

平成22年5月7日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791115  
 研究課題名（和文） 骨髄幹細胞（前駆脂肪細胞）の前立腺癌への影響：シグナル伝達の網羅的解析  
 研究課題名（英文） Influence on prostate cancer of bone marrow stem cell (pre-adipocytes) : Comprehensive analysis of the signaling pathways  
 研究代表者 佐藤 勇司 (Yuji Satoh)  
 佐賀大学・医学部・講師  
 研究者番号：40363436

## 研究成果の概要（和文）：

今回、ヒト前立腺癌cell lineと前駆脂肪細胞を用い、シグナル伝達について検討した。

コラーゲンゲルで前立腺細胞と成熟細胞で、液性因子作用と接触因子作用を検討する条件で3次元培養を行った。LNCaPでは液性因子と細胞接触が増殖促進に必要であること、PC-3では細胞接触作用が細胞分化に必要であること、DU145では液性因子と細胞接触が増殖促進と細胞分化に必要であるが示唆された。cDNA microarrayの結果、前立腺特異的発現PSGR2とintegrinの発現が有意であり、その関与が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined signaling pathways with human prostate cancer cell line and pre-adipocytes .Cancer cells were co-cultured with the isolated mature adipocytes in 3-D collagen gel matrix culture. In LNCaP, humoral factors and cell to cell contaction are necessary for proliferation. In PC-3, cell to cell contaction is necessary for differentiation. In DU145, humoral factors and cell to cell contaction are necessary for proliferation and differentiation. As a result of cDNA microarray , Prostate-specific expression PSGR2 and integrin significantly increased.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：泌尿器科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：

- |                      |                     |                    |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| (1) 前立腺癌             | (2) 脂肪細胞            | (3) 3次元培養          |
| (4) シグナル伝達           | (5) 免疫染色            | (6) Western Blot 法 |
| (7) Real-Time RT PCR | (8) cDNA microarray |                    |

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄細胞は、中胚葉性多機能幹細胞を含んでおり、この幹細胞は osteogenesis、adipogenesis、chondrogenesis に関与するといわれている。このうち、特に脂肪細胞は、他の臓器に比べ最も多くの内分泌タンパク遺伝子を発現しており、その発現遺伝子はホルモン、増殖因子、サイトカインである。その多くのシグナル伝達系は cell growth、transformation、differentiation、survival に関与していることが解明され、固形腫瘍の肥満と関与について、多く報告されている。

泌尿生殖器癌では、特に前立腺癌と肥満とは、発生や予後との関与と PI3K シグナルや MAPK シグナルとの関与が示唆されている。今回は、肥満は前立腺癌のリスク因子であり、我々は、成熟脂肪細胞が前立腺癌の増殖因子の分泌を誘導し、増殖・分化への影響について、報告を行った。今回、前駆脂肪細胞の前立腺癌への影響、特にシグナル異常について網羅的に検討する。ヒト前立腺癌 cell line とラットの異種前駆脂肪細胞を用い、3次元培養モデルを構築し、Microarray を用い、シグナル異常の網羅的検討し、その発現異常や発現異常に関与すると考えられる変異や DNA メチル化の解析を行い比較検討する。

## 2. 研究の目的

PI3K シグナルや MAPK シグナル等の関与については、個々の前立腺癌臨床サンプルで、発現状態と予後などについて、報告されているが、前駆脂肪存在環境下での、詳細なシグナル伝達の異常についての報告はない。また、前立腺癌のシグナル異常についてヒト前立

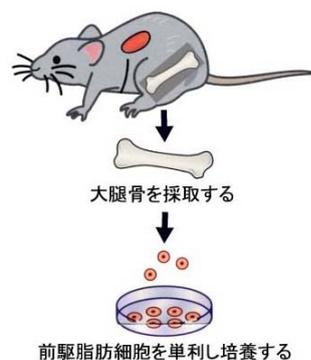
腺癌 cell line とラットの異種前駆脂肪細胞を用い、3次元培養モデルでの比較の報告は見受けられない。

## 3. 研究の方法

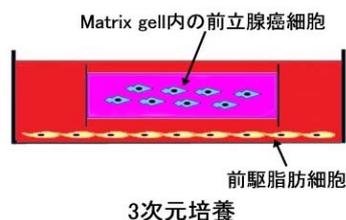
### I. 研究計画のながれ

<平成19年度の研究計画>

- 1) ラットの大腿骨から骨髄を採集し、分離後、前駆脂肪細胞の培養を行う。



上記細胞を用い、Matrix gelを用い3次元培養にてヒト前立腺癌cell lineの培養を行う。



培養後、collagenaseにてMatrix gelより細胞を分離する。

- 2) 遺伝子の発現状態を網羅的に解析する。

上記培養から、RNAを抽出後、cDNA Microarrayを用い遺伝子発現状態を解析し、さらに、薄切片を用い、RNA in situ Hybridizationや免疫染色を行う。

### 3) 発現異常メカニズムの解析

上記の組織を使用し、DNAを抽出後、Bisulfite薬剤処理後、COBRA法を用い、泳動ゲルで上記遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化の解析を行う。

上記の経過に従い、まず、ラットの骨髄より前駆脂肪細胞を単離し、培養を行ったが、安定した成熟細胞が得られなかったため、計画を変更し、前駆脂肪細胞3T3-L1を用い、成熟細胞へ分化させ、3次元培養にてヒト前立腺癌cell lineの培養を行った。

#### <平成20年度の研究計画>

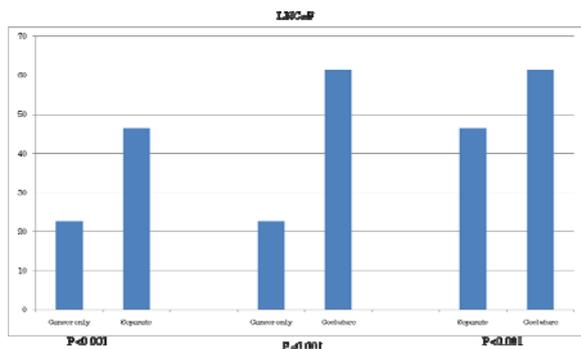
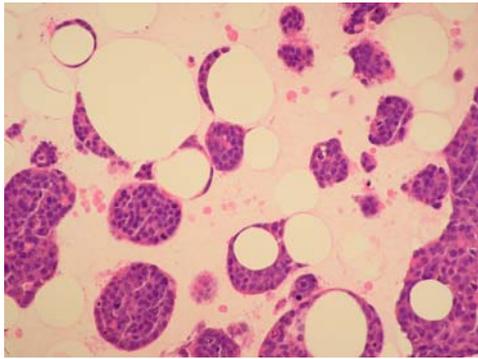
- 1) 手術で得られたヒト腎周囲脂肪組織を採集し、分離後、成熟脂肪細胞の培養を行う。
- 2) 単離したヒト成熟脂肪細胞を3次元培養にてヒト前立腺癌cell lineの培養を行う。培養後、collagenaseにてgelより細胞を分離する。

#### <平成21年度の研究計画>

- 1) 平成20年度の研究計画の1)、2)を行う。
- 2) 遺伝子の発現状態を網羅的に解析する。上記培養から、RNAを抽出後、cDNA Microarrayとreal time RT-PCRを用い遺伝子発現状態を解析し、さらに、薄切切片を用い、RNA in situ Hybridizationや免疫染色を行う。
- 3) 発現異常メカニズムの解析  
上記の組織を使用し、DNAを抽出後、Bisulfite薬剤処理後、COBRA法を用い、泳動ゲルで上記遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化の解析を行う。
- 4) ELISA法で培養液中の液性因子の検討を行う。

### 4. 研究成果

- (1) 平面培養下で前駆脂肪細胞3T3-L1を成熟脂肪細胞へと誘導し、その培養環境下で、前立腺癌細胞をコラーゲンゲル3次元培養を行い、液性因子作用の検討を行った。しかし、誘導した成熟細胞は、プレートより剥がれる状況となり、成果が得られなかった。ここで、誘導後、前立腺癌細胞とコラーゲンゲル3次元培養を行ったが、成熟脂肪細胞は長期に培養すると脂肪滴は減少し、成果が得られなかった。
- (2) 次にラット骨髄から得た前駆脂肪細胞も上記のごとく、成熟脂肪細胞へ誘導できたが、こちらも、上記と同様であったため、成熟細胞を用いることとした。
- (3) コラーゲンゲルで前立腺細胞と成熟細胞で、液性因子作用と接触因子作用を検討する条件で各種3次元培養を行った。その結果、LNCaPでは、液性因子作用と細胞接触作用が増殖促進に必要であること、PC-3では、液性因子作用よりは細胞接触作用が必要であること、DU145では、液性因子作用と細胞接触作用が増殖促進と細胞分化を誘導したことが示唆された。
- (4) 混合培養したLNCaPを用いて、cDNA microarrayを行ったところ、有意に発現上昇した遺伝子、数種を確認した。
- (5) 脂肪細胞の宿主の問題もあり、倫理委員会の承認を得て、手術で得たヒト成熟脂肪細胞を用い、上記研究を行った。
- (6) 今回も、3群で3次元培養を行った。  
1: cancer cell only 群  
2: Separated 群; 液性因子作用観察 (cancer cell と adipocytos が密着させずに培養)  
3: Coculture 群; 接着因子作用観察
- (7) ラット脂肪と同様の結果であった。  
LNCaP  
癌細胞数は、Coculture 群 > Separated 群 > cancer cell only 群であった。

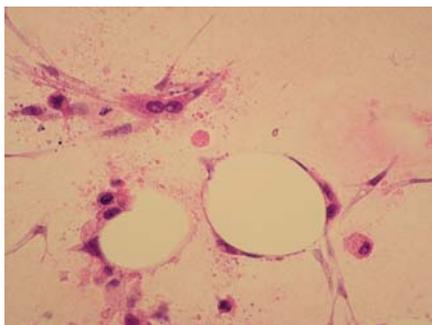


#### PC3とDU145

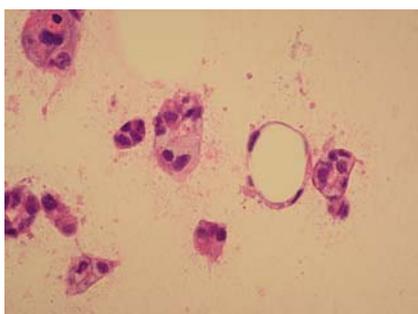
癌細胞数は、Coculture 群=Separated群 > cancer cell only 群であった。

しかし、adipocyto存在下では、紡錘様形態変化やより豊富な細胞質を有する癌細胞の存在を認め、Coculture 群がSeparated群に比べ、その効果が強い印象であった。

#### PC3 紡錘様形態変化を有する癌細胞



#### PC3 より豊富な細胞質を有する癌細胞



- (8) Preliminary なcDNA microarrayの結果で前立腺細胞特的に発現するPSGR2とIntergineが高発現していた。まず、Western blottingを行った。LNCaP細胞ではPSGR2とIntergineの蛋白活性が増強し、DU145ではIntergineの蛋白活性のみ増強していた。PC3はいずれも変化なかった。
- (9) DNAメチル化の解析やELISAによる検討は今回行えなかった。今後の検討課題である。

#### 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2件)

- ① Arata Kaneko, Yuji Satoh, Yuji Tokuda, Chisato Fujiyama, Kazuma Udo and Jiro Uozumi.、Effects of adipocytes on the proliferation and differentiation of prostate cancer cells in a 3-D culture model.、International Journal of Urology、査読有、Vol.17、No.4、2010、p 369-376.
- ② 金子新, 佐藤勇司, 藤山千里, 徳田雄治, 有働和馬, 魚住二郎, コラーゲンゲル三次元混合培養による前立腺癌細胞に対する脂肪細胞の影響の検討.、西日泌尿器科、査読無、Vol.69、2007、p 171-175.

〔学会発表〕(計1件)

- ① 佐藤勇司, 金子新, 吉永北斗, 有働和馬, 徳田雄治, 藤山千里, 魚住二郎, 脂肪細胞が前立腺癌細胞に与える影響について; Prostate cancer cell-adipocyte interaction in vitro、第17回泌尿器分子・細胞研究会、2008年2月6日(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 勇司 (Yuji Satoh)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：40363436

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：