGF-1R/dnによって有意に増強された。さらに、IGF-1R/dnは、5-FU, cisplatin等の抗癌剤によって誘導されるアポトーシスを明らかに増強し、各単独療法の効果の総和以上にアポトーシスを誘導した。

IGFs刺激によりIGF-1Rの下流にあるAkt-1はリン酸化を受けるが、IGF-1R/dnの導入はAktのリン酸化を阻害した。しかしながら、同様にIGF-1Rの下流にあるMAPKのリン酸化は

さほど影響を受けなかった。したがって、IGF-1R/dnはPI3-K/Akt系のシグナルを主に阻害すると考えられた。

考 察

成人の生理的な状態において、IGFとIGFBP3は主に肝臓で産生される。血清IGF1低値で肝癌罹患リスクが上がるのは、背景にある慢性肝障害を反映している可能性があるが^[7]、発癌メカニズムを考慮すると矛盾が残った。しかしながら、肝細胞癌内のfree IGF1量は肝癌患者の血清値に比較して保たれていると報告されており^[8]、血清IGF1低値でもIGFによる肝発癌は起こりえることがわかる。血清IGFBP3低値が肝癌罹患リスクを上げることは、背景にある肝障害を反映している可能性がある。メカニズム的にもIGF-1Rシグナル増強を介し、発癌リスクを上昇させる可能性があるため、矛盾しないと思われる。

一方、慢性肝疾患の他にも、メタボリック症候群・生活習慣病の多くで、血清IGFBP3値、血清IGF1値が低下していると報告されており^[9]、NBNC-HCCを含めた肝癌罹患リスク評価に用いることは妥当と考えられる。

これまでIGF-1R阻害薬はmAbを主に開発されてきたが、その幾つかはPhase3研究の途中で中止されている^[10]。最近は、複数のIGF-1Rに対するTKIが臨床研究に入っており、mAb以外の治療法が求められている^[11]。これまで我々は、IGF-1R/dnのアミノ酸(AA)数が異なる2種類のIGF-1R/dn(AA数950のIGF-1R/950stと482のIGF-1R/482st)の抗腫瘍効果を報告してきた^[4-6]。IGF-1R/950stは膜貫通部位を持つため、導入細胞の膜上に留まりwild type受容体とヘテロ重合体を形成し、下流シグナルを阻害する。一方、IGF-1R/482stは細胞外ドメインである α 鎖の一部のみであり、導入細胞から分泌され近隣細胞まで抑制できるため(Bystander効果)、IGF-1R/950stより強くIGFシグナルを阻害できる。我々はこれまで、mAb 1種類、TKI 2種類、short hairpin RNA 3種類を用いて各種消化器癌に対する抗腫瘍効果を検討してきたが、IGF-1R/dn、特にIGF-1R/482stが最も効果的であった印象を持っている^[2, 12, 13]。

今回、肝癌細胞株はIGF-1Rを高頻度に発現している事が明らかになった。さらに、肝癌細胞株に対してIGF-1R/dnを用いてIGFのシグナルを阻害したところ、細胞増殖とコロニー形成を抑制し、各種刺激によるアポトーシスの誘導を増強した。その際、IGF-1R/dnはIGF-1RおよびAkt-1のリン酸化を抑制することで、下流のシグナル伝達を阻害した。これは、これまで我々が大腸癌、胃癌、膵癌等の他の消化器癌において見出した効果と同様であった^[4-6]。肝癌は早期に発見できると焼灼術/手術などにより治癒可能となるが、進行した段階で発見されると、抗癌剤、塞栓療法などがあるもののそれらの効果は限られている事から、新たな治療法の開発が望まれている。よって、IGF-1Rを阻害することは、肝癌の治療戦略における、新たな治療選択の一つになる可能性があった。

本研究は、肝癌の発生/癌進展機序の解明につながる橋渡し研究(translational

research) となったと考えられる。肝癌発生リスクの高いひと／肝疾患患者が分かると、有効なスクリーニングを行なうことができ、早期発見に繋がることが期待される。また、糖尿病・メタボリック症候群の治療により、癌化のリスク低下、抑制、再発予防に繋がることが期待された。さらに、IGF-1Rを分子標的とした治療は肝癌に対する新たな治療戦略の開発に繋がると期待された。

要 約

多施設共同による症例対照研究から、血清IGFBP3低値とIGF1/IGFBP3モル比 (free IGF1) 高値は、特にIGFBP3低値は、肝炎ウイルス感染とは独立した、肝癌発症リスクを反映している可能性があった。

IGF, IGF-1Rは肝癌で重要な役割を担っており、IGF-1Rは肝癌に対する分子標的として大いなる可能性を秘めていた。IGF-1R阻害薬が早期に臨床の場で使用可能となることが期待された。

文 献

1. Kasuga M, Ueki K, Tajima N, et al. Report of the Japan Diabetes Society/Japanese Cancer Association joint committee on diabetes and cancer. *Cancer Sci* 104: 965-76, 2013.
2. Adachi Y, Yamamoto H, Imsumran A, et al. Insulin-like growth factor-I receptor as a candidate for a novel molecular target in the gastrointestinal cancers. *Dig. Endosc.* 18: 245-51, 2006.
3. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF) -I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 91: 620-5, 1999.
4. Adachi Y, Lee CT, Coffee K, et al. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. *Gastroenterology* 123: 1191-204, 2002.
5. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, et al. Genetic Blockade of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor: A Promising Strategy for Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 63: 6432-41. 2003.
6. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, et al. Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut* 54: 591-600, 2005.
7. Adamek A, Kasprzak A, Seraszek A, et al. Alterations of insulin-like growth factor I (IGF-I) and estradiol serum levels in chronic hepatitis C. *Contemporary Oncology* 16: 234-9, 2012.
8. Adamek A, Kasprzak A, Mikos H, et al. The insulin-like growth factor-1 and expression of its binding protein-3 in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Oncology Rep* 30: 1337-45, 2013.

9. Lam CSP, Chen MH, Lacey SM, et al. Circulating insulin-like growth factor-1 and its binding protein-3. Metabolic and genetic correlates in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1479-84, 2010.
10. Fuchs CS, Azevedo S, Okusaka T, et al. A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ganitumab or placebo in combination with gemcitabine as first-line therapy for metastatic adenocarcinoma of the pancreas: the GAMMA trial. *Ann Oncol* 26: 921-7, 2015.
11. Puzanov I, Lindsay CR, Goff L, et al. A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 21, 701-11, 2015.
12. Ii M, Li H, Adachi Y, et al. The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status. *Clin Cancer Res* 17: 5048-59, 2011.
13. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, et al. IGF-I receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci* 103: 252-61, 2012.