

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462008

研究課題名(和文)大腸癌肝転移における脂肪酸代謝の役割と新たな肝転移制御戦略の確立

研究課題名(英文) Analysis of lipid metabolism as a novel treatment strategy for targeting colon cancer liver metastasis

研究代表者

山本 真義 (Yamamoto, Masayoshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：70397420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌同所移植肝転移モデルを用いて、肝転移を作成、同所移植腫瘍と肝転移巣を採取し、脂質代謝プロファイリングの違いを比較した。脂質代謝プロファイリングは原発巣と転移巣で有意な差はみられなかった。同モデルを用いて、原発巣および肝転移巣における脂質代謝に関わる遺伝子発現変化の解析を行ったところ、脂質代謝経路は抽出されなかった。臨床検体における脂質代謝変化の解析として、当科で切除した大腸癌肝転移巣の臨床検体を用いて、脂質代謝関連因子の免疫組織化学染色を行ったが、発現量に有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In the mouse model of colon cancer liver metastasis, we compared the lipid metabolism profiling between primary tumor and liver metastases by liquid chromatography. However, no significant differences were observed in this experiment. Using the same mouse model, we performed the gene expression analysis by microarray. However, we could not observe any significant differences between primary tumor and liver metastases. Next, we analyzed the protein expression levels that involved in lipid metabolism in surgically resected colon cancer liver metastasis samples by immunohistochemical staining. However, we could not observe any significant differences between primary tumor and liver metastases.

研究分野：下部消化管外科

キーワード：大腸癌肝転移 脂肪酸代謝

1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸癌は著しい増加傾向にある。直接の死亡原因の多くは肝転移によるものであり、その攻略が予後向上における最も重要な課題である。近年の分子標的治療薬の発展は進行再発大腸癌の予後延長に寄与してきているものの、未だ満足のいく結果とは言えない。現在の分子標的治療薬は主に EGFR や VEGF などを標的とし MAPK 経路を中心とした増殖シグナル阻害が中心であるが、代替シグナルの活性化による悪性形質獲得や下流遺伝子変異における耐性などの問題点が明らかとなってきている。すなわち増殖シグナルのみに焦点を当てた現行の治療法では限界があり、これまでとは異なるアプローチによる新しい標的を同定し、より有効な治療戦略を構築することが今後の最重要課題である。

近年、癌の進展におけるエネルギー代謝、特に脂肪酸酸化の重要性が次々と報告され、転移との関連が注目されている。特に卵巣癌の大網転移において、癌細胞が大網に接着後、大網内の脂肪細胞から遊離脂肪酸を受け取り、急速増殖のためのエネルギー源として利用している事を示した報告(Nieman et al. Nature Med 2011)は、癌転移と脂肪酸代謝との関連をはじめ明らかにし、さらに腫瘍細胞と転移先臓器との間の Cross-talk により転移が成り立つという“Seed and Soil”説に基づく極めて興味深い論文である。

癌細胞は自身の細胞内代謝経路を組み替える (Metabolic switch) を起こし、代謝ストレス下での生存、増殖を制御していると考えられている。これまでの研究では解糖系への switch である Warburg 効果やグルタミン酸利用による脂肪酸合成が注目されてきたが、エネルギー源としての脂肪酸の利用については解明が不十分であった。その後 2009 年に代謝ストレス下の癌細胞における脂肪酸酸化の重要性が初めて報告され、(Schafer et al. Nature 2009)、その後も癌細胞における CPT1C の高発現と脂肪酸酸化が癌細胞生存に必要であることを示した報告や(Zaugg et al. Gene Dev 2011)、白血病幹細胞の機能維持に脂肪酸酸化が重要であることを示した報告(Samudio et al. J Clin Invest 2010)など、癌細胞における脂肪酸酸化の重要性を示す根拠が次々と明らかになってきている。

肝転移巣における癌細胞においても脂肪酸酸化を利用している可能性が高いことが示唆される。肝細胞は血中からの遊離脂肪酸の取り込み、貯蔵能が強いため脂肪の含有量が多く、また脂肪酸酸化系の酵素活性は、ATP 消費が大きい肝臓で最も強いと言われる。そこに癌細胞が生着し、脂肪酸もしくはその代謝物を取り込み、エネルギー源として生存や増殖に利用している可能性が強く考えられる。すなわち肝細胞と癌細胞との間にあるエネルギー

ギー依存関係を破壊することにより肝転移を抑制できる可能性があり、さらにヘテロジニアスである原発巣から、脂肪酸酸化を利用できる細胞クローンが選択的に肝転移を来すと仮定すれば、脂肪酸代謝の抑制による肝転移予防へも応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌肝転移における脂肪酸酸化の重要性に着目し、肝転移動物モデルを用いた脂質代謝プロファイリング、および大腸癌肝転移切除検体を用いて臨床検体における脂質代謝関連遺伝子、蛋白の発現比較を行うことで、大腸癌肝転移過程における脂質代謝の役割を明らかにすることを目的とする。さらに活性化 k-ras 遺伝子の脂質代謝への関与を明らかにすることで、k-ras 変異症例にも有効な新しい肝転移制御戦略を確立する。

本研究によって大腸癌肝転移機序を脂肪酸代謝という別の角度から解明し、新たな予防戦略、治療戦略を構築することで、k-ras 変異症例を含めた多くの大腸癌患者の生命予後を延長できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌同所移植肝転移モデルを用いた脂質代謝プロファイリング

浜松医科大学外科学第二講座にてマウス皮下で継代している TK-4 は同所(盲腸壁)に移植すると 3~4 週後に高率に肝転移を生じるものである。このモデルを用いて、肝転移を作製。同所移植腫瘍と肝転移巣を採取し、脂質を Bligh-Dyer 法にて抽出後、液体クロマトグラフィー(LC)を用いて脂質解析を行い、脂質代謝プロファイリングの違いを原発巣と肝転移巣で比較する。得られたデータをもとに原因となる脂質代謝経路を推定し、Metabolic switch に関わる関連遺伝子をリストアップする。

(2) 大腸癌同所移植肝転移モデルを用いたマイクロアレイ解析

同モデルを用い、原発巣および肝転移巣から total RNA を抽出。Affymetrix 社 GeneChip® Human Gene ST Array を用いて原発巣および肝転移巣における遺伝子発現変化を解析する。得られたデータを Gene Set Enrichment Analysis を用いて、脂質代謝の変化を解析する。有意な変化がみられた候補遺伝子について、定量的 RT-PCR 法を用いて確認する。

(3) k-ras 癌遺伝子の変異解析

浜松医科大学第二外科において過去 15 年間に切除された、化学療法歴のない大腸癌肝転移 20 例の原発巣、肝転移巣切除検体、およびコントロールとして 5 年以上無再発進行大

腸癌症例の原発巣 50 例の FFPE sample から腫瘍組織を採取し、ゲノム DNA を抽出。抽出したゲノム DNA を鋳型として、k-ras コドン 12 および 13 の特異的プライマーを用いて PCR を行い、k-ras 遺伝子変異を Direct sequence 法にて解析する。上記 1. 2 で得られた遺伝子の発現量と k-ras 変異の有無との相関関係を解析し、k-ras 変異と脂質代謝との関連を明らかにする。

(4) 大腸癌肝転移切除検体の組織化学染色

浜松医科大学第二外科において過去 15 年間に切除された、化学療法歴のない大腸癌肝転移 100 例の原発巣、肝転移巣切除検体、およびコントロールとして 5 年以上無再発進行大腸癌症例の原発巣 50 例の FFPE sample を用いて、上記 1. 2. で候補に挙げたタンパク質の免疫組織化学染色を行う。

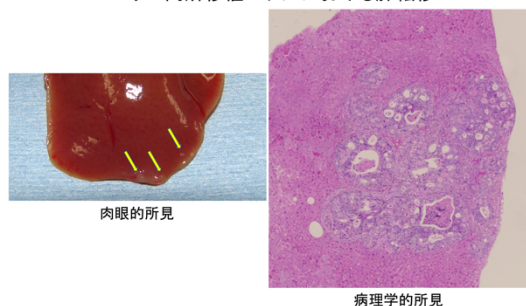
(5) 脂質代謝阻害剤による肝転移抑制効果の検討

上記で候補に上がった標的遺伝子に対する shRNA 発現 lentivirus plasmid を作製。HEK293T 細胞に packaging plasmid pCMV-dR8.91 および envelope plasmid pMD2.G と共に transfect し lentivirus を得る。この virus を TK-4 に感染させ、stable knockdown 株およびコントロール株を作成する。

4. 研究成果

(1) まず、大腸癌同所移植肝転移モデルを用いて、肝転移を作成、同所移植腫瘍と肝転移巣を採取し、脂質代謝プロファイリングの違いを原発巣と肝転移巣で比較した。大腸癌同所移植肝転移モデルとして、当科で継代維持しているヒト由来大腸癌株 TK4 をヌードマウスの盲腸に同所移植を行った。TK-4 は同所に移植すると 3~4 週後に高率に肝転移を生じるものである。このモデルを用いて、肝転移の作成を試みた。肝転移は肝表面に数ミリ大の結節として確認された。しかし、本実験における肝転移率は約 5~10% と以前の報告よりも低値であった。

マウス同所移植モデルにおける肝転移



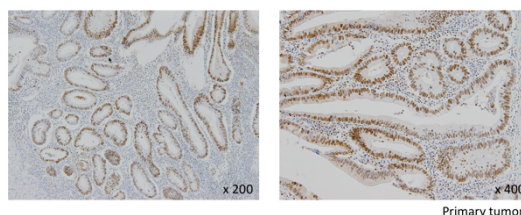
(2) 肝転移巣を採取し、脂質を Bligh-Dyer 法にて抽出後、液体クロマトグラフィー (LC)

を用いて脂質解析を行い、脂質代謝プロファイリングの違いを原発巣と肝転移巣で比較を試みた。脂質代謝プロファイリングは原発巣と転移巣で若干の差はみられたものの、統計学的に有意な差はみられなかった。

(3) 同モデルを用いて、原発巣および肝転移巣から Total RNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて脂質代謝に関わる遺伝子発現変化の解析を試みた。GSEA を用いたエンリッチメント解析を行ったところ、脂質代謝経路は抽出されなかった。

(4) 臨床検体における脂質代謝変化の解析として、当科で切除した大腸癌肝転移巣の臨床検体を用いて、K-ras 遺伝子変異の解析を行うとともに、脂質代謝関連因子 (PGC-1 α , Fatty Acid Synthase, Sphingosine Kinase, SREBP) の免疫組織化学染色を行った。原発巣と転移巣の比較において、上記因子の発現量に有意な差は認められなかった。

PGC1 α Immunohistochemistry



(5) PGC-1 α は脂質代謝を制御する主要な因子の一つであり、その代謝経路を阻害することによる転移抑制実験を試みた。大腸癌 Cell line を用いて、PGC-1 α の shRNA 安定株の作成を試みたが、コントロールとして用いる scramble shRNA 安定株と比較して細胞増殖能、Viability の著明な低下が認められたため、同所移植実験に用いることが困難であると判断した。現在はその他の候補因子を CRISPR-Cas9 を用いたノックアウト細胞の作成を試みており、肝転移抑制実験を施行予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 真義 (YAMAMOTO, Masayoshi)
浜松医科大学医学部附属病院・診療助教
研究者番号：70397420

(2) 研究分担者

今野 弘之 (KONNO, Hiroyuki)
浜松医科大学医学部・学長
研究者番号：00138033

菊池 寛利 (KIKUCHI, Hirotoshi)
浜松医科大学医学部・助教
研究者番号：70397389

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし