

平成22年5月18日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390411
 研究課題名（和文） 高脂肪食による前立腺癌の進展促進の分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） ELUCIDATION OF MOLECULAR MECHANISMS UNDERLINING THE PROGRESSION OF PROSTATE CANCER ASSOCIATED WITH HIGH-FAT DIET
 研究代表者
 羽瀨 友則（HABUCHI TOMONORI）
 秋田大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00293861

研究成果の概要（和文）： 目的は高脂肪食と前立腺癌の関係を分子レベルで解明し、その克服の分子標的を見出し、治療や予防戦略に繋がる知見を得ることである。結果として、前立腺細胞株のマウス異種移植腫瘍のサイズが高脂肪食により増大することを確認し、網羅的 mRNA 発現解析により標的候補遺伝子を同定した。標的分子経路の候補として TWEAK-Fn14 シグナル伝達経路を解析し、このシグナルが内分泌療法不応性前立腺癌の浸潤能や進展に関与していることを示した。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study project is to delineate the molecular mechanisms underlying the progression of prostate cancer associated with high-fat diet, and to identify molecular targets to prevent the high-fat associated progression of prostate cancer. As results, we found that the tumor growth of the LNCaP xenograft was markedly enhanced by high-fat diet. The several candidate target genes associated with the high-fat diet associated progression were identified and confirmed by using microarray mRNA expression and quantitative RTPCR. Next, we focused on the TWEAK-Fn14 signal system as a target. We found that the TWEAK-Fn14 signal promote invasion and progression of prostate cancers in vitro and in clinical settings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・腫瘍学

キーワード：前立腺癌、高脂肪食、マイクロアレイ、発現解析、IGF-1、LNCaP、Fn-14、TWEAK

1. 研究開始当初の背景

近年の日本での前立腺癌の増加は著しい。原因にはPSA検診の普及による要素もあるが、1900年台半ばより変化した食事の西欧化が大きく作用していることが示唆されている。その中でも高脂肪食が前立腺癌の発症や進展に関与していることを示唆させる基礎的、臨床的データは多い。高脂肪食と前立腺癌の関係についての疫学的研究は国内外を含めて多くあり、肯定的な研究結果が多いが、疫学学的観察に留まるため真の生物学的なメカニズム、さらには予防手段への展開が無いのが実情である。また分子レベルでは、高脂肪食によるIGF-1高値、酸化ストレスの亢進などが指摘されているが定かではない。食事の西欧化が定着した現在の日本において今後の前立腺癌の発症や進展予防を考える上で、高脂肪食と前立腺癌の関係を分子レベルで解明し、その克服手段の基盤となる知見を得ることは重要で、分子標的治療だけでなく広く予防戦略に繋がる知見を得られる可能性がある。

2. 研究の目的

①高脂肪食と前立腺癌の関係を分子レベルで解明し、その克服手段の基盤となる知見を得ること。

②高脂肪食と前立腺癌進展の分子標的を見出し、治療だけでなく広く予防戦略に繋がる知見を得ること。

・我々がパイロット的に進めてきた高脂肪食マウスXenograftモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析をさらに進め、高脂肪食による発現変化を来たす候補遺伝子を同定する。

・候補遺伝子の機能解析を進めるとともに、実際の臨床検体（前立腺癌やBPHによる摘除標本など）での発現解析や個人間、生活習慣などの影響を探る。

・さらに我々が従来行ってきた分子疫学的手法を用いて候補遺伝子の多型を検索し、これらの遺伝子多型による高脂肪食-前立腺癌との関与を探索する。これらの研究から得られた知見から、再度高脂肪食マウスXenograftモデルを用いて高脂肪食による前立腺癌進展の化学予防を動物レベルで試みる。

3. 研究の方法

①高脂肪食マウスXenograftモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析：

・ヒト前立腺癌細胞のLNCaPをヌードマウスに摂取し、高脂肪食を与えると低脂肪食と比較して、摂取したLNCaPのXenograftのサイズを比較する。・このモデルを用いて、さらに形成された腫瘍よりRNAを抽出、マイクロ

レイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。本ステップにより、高脂肪食により前立腺癌進展に関与する遺伝子群を同定する。

・高脂肪食vs低脂肪食のLNCaPをヌードマウスの研究を続けるとともに、これらのうち有望遺伝子をさらに実際の臨床検体で、発現解析を行う。発現解析にはRT-PCR, 免疫染色、ウェスタンブロットを用いる。

②有望遺伝子の遺伝子多型解析による実際の臨床前立腺癌患者への関与の探索：

・高脂肪食マウスXenograftモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析と臨床検体でvalidationが確認された有望な遺伝子についてさらに実際の前立腺癌の発症・進展への関与をとくにBMI、食事内容、などを加味しながら、探索する。方法としては候補遺伝子の遺伝子多型をゲノムデータベース(例:NIHのSNP database)より検出に、エクソンやプロモーター領域に位置する有望なSNPやmicrosatellite多型を解析する。

・また前立腺癌患者のみに対象を絞り臨床経過、BMI、食事内容、などの患者背景とこれらの遺伝子多型の関与を探索する。これらのいわゆる遺伝子多型解析で有意な結果が得られれば、候補遺伝子が高脂肪食下における前立腺癌発症進展関与を強く支持する所見となる。

③有望遺伝子の生物学的検証：

・有望遺伝子についてはその蛋白に対する既存の抗体やsiRNA阻害剤を用いて生物学的な意義を検討する。またinvasionやmotilityアッセイやZymographyなどを用いて浸潤能、運動能の違いなどを検討する。

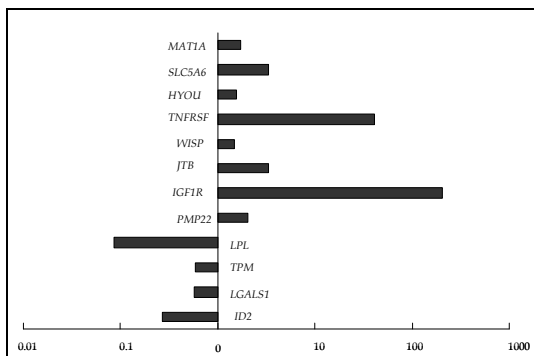
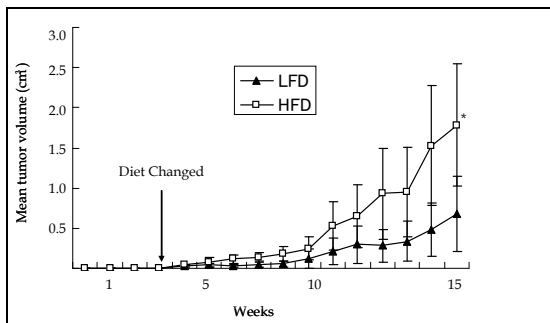
・高脂肪食下におけるLNCaPの進展阻止が可能なかを検討する。

・同様のストラテジーで他の候補遺伝子についても、阻害剤、抗体、siRNA、遺伝子導入などの方法を用いて、その妥当性を検証する。

4. 研究成果

①ヒト前立腺癌細胞のLNCaPをヌードマウスに摂取し、高脂肪食を与えると低脂肪食と比較して、摂取したLNCaPは有意に大きく成長した(図1)。さらに形成された腫瘍よりRNAを抽出、マイクロレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、高脂肪食により発現上昇を来した遺伝子(IGF-1R=insulin-like growth factor-1 receptor, TWEAK-R= TNF-like weak inducer of apoptosis-receptor、等)、発現低下を示した遺伝子(LPL=lipoprotein lipase、等)を同

定し、RT-PCR や免疫染色でこれらの結果を確認した(図2)。

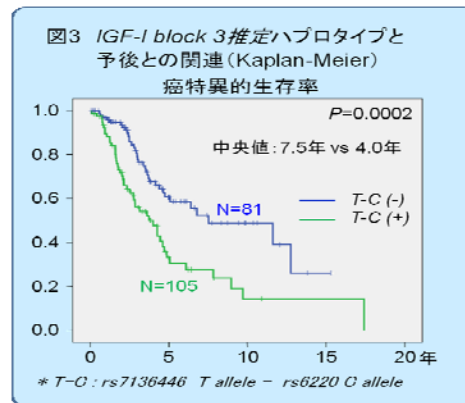


(図2) 高脂肪食による代表的な高発現と低発現遺伝子

②IGF-1の遺伝子多型解析：高脂肪食による前立腺癌進展のメカニズムとしてIGF-1システムに注目した。われわれは以前、IGF-1遺伝子多型が転移性前立腺癌予後に関与していることを報告した(Tsuchiya et al., J Clin Oncol 2006)。さらに高脂肪食進展のメカニズムとして、このIGF-1遺伝子のハプロタイプ解析を Promoter 領域: CA repeat (block 1) Intron 2:rs12423791 (block 2), rs7136446 (block 3)3' UTR: rs6220 (block 3)にわけて、診断時骨転移を有する前立腺癌患者 213例を対象に集中的に行った。

・結果としてIGF-I block 3ハプロタイプ: rs7136446とrs6220のハプロタイプを推定し(表2)予後との関連を解析したところ、T-Cハプロタイプと癌特異的生存率ならびに全生存率との間に有意な関連を認めた(P=0.0002, 0.002)。T-Cハプロタイプを有する患者の生存期間は有意に短かった(癌特異的生存中央値: 7.5 vs 4.0年、全生存中央値: 6.0 vs 3.6年)。

・IGF-Iの3つのハプロタイプブロックにおける、予後不良遺伝子マーカーの個数と予後との関連を検討したところ、3個の危険因子を有する群は持たない群と1-2個の危険因子を持つ群と比較して有意に予後不良であった。(図3、投稿予定)



③TWEAK-Fn14シグナルの解析：LNCaPの高脂肪食 Xenograft の遺伝子発現解析によって候補に挙げられたTWEAK-Fn14シグナルを集中的に解析した。TWEAKやその受容体であるTWEAKR=Fn14の前立腺癌細胞での発現解析、発現抑制実験、強制発現などによる挙動の変化、臨床検体を用いた発現の意義を検討した。

・結果として、TWEAK-Fn14シグナルは、内分泌療法耐性前立腺癌のPC-3やDU145で高発現していること。Fn14のsiRNAによるダウンで浸潤能や遊走が阻止されること、rTWEAKの投与で浸潤や遊走が更新されることを示した。またこの浸潤能の変化にはMMP-9活性が関与していることも示した。

・Fn14陽性前立腺癌では根治術後のPSA再発が有意に高いことを示した(図4)。

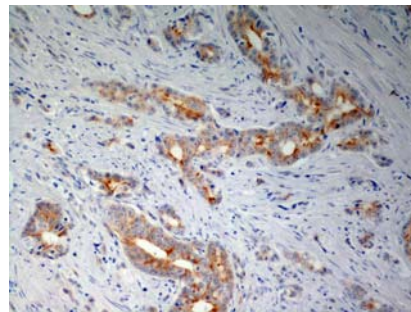


図4：TWEAKR=Fn14の高発現した異型度の高い前立腺癌

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29件)

- 1) Yuasa T, Maita S, Tsuchiya N, Ma Z, Narita S, Horikawa Y, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I, Takahashi S, Hatake K, Habuchi T. Relationship Between Bone Mineral Density and Androgen-deprivation Therapy in Japanese Prostate Cancer Patients. Urology. 2010 Feb 15. [Epub]

- 2) Kumazawa T, Tsuchiya N, Saito M, Inoue T, Narita S, Horikawa Y, Yuasa T, Satoh S, Kato T, Nanjyo H, Habuchi T. Cystoprostatectomy as a treatment of prostate cancer involving the bladder neck. *Urol Int*. 2009; 83(2): 141-5.
- 3) Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Inoue T, Ma Z, Tsuruta H, Saito M, Horikawa Y, Yuasa T, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. Clinical significance of a single nucleotide polymorphism and allelic imbalance of matrix metalloproteinase-1 promoter region in prostate cancer. *Oncol Rep*. 2009; 22(3): 493-9.
- 4) Wang W, Yuasa T, Tsuchiya N, Ma Z, Maita S, Narita S, Kumazawa T, Inoue T, Tsuruta H, Horikawa Y, Saito M, Hu W, Ogawa O, Habuchi T. The novel tumor-suppressor Mel-18 in prostate cancer: Its functional polymorphism, expression, and clinical significance. *Int J Cancer*. 2009 ; 125(12): 2836-43.
- 5) Inoue T, Segawa T, Kamba T, Yoshimura K, Nakamura E, Nishiyama H, Ito N, Kamoto T, Habuchi T, Ogawa O. Prevalence of skeletal complications and their impact on survival of hormone refractory prostate cancer patients in Japan. *Urology*. 2009 ; 73(5): 1104-9.
- 6) Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T, Kimura S. Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58(4): 493-502.
- 7) Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama TO, Wong SM, Kawashima H, Zhang J, Smith DF, Ohyama C, Fukuda M, Fukuda MN. Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(9): 3095-100.
- 8) Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Iwabuchi I, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Mori K, Yamaya K, Ohyama C. *Oncol Rep*. 2009; 21(1): 73-9
- 9) Lee SH, Hatakeyama S, Yu SY, Bao X, Ohyama C, Khoo KH, Fukuda MN, Fukuda M. Core3 O-glycan synthase suppresses tumor formation and metastasis of prostate carcinoma PC3 and LNCaP cells through down-regulation of alpha2beta1 integrin complex. *J Biol Chem*. 2009; 284(25): 17157-69.
- 10) Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, Lin J, Habuchi T, Wu X. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(23): 7956-62.
- 11) Yuasa T, Tsuchiya N, Kumazawa T, Inoue T, Narita S, Saito M, Horikawa Y, Satoh S, Habuchi T. Characterization of prostate cancer detected at repeat biopsy. *BMC Urol*. 2008; 8(1): 14.
- 12) Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Inoue T, Kumazawa T, Narita S, Horikawa Y, Tsuruta H, Obara T, Saito M, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 4 have association with the development of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia and the progression of prostate cancer in a Japanese population. *Int J Cancer*. 2008; 123(11): 2574-2579.
- 13) Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T, Hatakeyama S, Fujita S, Kawahara K, Sasaki M, Kishimoto H, Eguchi S, Kojima I, Beermann F, Kimura T, Osawa M, Itami S, Mak TW, Nakano T, Manabe M, Suzuki A. Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res*. 2008; 68(14): 5760-8.
- 14) Wang W, Yuasa T, Tsuchiya N, Maita S, Kumazawa T, Inoue T, Saito M, Ma Z, Obara T, Tsuruta H, Satoh S, Habuchi T. Bone mineral density in Japanese prostate cancer patients under androgen- deprivation therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2008 ;15(4): 943-52.
- 15) Terada N, Tsuchiya N, Ma Z, Shimizu Y, Kobayashi T, Nakamura E, Kamoto T, Habuchi T, Ogawa O. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate*. 2008; 68(15):1689-95.
- 16) Xue L, Nolla H, Suzuki A, Mak TW, Winoto A. Normal development is an integral part of tumorigenesis in T cell-specific PTEN-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(6): 2022-7.
- 17) Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A, Mak TW. The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene*. 2008; 27(41): 5398-415

- 18) Tsuchiya N, Inoue T, Narita S, Kumazawa T, Saito M, Obara T, Tsuruta H, Horikawa Y, Yuasa T, Satoh S, Habuchi T. Drug related genetic polymorphisms affecting adverse reactions to methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in patients with urothelial cancer. *J Urol*. 2008; 180(6): 2389-95.
- 19) Narita N, Yuasa T, Tsuchiya N, Kumazawa T, Narita S, Inoue T, Ma Z, Saito M, Horikawa Y, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. A genetic polymorphism of the osteoprotegerin gene is associated with an increased risk of advanced prostate cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8: 224.
- 20) Horikawa Y, Nadaoka J, Saito M, Kumazawa T, Inoue T, Yuasa T, Tsuchiya N, Nishiyama H, Ogawa O, Habuchi T. Clinical implications of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep*. 2008; 20(1): 49-55.
- 21) Zhu Y, Horikawa Y, Yang H, Wood CG, Habuchi T, Wu X. BPDE Induced Lymphocytic Chromosome 3p Deletions May Predict Renal Cell Carcinoma Risk. *J Urol*. 2008; 179(6): 2416-21
- 22) Takehi Y, Kamoto T, Shiraishi T, Ogawa O, Suzukamo Y, Fukuhara S, Saito Y, Tobisu KI, Kakizoe T, Shibata T, Fukuda H, Akakura K, Suzuki H, Shinohara N, Egawa S, Irie A, Sato T, Maeda O, Meguro N, Sumiyoshi Y, Suzuki T, Shimizu N, Arai Y, Terai A, Kato T, Habuchi T, Fujimoto H, Niwakawa M. Prospective Evaluation of Selection Criteria for Active Surveillance in Japanese Patients with Stage T1cN0M0 Prostate Cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2008; 38(2): 122-8.
- 23) Narita S, Tsuchiya N, Saito M, Inoue T, Kumazawa T, Yuasa T, Nakamura A, Habuchi T. Candidate genes involved in enhanced growth of human prostate cancer under high fat feeding identified by microarray analysis. *Prostate*. 2008; 68(3): 321-35.
- 24) Nadaoka J, Horikawa Y, Saito S, Kumazawa T, Inoue T, Narita S, Yuasa T, Satoh S, Nishiyama H, Ogawa O, Tsuchiya N, Habuchi T. Prognostic significance of HIF-1alpha polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 2008 ; 122(6): 1297-302
- 25) Inoue T, Obara T, Saito M, Kumazawa T, Yuasa T, Matsuura S, Tsuchiya N, Satoh S, Habuchi T. Possible survival benefit of high-dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin combination therapy (HD-MVAC) over conventional MVAC in metastatic urothelial carcinoma patients. *Hinyokika Kyo*. 2007; 53(9): 613-8.
- 26) Fukuda H, Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Horikawa Y, Inoue T, Saito M, Yuasa T, Matsuura S, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. Clinical implication of vascular endothelial growth factor T-460C polymorphism in the risk and progression of prostate cancer. *Oncol Rep*. 2007; 18(5): 1155-63.
- 27) Yuasa T, Kimura S, Ashihara E, Habuchi T, Maekawa T. Zoledronic acid - a multiplicity of anti-cancer action. *Curr Med Chem*. 2007; 14(20): 2126-35.
- 28) Horikawa Y, Kumazawa T, Narita S, Inoue T, Yuasa T, Matsuura S, Nanjo H, Satoh S, Tsuchiya N, Habuchi T. Lymphatic invasion is a prognostic factor for bladder cancer treated with radical cystectomy. *Int J Clin Oncol*. 2007; 12(2): 131-6.
- 29) Kanzaki M, Kakinuma H, Kumazawa T, Inoue T, Saito M, Narita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Habuchi T. Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide, enhance the effects of gemcitabine and docetaxel in hormone refractory prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2007; 17(4): 761-7.
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) Narita S. et al.: Evaluation of outcomes and genetic predictive factors for prognosis and toxicity in hormone-refractory prostate cancer patients following combination therapy with docetaxel, estramustine, and carboplatin. The 103rd Annual Meeting of the American Urological Association. April, 2009. Chicago, USA.
- 2) Kumazawa T. et al.: Overexpression of BCL-2 seen in residual prostate cancer after neoadjuvant chemohormonal therapy with docetaxel for locally advanced prostate cancer. The 103rd Annual Meeting of the American Urological Association. April, 2009. Chicago, USA.
- 3) Horikawa Y. et al.: Clinical implications of the MDM2 SNP309 and P53 Arg7Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. The 103rd Annual Meeting of

- the American Urological Association. April, 2009. Chicago, USA.
- 4) Nadaoka J. et al.: Prognostic significance of HIF-1 α polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. The 102nd Annual Meeting of the American Urological Association, May 2008, Orlando, USA.
 - 5) Wang W. et al.: A mutant allele in a miR-181 binding-site of the Mel-18 gene is associated with a poor prognosis in prostate cancer. The 102nd Annual Meeting of the American Urological Association, May 2008, Orlando, USA.
 - 6) Yuasa T. et al.: Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer. The 102nd Annual Meeting of the American Urological Association, May 2008, Orlando, USA.
 - 7) Inoue T. et al. Natural Killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide inhibits tumor growth of murine renal cell carcinoma. The 101st Annual Meeting of the American Urological Association, May 2007, Anaheim, USA.
 - 8) Kanzaki M. et al. Low concentration of a histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FK228), enhances the effect of gemcitabine and docetaxel in hormone refractory prostate cancer cells. The 101st Annual Meeting of the American Urological Association, May 2007, Anaheim, USA.
 - 9) Narita S. et al. Clinical implication of vascular endothelial growth factor (VEGF) T-460C polymorphism in the risk and progression of prostate cancer. The 101st Annual Meeting of the American Urological Association, May 2007, Anaheim, USA.
 - 10) Tsuchiya, N. et al. Identifying genetic polymorphisms which predict adverse effects of MVAC in patients with urothelial cancers. The 101st Annual Meeting of the American Urological Association, May 2007, Anaheim, USA.
 - 11) Yuasa, T. et al. A novel third generation bisphosphonate, minodronic acid, augments the interferon α/β -mediated inhibition of renal cell cancer cell growth both in vitro and in vivo. The 101st Annual Meeting of the American Urological Association, May 2007, Anaheim, USA.

[図書] (計 4 件)

- 1) Tomonori Habuchi, Prognostic Markers for bladder cancer. In: "Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical

Management, Edi.: Vinata B. Lokeshwar, Springer US, 2010 in press

- 2) Tomonori Habuchi, and Tadao Kakizoe, Bladder Cancer: in Chapter 11: Field Cancerization in Specific Cancers: IN Clinical Utility of Molecular Signatures in Cancer Fields Edi.: Gabriel Dakubo, Nova Science Publishing Co., 2010 in press.
- 3) 湯浅 健、羽瀧友則：泌尿器がん。“西條長宏、西尾和人（編）、がん化学療法・分子標的療法 update、中外医学社”pp674-681、2009 年
- 4) 羽瀧友則：膀胱がん・上部尿路上皮がん．新臨床腫瘍学（改訂第 2 版）、編集：日本臨床腫瘍学会、南江堂、pp552-562、2009 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~hinyoki/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽瀧 友則 (HABUCHI TOMONORI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00293861

(2) 研究分担者

鈴木 聡 (SUZUKI AKIRA)
九州大学・生体防御研究所・教授
研究者番号：10311565
中村 彰 (NAKAMURA AKIRA)
秋田大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：20155815
大山 力 (OYAMA CHIKARA)
弘前大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80282135
土谷 順彦 (TSUCHIYA NORIHIKO)
秋田大学大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：70282176
湯浅 健 (YUASA TAKESHI)
財団法人癌研究会・附属病院化学療法科・
医長
研究者番号：00314162