

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06535

研究課題名(和文) 脂肪細胞分泌エクソソームmicroRNAによる高脂肪食摂取下の前立腺癌増殖制御

研究課題名(英文) Impact of microRNAs in the exosomes secreted from adipocytes on diet-induced prostate cancer development

研究代表者

奈良 健平(Nara, Taketoshi)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00801888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食摂取および肥満下の前立腺癌発症・進展と脂肪組織、エクソソーム、microRNAの関与について解析した。当教室で行ってきたC57BL6マウスを用いた前立腺癌皮下移植モデルの欠点を克服した2種類の免疫応答性、同カロリー、異脂肪成分、正所性およびallograftマウスモデルにおいて、高動物性脂肪食は魚油食に比較し、前立腺癌の発症進展を促進することを見出した。さらに、臨床検体、細胞株において、質の高いエクソソーム抽出条件を検討し、超遠心法で脂肪組織、癌組織からエクソソームを安定的に抽出する方法を確立した。今後はエクソソームおよびmicroRNAの直接的な解析に主眼をおき、検討を継続したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高脂肪食や肥満は前立腺癌の危険因子といわれている。また、脂肪細胞は過剰に摂取したエネルギー貯蔵庫としての機能だけでなく、エクソソームなどを分泌する内分泌細胞としての機能を有することが明らかとなっている。さらにエクソソーム内のmicroRNAと癌化の関連が様々な癌種で報告されている。本研究では、高脂肪食摂取および肥満下の前立腺癌発症・進展と脂肪組織、エクソソーム、microRNAの関与を検討した。

研究成果の概要(英文)：Here we assessed the impact of microRNAs in the exosomes secreted from adipocytes on diet-induced prostate cancer initiation and development using in vitro model, in vivo model, and human tissues. Our previous models have several limitations such as immune deficient mice, different diet sources, and ectopic models. In this study, we successfully developed two different immunocompetent mouse models of lard diet-induced prostate cancer progression. Moreover, we extracted exosomes from 22Rv-1 prostate cancer cells and human adipose tissues from surgical specimens in cancer patients and confirmed size, concentration and marker expression of these exosomes.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 高脂肪食 エクソソーム microRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦男性の癌罹患率において近年 1, 2 位を争う癌であり、患者数の増加が著しい。これまでの疫学的検討から高脂肪食や肥満は前立腺癌の危険因子といわれている (Whittemore, J Natl Cancer Inst, 1995, Hsing, Am J Clin Nutr, 2007)。さらに、前立腺癌患者において、肥満は前立腺癌死および生物学的再発の危険因子であることが報告されている (Cao, Cancer Prev Res, 2011)。加えて、国内外の報告から飽和脂肪酸の多い食生活では致死的前立腺癌発症が増えることが報告されている (Pelser, Cancer Epidemio Biomarkers Prev, 2013, 国立がんセンター・予防研究グループデータホームページより)。以上より高脂肪食および肥満は前立腺癌発症・進展に関与すると考えられるが、高脂肪食や肥満による前立腺癌増殖・進展の分子生物学的機序は未だ明らかではない。

当教室ではこれまでに高脂肪食、肥満と泌尿器癌の関連をテーマに研究を続けてきた (Narita, Prostate Cancer Prostatic Dis, 2013, Ito R, Nara, et al, Plos One, 2017, Nara, Carcinogenesis, 2016, Narita, Nara, J Clin Med, 2019)。特に、マウスモデルを用いた高脂肪食および肥満下の前立腺癌増殖・進展機序解明を試み、その成果を報告してきた (Nara, Carcinogenesis, 2016. Narita, Prostate, 2008. Huang, Carcinogenesis, 2011. Huang, Prostate, 2012. Huang, Endocr Relate Cancer, 2013)。近年、癌と microRNA の関連が注目されるが、同時に食事は癌細胞内の様々な microRNA の変化を介して、その進展・増殖に関与する可能性が示唆されている (Saini, Pharm Res, 2010)。我々はこれまでの検討から高脂肪食摂取下に増殖する前立腺癌マウス xenograft モデルを用いて、高脂肪食摂取後の xenograft 腫瘍内で発現亢進する 38 個の microRNA と発現低下する 21 個の microRNA を同定した (Nara, carcinogenesis, 2016)。さらに、高脂肪食は腫瘍内の miR-130a-MET 経路を介して前立腺癌増殖に関与することを報告した (Nara, carcinogenesis, 2016)。以上より我々のこれまでの検討からも高脂肪食は microRNA を介し、癌増殖に関与している可能性があると考えられる。

一方、近年の研究で、脂肪細胞は過剰に摂取したエネルギー貯蔵庫としての機能だけでなく、エクソソームなどを分泌する内分泌細胞としての機能を有することが明らかとなっている。さらにエクソソーム内の microRNA と癌化の関連が様々な領域の癌種で報告されている (Sun T, Biomed Res Int. 2015. Vaksman O, Carcinogenesis. 2014)。最近では興味深いことに肥大した脂肪組織内エクソソーム microRNA の網羅的発現解析で TGF-beta や Wnt 経路といった前立腺癌増殖進展機序に強く関与する分子や経路に関わる microRNA が多く発現することが報告されている (Ferrante, Pediatr Res, 2015)。

以上より、我々は高脂肪食摂取により肥満が引き起こされ、肥大した脂肪組織が分泌するエクソソームの microRNA が前立腺癌増悪に関連すると仮説を立てた。我々がこれまで培った高脂肪食摂取および肥満と前立腺癌との関連を検討するための基礎的研究のノウハウと、当科ですでに有しているヒト前立腺組織、血清、脂肪組織を用いて臨床検体、細胞株、動物モデルを用いた多角的な解析から上記の証明を試みようと考えた。

2. 研究の目的

高脂肪食摂取および肥満下の前立腺癌発症・進展に脂肪組織、エクソソーム、microRNA が関与するかどうかを臨床検体、細胞株、動物モデルを用い多角的に解析する。

3. 研究の方法

1) ①動物モデルによる仮説検討:我々はこれまでに脂質の割合や種類を変えた様々な食餌とマウス前立腺癌増殖モデルの関連を検討してきた (Narita, Prostate, 2008; Huang,

Prostate, 2012)。これまでの検討は脂質成分の割合にしか注目していなかったので今回は同カロリー、同割合の脂質（45%/cal）で、脂質の種類のみ違えた、動物性脂肪群（LD）と魚油群（FOD）の2群の食餌を使用した。高脂肪食摂取により前立腺癌増殖が証明されている（Bonorden, Prostate Cancer, 2012）免疫応答性 C57BL/6 マウスを背景とし、①マウス前立腺癌正所性モデルから樹立した TRAMP-C2 (ATCC) を用いた皮下 allograft モデルと②前立腺癌が発症する Pten^{loxP/loxP}:Pb-Cre4 前立腺特異 PTEN ノックアウトマウスを用いた。両マウスとも 6-8 週程度通常食で飼育後、15 匹ずつ各食 2 群に分け飼育し、経時的に食事量、体重、allograft に関しては腫瘍径を計測する。allograft は 12 週、ノックアウトマウスは 28 週でと殺し、血液、脂肪（精巣周囲、腎周囲、皮下）、前立腺、脾臓、allograft 腫瘍を採取する。血清を用いて全身性の炎症性サイトカインプロファイルの相違を測定する。脂肪組織は病理組織学的検討と遠心処理の後、24 時間培養し上清を採取する。脂肪上清は下記と同じ手法でエクソソームの抽出を行う。抽出されたエクソソーム内の microRNA の網羅的発現解析を miRCURY LNA microRNA arrayw を用いて網羅的発現解析を行う。

2) 前立腺癌細胞株、マウス脂肪上清および臨床検体からのエクソソーム抽出と分離確認
 ヒト前立腺癌細胞株として AR および AR-7 を発現する 22Rv-1 細胞を用いた。また、22Rv-1 を低濃度からドセタキセル含有培地で約 4-5 か月培養し、IC50 の濃度でも細胞死を起さず増殖できる 22Rv-1-DR (ドセタキセル抵抗性) 細胞を樹立した。細胞上清を採取し、超遠心法でエクソソーム含有分画を分離した。上述したマウスモデルで採取した脂肪組織培養上清も同様にエクソソーム抽出に使用した。臨床検体に関しては、我々は患者同意と倫理委員会による承認のもと、前立腺癌を含む泌尿器癌患者から採取した臨床検体による組織バンク (DNA、RNA、血清、癌組織、脂肪組織) を多数有し、これまでもバイオマーカー探索や癌増悪関連分子の探索を行ってきた (Tsuchiya, J Clin Oncol, 2006, Ito R, Nara T, Plos One, 2017)。今回は特に前立腺全摘術や腎摘除術時に採取した前立腺脂肪周囲組織、frank pad とよばれる腎周囲脂肪組織を培養し、上清からエクソソーム抽出を試みた。エクソソーム分離は上述の超遠心法で行い、nanosight および電子顕微鏡で粒子サイズや濃度の測定を行い、CD63 および TSG101 の蛋白発現を western blotting で評価した。

4. 研究成果

1) 前立腺特異 PTENKO マウスにおいて、LD 群は FOD 群に比較し有意に体重が増加した (46.0 vs. 38.7 g, $p < 0.01$)。両群のカロリー摂取量に差はなかった (16.1 vs 17.9 kcal/day, $p = 0.29$)。前立腺重量は LD 群で有意に高い傾向であった (図 1)。また、浸潤性癌は LD 群のみに認められた (30%, 3 /10)。また、TRAMP-C2 allograft の平均腫瘍体積および重量は LD 群で FOD 群に比較し有意に高かった ($p = 0.04$, $p < 0.01$) (図 2)。

図1. 前立腺特異PTENKOマウスの脂肪食と前立腺の関連

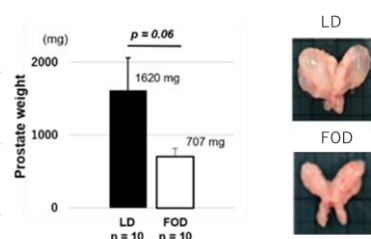
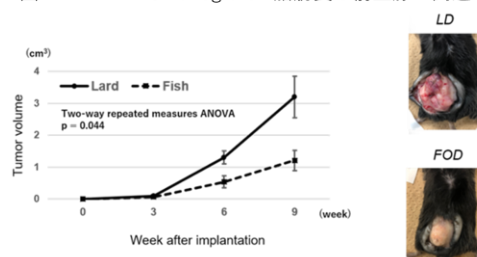


図2. TRAMP-C2 allograftの脂肪食と前立腺の関連



2) 細胞株および臨床検体からのエクソソームの抽出および分離確認

22Rv-1 および 22Rv-1-DR の培養上清からの培養上清抽出を試みた。100000 g を用いた超遠心法で、エクソソームを抽出すると、nanosight で 50-200nm サイズの小胞が抽出され、ウェスタンブロットで CD63 および TSG101 の発現を確認でき、エクソソーム分離が確認できた(図 3)。また、22Rv-1 および 22Rv-1-DR の培養上清から抽出したエクソソーム分画と共培養した前立腺癌細胞株の細胞増殖アッセイを行ったが 2 群に有意な差を認めなかった。続いて、臨床検体からのエクソソーム抽出も試みた。泌尿器癌患者における尿および血液検体を用いて上記細胞上清同様の超遠心法でエクソソームを抽出した。図 4 のように nanosight で 50-300nm の細胞外小胞が抽出され、電子顕微鏡でもエクソソームと考えられる細胞外小胞を同定できた(図 4)。本研究では特に脂肪組織からのエクソソームに注目していたため、担癌患者の手術時の脂肪組織の培養上清を超遠心し、エクソソーム抽出を行った。図 5 のようにエクソソーム抽出後の上清では CD63 は陰性である一方、CD63 陽性のエクソソーム分画が抽出することができた。現在これらの細胞培養上清、脂肪組織からのエクソソーム分画での microRNA 発現や培養上清に本分画を加えた際の前立腺癌細胞株の機能解析などを行っているところである。

図 3. 前立腺癌細胞株上清からのエクソソーム抽出

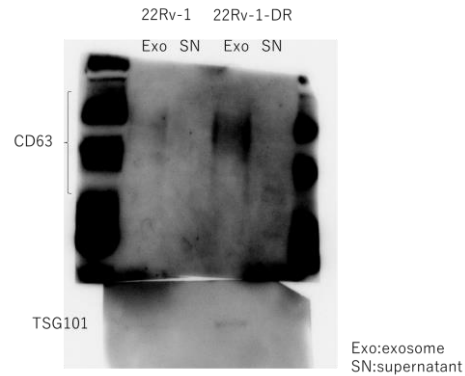


図 4. 担癌患者尿からのエクソソーム抽出

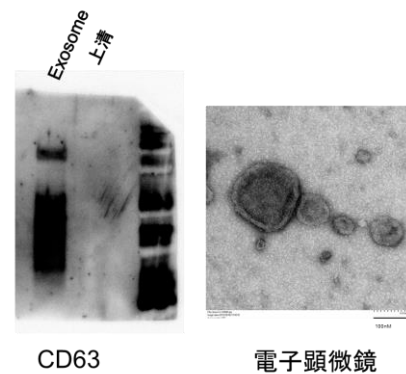
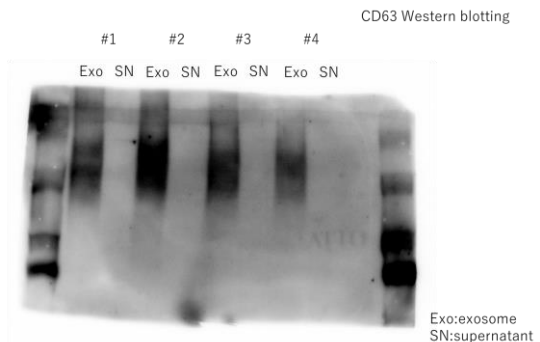


図 5. 担癌患者脂肪組織上清からのエクソソーム抽出とその確認



3) まとめ

これまでの検討から前立腺癌マウス xenograft でいくつかの microRNA 発現が上昇低下し、特に miR-130a とそれに関連するシグナル伝達経路がこの進展に参与する可能性を見出した。本結果に加え、我々の教室でこれまで見出した高脂肪食および肥満下の前立腺癌増殖進展に関連する機序の報告とともにまとめ、「Research Evidence on High-Fat Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression」という表題の総説で報告した (Narita, Nara, J Clin Med, 2019)。本報告をまとめることで、これまで文献を参考に当教室で行ってきた C57BL6 マウスを用いたヒト前立腺癌細胞株の皮下移植モデルは、正所性モデルでないこと、免疫不全状態であること、脂肪以外の食事の影響が強く出ることなどの問題点を有することが明らかであった。よって、脂肪組織と microRNA の関連を評価するにあたりより最適な動物モデル検討に立ち戻り研究を進めた。その結果、免疫応答性マウスモデルにおいて、同カロリーの食餌においても、高動物性脂肪食は魚油食に比較し、前立腺癌の発

症進展を促進する可能性を見出すことができた。2つの免疫応答性、脂肪種類のみを変化させた前立腺癌マウスモデルにおいて前立腺癌増殖が確認された。さらに、臨床検体、細胞株において、質の高いエクソソーム抽出条件を検討し、超遠心法で脂肪組織および癌組織からエクソソームを安定的に抽出する方法を確立した。今回の検討では上記研究で得られた組織を用いて、脂肪組織からのエクソソームおよびそれに内包される miRNAs のプロファイルや直接的な癌増殖への作用を検討するに至らなかったが、より質および再現性の高い実験手法を確立し、各種検体や組織細胞からのエクソソームおよび miRNAs を検討する方法がこの期間に整い、今後の研究に使用される組織、血清の蓄積が十分できた。さらに本研究結果の一部は論文および国際学会で報告を行った。今後はエクソソームおよび miRNAs の直接的な解析に主眼をおき、検討を継続したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Y, Narita S, Nara T, Mingguo H, Sato H, Koizumi A, Kanda S, Numakura K, Saito M, Inoue T, Hiroshima Y, Nanjo H, Satoh S, Tsuchiya N, Habuchi T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Impact of Nuclear YAP1 Expression in Residual Cancer After Neoadjuvant Chemohormonal Therapy With Docetaxel for High-Risk Localized Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-06844-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Narita S, Nara T, Sato H, Koizumi A, Huang M, Inoue T, Habuchi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Research Evidence on High Fat Diet Induced Prostate Cancer Development and Progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8050597.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Huang, M., Narita, S., Koizumi, A., Nara, T., Kanda, S., Numakura, K., Tsuruta, H., Saito, M., Inoue, T. and Habuchi, T.
2. 発表標題 Macrophage inhibitory cytokine-1 stimulates stromal cytokine production in high-fat diet-induced prostate cancer progression.
3. 学会等名 The 113th Annual Meeting of the American Urological Association（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小泉 淳，成田伸太郎，中西広樹，奈良健平，千葉修治，神田壮平，沼倉一幸，黄 明国，齋藤 満，井上高光，佐藤 滋，吉岡年明，羽瀨友則，佐々木雄彦
2. 発表標題 ホスホイノシタイトPIPsプロファイルと前立腺癌の関連検討
3. 学会等名 第 28 回泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Huang, M., Narita, S., Koizumi, A., Nara, T., Numakura, K., Satoh, S., Nanjo, H., Habuchi, T.
2. 発表標題 HFD leads to metabolic modification of prostate cancer promoting stroma by the upregulation of MIC-1
3. 学会等名 第 78 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Sato , Shintaro Narita , Ryohei Yamamoto , Atsushi Koizumi , Ta k etoshi Nara , Sohei Kanda , Kazuyuki Numakura Mitsuru Saito , Takamitsu Inoue , Shigeru Satoh , Toshiaki Yosh ioka , Tomonori Habuchi .
2. 発表標題 The impact of specific fat diets and obesity on prostate cancer initiation and progression using two differen t immunocompetent mouse models
3. 学会等名 EAU 2020, vertual. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考