

氏名（本籍）	加藤潤一	（埼玉県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1119号	
学位授与日付	令和2年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Suppressive effects of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on colorectal tumorigenesis in diabetic and obese mice	
審査委員	（主査）教授	矢部 大介
	（副査）教授	小澤 修                      教授 山口 瞬

### 論文内容の要旨

大腸癌は罹患率、死亡数ともに上位に位置する悪性疾患である。大腸癌の発症には、肥満や糖尿病などの代謝異常との関連が示されており、慢性炎症や酸化ストレスなどの関与が指摘されている。実際、天然化合物や抗炎症薬などにより慢性炎症を軽減することが、糖尿病や肥満に関連する大腸癌の発生抑制に資する可能性が報告されている。ナトリウム/グルコース共役輸送体（sodium/glucose cotransporter: SGLT）2 阻害薬は、腎臓の近位尿細管におけるグルコース再吸収を抑制し、尿糖排泄を促進することで高血糖を是正すると共に、減量効果を発揮する糖尿病治療薬として注目される。癌細胞は SGLT などの輸送体を介してグルコースを取り込むため、SGLT2 阻害薬による抗腫瘍効果が期待されており、膵癌や肝癌に対する SGLT2 阻害薬の抗腫瘍効果がすでに報告されている。本研究では、SGLT2 阻害薬トログリフロジン（tofogliflozin: TOF）のアゾキシメタン（azoxymethane: AOM）誘発大腸癌抑制効果について、肥満糖尿病モデル C57BLKS/J *Iar*<sup>-</sup> + *Lepr*<sup>db</sup>/*+Lepr*<sup>db</sup> (*db/db*) マウスにおいて検討した。また、大腸癌細胞に対する TOF の直接的作用についてもヒト大腸癌細胞株を用いて解析した。

#### 【対象と方法】

5 週齢の *db/db* マウスを、未治療群（5 匹）、AOM 単独群（9 匹）、AOM/TOF 群（5 匹）、TOF 単独群（5 匹）に分けた。AOM 単独群と AOM/TOF 群では、5 から 8 週齢目までの 4 週間に AOM（15 mg/kg 体重）を週 1 回（計 4 回）腹腔内投与した。AOM/TOF 群と TOF 単独群では、9 週齢目から飲用水に溶解した TOF を自由飲水下で経口投与した。上記条件で飼育し、24 週齢で剖検を行った。大腸腫瘍の前癌病変である  $\beta$ -catenin accumulated crypt (BCAC) の数を比較検討した。白色脂肪組織は、抗 F4/80 抗体にて免疫染色を行いマクロファージの浸潤を評価した。また real-time PCR 法を用いて、大腸粘膜における *TNF- $\alpha$* , *CCL2*, *IGF-1*, *IGF-2*, *IGFBP-3* の mRNA 発現量および白色脂肪組織における *TNF- $\alpha$* , *CCL2* の mRNA 発現量を解析した。さらに、血清中のグルコース、インスリン、総コレステロール、遊離脂肪酸、中性脂肪、*TNF- $\alpha$*  を測定し、比較検討した。また、ヒト大腸癌細胞株における SGLT2 のタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより確認し、ヒト大腸癌細胞株 (HT29 および SW480 細胞) の増殖に対する TOF の影響について、MTS アッセイを用いて解析した。

#### 【結果】

マウスの体重や肝重量、腎重量、白色脂肪組織重量は 4 群間で有意差は認められなかった。大腸腫

瘍の解析では、AOM 単独群に比して AOM/TOF 群において BCAC 数の有意な減少が認められた ( $P < 0.05$ )。大腸粘膜における mRNA 発現解析では、AOM/TOF 群において *IGF-1* mRNA の発現の低下傾向がみられた。また、血清  $TNF-\alpha$  およびグルコースも同様の傾向であった。白色脂肪組織の解析では、AOM 単独群に比して AOM/TOF 群において F4/80 陽性細胞数は有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。白色脂肪組織における mRNA 発現解析では、AOM/TOF 群において  $TNF-\alpha$  および *CCL2* 発現の低下傾向が認められた。血清インスリンや遊離脂肪酸、中性脂肪は、AOM 単独群と AOM/TOF 群の比較で有意な差はみられなかった。

ヒト大腸癌細胞株における SGLT2 のタンパク質発現は、HT29 および SW480 を含む 4 種類の細胞株で確認されたが、48 時間の TOF 処理 ( $0.05\text{--}50\ \mu\text{M}$ ) では、HT29 および SW480 細胞の増殖に有意な差はみられず、TOF による細胞増殖への直接的な影響は認められなかった。

#### 【考察】

糖尿病や肥満に関連した大腸発癌を含め、発癌の基盤病態として慢性炎症は重要である。本研究では、血清  $TNF-\alpha$  濃度や大腸粘膜における  $TNF-\alpha$  および *CCL2* の mRNA 発現に有意な変化を認めないものの、TOF により白色脂肪組織へのマクロファージ浸潤が抑制されることから、TOF による全身的な慢性炎症の是正と発癌抑制の関連が示唆された。一方、糖尿病と関連する発癌の基盤病態として高血糖とインスリン抵抗性、さらには高インスリン血症に伴うインスリン様成長因子受容体 (IGF/IGF-1R) シグナル経路の活性化が注目される。本研究では、TOF により高血糖は是正されたが、血中インスリン濃度に変化はなく、IGF/IGF-1R 経路に関連する *IGF1* や *IGF3*、*IGF3* の mRNA 発現は大腸粘膜において有意な変化を認めなかった。従って、TOF は高血糖是正を介して発癌抑制効果を発揮する可能性があるものの、インスリン抵抗性の改善や高インスリン血症に伴うインスリン様成長因子受容体 (IGF/IGF-1R) シグナル経路の抑制である可能性は低いと考えた。また、大腸癌細胞株を用いた検討結果から、TOF が腫瘍細胞増殖を直接的に抑制する可能性は低いと考えた。以上から TOF は、肥満糖尿病患者において大腸癌の発症予防に寄与する可能性が示唆された。

#### 【結論】

糖尿病治療薬 SGLT2 阻害薬 TOF は、肥満糖尿病モデルマウスにおいて大腸前癌病変の発生を抑制し、その機序として慢性炎症の改善と高血糖の是正が考えられた。一般臨床で使用されている SGLT2 阻害薬が、肥満糖尿病患者の大腸発癌を予防する可能性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 加藤潤一は、肥満糖尿病モデルマウスにおいて、SGLT2 阻害薬トログリフロジンが、アゾキシメタンによる誘発される大腸前癌病変の発生を抑制することを見出し、その機序として慢性炎症の改善と高血糖の是正が関与する可能性を明らかにした。本研究成果は、肥満糖尿病患者で増加する大腸癌に対する SGLT2 阻害薬の有用性を示唆するものであり、今後、発癌予防の分子機構の更なる解析と臨床研究における検証を行うことで、大腸癌の予防・治療に対して少なからず貢献するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Junichi Kato, Yohei Shirakami, Masaya Ohnishi, Taku Mizutani, Masaya Kubota, Hiroyasu Sakai, Takashi Ibuka, Takuji Tanaka, and Mshito Shimizu: Suppressive effects of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on colorectal tumorigenesis in diabetic and obese mice.

Oncol Rep 42, 2797–2805 (2019), doi: 10.3892/or.2019.7357