

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861297

研究課題名(和文) 脂肪酸受容体と内臓脂肪に着目した腎癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of development mechanism in renal cell carcinoma: focus on fatty acid receptor and visceral fat.

研究代表者

小幡 淳(OBATA, JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20570865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌において、メタボリックシンドロームへの重要な関与が指摘され始めた脂肪酸受容体GPR120の与える影響を検討した。各種腎細胞癌株において、GPR120の活性化による短期的な抗腫瘍効果をWST assayで調べたが明らかな抗腫瘍効果は認めず、またWestern blot法にてGPR120の発現も変化を認めなかった。agonistを定期投与することによる長期の抗腫瘍効果についても、様々な条件下でも細胞増殖能やGPR120の発現に変化を認めなかったが、GPR120はその抗炎症化作用から癌との関連が予想されるため、今回様々な条件の下で行った実験の過程や結果は今後の研究の一助となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In renal cell carcinoma, we evaluated the impact of GPR120, a fatty acid receptor which has been identified as the important substance associated with metabolic syndrome. For examining short-term antitumor effect by stimulating GPR120, cell viability was measured subsequently after the exposure of agonists using WST-assay in a variety of renal cell carcinoma cell lines. We observed no obvious inhibition of proliferation and no change of GPR120 activity over time by western blot method. Although we also evaluated the long-term cytotoxicity by regular GPR120 stimulation, we found no remarkable change concerning the cellular proliferative potential and expression of GPR120 by western blot analysis regardless of conditions. Because it is expected that GPR120 is significantly associated with cancer for its anti-inflammatory effects, processes and results of our study under various conditions may be helpful for future study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪酸受容体 肥満 腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腎癌は、乳癌や大腸癌と同様に肥満との関連性の高い悪性腫瘍であり、肥満人口の増加に伴い罹患率が増加している悪性疾患の一つである。しかし、肥満が腎癌の病態形成に実際にどのように関与しているかについては未だ詳細は明らかになっておらず、さらに癌の進展や予後との関係についても定まった見解が得られていない。

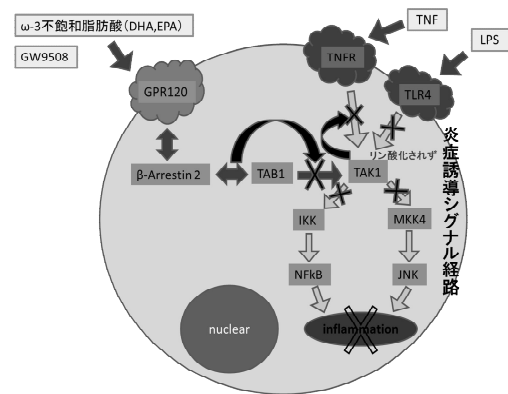
一方で近年、メタボリックシンドローム発症の原因として注目されていたレプチンやアディポネクチンといったサイトカインが、血管新生や癌の浸潤に寄与している可能性が指摘されるようになってきた (Fantuzzi G et al. J Leukoc Biol. 2000)。これらは脂肪組織の中の脂肪細胞で主に分泌されており、肥満によるそれらの分泌の異常と腎癌の予後の関連も報告されている (Horiguchi A et al. J Urol. 2006)。さらにメタボリックシンドロームの解明により、一般的な「肥満」を“皮下脂肪型”と“内臓脂肪型”に分けて考えることが必要となってきた。特に近年注目されている「内臓脂肪」は、癌との関連が示唆される各種サイトカインなどの分泌活性が高いとされているため、その性質の解析を行い定量結果も含めて考えることは、癌との関連性を考える上で非常に有用であると考えられる。実際、従来は body mass index (BMI) を肥満の指標として用いて腎癌の臨床病理学的所見や予後との関連が報告されてきたが、最近では画像上で内臓脂肪量を反映する内臓脂肪面積 (Visceral fat area ; VFA) との関連の報告が相次いでいる (Zhu Y et al. J Urol. 2013, Ladoire S et al. Oncologist. 2011)。例え同じ BMI であったとしても肥満のタイプにより各種サイトカインの分泌量、タンパクの発現量などの動向も変わってくるため、腎癌との関連をより詳細に調べるためには、各種脂肪組織についてそれぞれ解析を行うことが必要になってくると考えられる。しかしこれまで、そのような各種脂肪の横断的な解析と、それぞれの定量結果を統合して、腎癌の臨床像や予後との関連を調べた研究は未だなされていない。

そこで我々が着目したのは、最近メタボリックシンドローム発症に大きく関与することが解明された、脂肪酸受容体 GPR120 である (Ichimura A et al. Nature. 2012)。このタンパクは G 蛋白共役受容体 (GPCR) の一つで、脂質代謝のセンサーとして機能し、その機能不全により肥満となることが解明されたが、同時にドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω -3 不飽和脂肪酸や GW9508 という物質を agonist として抗炎症化作用を示すことが明らかにされた。我々はその抗炎症化作用の作用過程から、GPR120 が癌の進展に関与している可能性があると考え、この受容体の腎癌細胞内にお

ける動向と影響を検討したうえで、それを個体の各種脂肪内での動向と関連付けて考えることにより、腎癌における肥満の影響を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

GPR120 の抗炎症化作用の機序の模式図を示す。



脂肪細胞やマクロファージ内で、agonist により GPR120 が活性化され、 β -Arrestin 2 さらに TAB1 (TAK1 binding protein 1) と結合することで、TAB1 の結合によりリン酸化されるはずの TAK1 が活性化されず、NF- κ B や JNK を介した炎症誘導シグナル経路が機能しなくなる。これにより TNF- α 、IL-6 等の腫瘍細胞の成長に寄与する炎症性サイトカインの分泌が低下する。これらの反応は全て、GPR120 を介した特異的な反応であることが明らかになっている (Ichimura A et al. Nature. 2012)。

さらに、この TAK1 が抑制されると、腫瘍血管新生や癌の浸潤、転移に寄与する MMP-9 も抑制される。既に乳癌細胞では、TAK1 を抑えることにより MMP-9 の抑制を介し、癌の浸潤能、転移能が低下することが示されている (Safina A et al. Oncogene 2008)。

これらより、GPR120 の活性化により癌の転移、浸潤能が抑制される可能性は十分に考えられる。そこで我々はまず、in vitro で腎癌細胞株における GPR120 活性化時の短期的および長期的抗腫瘍効果を検討し、その後実際の腎癌症例において、皮下脂肪、内臓脂肪、腎周囲脂肪などの各種脂肪における GPR120 の発現の関連性の解析を行うこととした。これは、GPR120 の発現について、正常人 (非担癌成人) において皮下脂肪および内臓脂肪における発現量が相関している、との報告がある (Ichimura A et al. Nature. 2012) ため、それが担癌状態でも成立してい

るようであれば、その後さらに個体間の臨床病理学的所見や予後との関連性を考えるのが容易になると考えたからである。なお、検体については、慶應義塾大学病院での腎腫瘍に対する腎摘出術および腎部分切除術において摘除可能な各種脂肪組織を採取することを倫理委員会に申請した。

3. 研究の方法

(1) GPR120 の短期的抗腫瘍効果の検討

まず、GPR120 を agonist である GW9508 で活性化することによる短期的な抗腫瘍効果とその至適濃度を調べるため、WST assay を用いて腎癌細胞株の Caki-1 に種々の濃度の GW9508 [0nM(コントロール), 10nM, 100nM, 1000nM, 10000nM] を投与する。今回の反応に關与する炎症誘導シグナル経路を活性化する TNF やリポ多糖(LPS)を加えた系でも検討する。GW9508 の代わりに DHA を投与した場合や、他の腎癌細胞株 (769-P、Caki-2、786-Q、ACHN) においても検討する。

(2) GPR120 の発現の動向の確認

次に、それぞれの腎癌細胞株に上記で得られた最適な濃度の GW9508 あるいは DHA を投与し、24 時間後、48 時間後、72 時間後の GPR120 の発現を Western blot 法を用いて比較検討する。

(3) agonist 長期投与による GPR120 の抗腫瘍効果の検討

同様の腎癌細胞株を用いて、GW9508 あるいは DHA を長期投与することによる GPR120 の発現の推移を月単位で Western blot 法にて確認する。同時に、細胞培養の状況から、細胞増殖能の長期的な変化の評価を行う。

4. 研究成果

(1) GPR120 の短期的抗腫瘍効果の検討

Caki-1 に 10^4 nM までの種々の濃度の GW9508 を投与し、細胞傷害効果を WST assay を用いて確認したが、明らかな抗腫瘍効果は認めなかった。さらに 10^6 nM まで濃度をあげてみたが、同様であった。TNF あるいは LPS を加えた系においても、GW9508 の各種濃度で抗腫瘍効果を認めなかった。また、GW9508 の代わりに DHA を投与した場合も、同様に抗腫瘍効果は認めなかった。他の腎癌細胞株においても検討を行ったが、各濃度で明らかな抗腫瘍効果は認めなかった。

(2) GPR120 の発現の動向の確認

WST 試験で agonist の至適濃度が同定できなかったため、まずは 10^3 nM で GW9508 を Caki-1 に投与し、投与前、投与後 24 時間、48 時間、

72 時間の細胞で Western blot を行ったが、GPR120 の発現に明らかな変化は認めなかった。濃度を $10 \sim 10^6$ nM まで変更して行ったが、同様に変化を認めなかった。他の細胞株でも有意な変化を認めなかった。

(3) agonist 長期投与による GPR120 の抗腫瘍効果の検討

Caki-1 および 769-P に GW9508 あるいは DHA を定期投与することによる長期の抗腫瘍効果を調べたが、半年を経ても細胞増殖能に明らかな変化を認めず、Western blot 法による GPR120 の発現も明らかな上昇あるいは低下傾向を認めなかった。他の腎癌細胞株においても検討を行ったが、同様に変化を認めなかった。

In vitro での抗腫瘍効果の検討で、有意な差や変化を認めるような結果が得られなかったため、腎癌症例での検討は施行していない。我々は GPR120 の持つ抗炎症化作用のその機序から、癌の進展との関連を予想し本研究の着想に至っているが、知り得る限りでは腎癌細胞における GPR120 の研究に関する報告はこれまでなされていない。そのため、agonist の至適濃度等含め参考となる data が無いためそれらを同定する作業から始めたが、次のステップにおいてある程度条件を絞り込めるような結果を見出すことが困難であった。

腎癌と GPR120 との関連性については、今後更なる研究が必要であろう。本研究では、agonist 投与による GPR120 の短期的あるいは長期的な抗腫瘍効果や発現の動向の検討を各種腎癌細胞株で行い結果的に有意な所見は得られなかったが、その抗炎症化作用に着目して癌との関連性を考案するに至った視点や様々な条件の下で行った検討の過程や結果は、腎癌や他癌種における GPR120 の關与に関する今後の研究モデル作成の一助となり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔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〕特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小幡 淳 (OBATA JUN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20570865

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：90245572

大家 基嗣 (OYA MOTOTSUGU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00213885