

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390378

研究課題名(和文) 前立腺癌における脂質代謝に関する研究

研究課題名(英文) The role of lipid metabolism in prostate cancer

研究代表者

鈴木 和浩 (Suzuki, Kazuhiro)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80312891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,200,000円、(間接経費) 2,460,000円

研究成果の概要(和文)：脂質と前立腺癌の関係を多面的な基礎研究によって検討した。コレステロールを合成するメバロン酸経路のスクアレン合成酵素をコードするFDFT1の遺伝子多型が発症リスクと関連したことから、さらにFDFT1の遺伝子発現や組織学悪性度との関係が分かった。また、スタチンはLDL受容体発現を制御して前立腺癌の増殖に関係しており、スタチンによって前立腺癌細胞でも細胞内コレステロール濃度が低下し増殖抑制が生じることが分かった。さらに、インスリン抵抗性を改善するメトホルミンは糖尿病治療薬として使用されているが、IGF1受容体をダウンレギュレーションすることで前立腺癌増殖抑制作用を発揮していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Various basic studies were conducted to elucidate the effect of lipids on prostate cancer. First, squalene synthase, which is the key enzyme in mevalonate pathway is evaluated. Our previous study revealed that the SNP of FDFT1, which encodes squalene synthase, was associated with risk of prostate cancer development. The present study showed that down-regulation of FDFT1 gene expression led to significant inhibition of cancer proliferation. Furthermore, the FDFT1 gene expression levels were correlated with biological aggressiveness of prostate cancer. Next, the effect of statin was evaluated as to LDL receptor. Prostate cancer cells were the target of statin. Statin regulated both LDL receptor expression profiles and cholesterol content in the cell. These regulatory events were relevant to prostate cancer proliferation. Finally, the effect of metformin was evaluated. Metformin inhibit prostate cancer proliferation via down-regulation of IGF1-receptor.

研究分野：泌尿器科学

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：前立腺癌 脂質

1. 研究開始当初の背景

近年急増している前立腺癌の病態生理を検討することは、その自然史、診断と治療体系の確立に必須である。欧米で頻度が多い前立腺癌は脂質、特に動物性脂肪との関連が疫学的に指摘されてきた。一方、基礎研究による検討はあまりなされてこなかったが、我々の教室では脂質を生体内とくに血清中での挙動として重要なリポプロテインとしてとらえることで、前立腺癌増殖に脂質すなわちリポプロテインが密接に関連していることを報告してきた。さらに、教室で継続して研究しているテーマに家族性前立腺癌があるが、その遺伝子解析の結果から 8p23 領域に存在するスクアレン合成酵素をコードする遺伝子 FDFT1 (farnesyldiphosphate farnesyltransferase 1) の遺伝子多型が関係していることをこれまで報告してきた。スクアレン合成酵素は細胞内の重要な代謝経路であるメバロン酸系路で、コレステロール合成の方向に代謝を進める鍵となる酵素である。こうしたことから、前立腺癌と脂質代謝の関係をさらに進めることによって、前立腺癌の病態生理の理解が深まり、新規治療分子の同定などにつながると考えられる。

2. 研究の目的

以上のような背景から、前立腺癌における脂質代謝の関与を、コレステロール代謝の点、スクアレン合成酵素との関連、スタチンとの関連、さらに、インスリン抵抗性改善薬であるメトフォルミンとの関連などについて、多面的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) スクアレン合成酵素との関連

前立腺生検組織におけるスクアレン合成酵素のコード遺伝子 FDFT1 の遺伝子発現量を前立腺癌、肥大症組織で定量比較した。また、前立腺癌細胞に FDFT1 の遺伝子発現を siRNA によって発現抑制し、細胞増殖を LNCaP 細胞および PC-3 細胞で検討した。

2) スタチンと前立腺癌

前立腺癌細胞にスタチンを投与後の細胞増殖を LDL 受容体発現の関係から検討し、細胞内コレステロール量の差から検討した。さらに、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現の検討を行い、スタチンによって発現が変化する遺伝子の解析を行った。

3) メトフォルミンと前立腺癌

メトフォルミンを前立腺癌細胞 PC-3 に反応させ増殖を MTS アッセイ、浸潤・遊走能を創傷治癒 アッセイ、浸潤アッセイで検討した。ヌードマウスに PC-3 細胞を皮下移植したもでるでメトフォルミンの生体内での効果を検討した。インスリン成長因子 (IGF) -1 受容体の発現を検討し、関連を検討した。

4) アンドロゲン受容体共役因子 p120 と前立腺癌

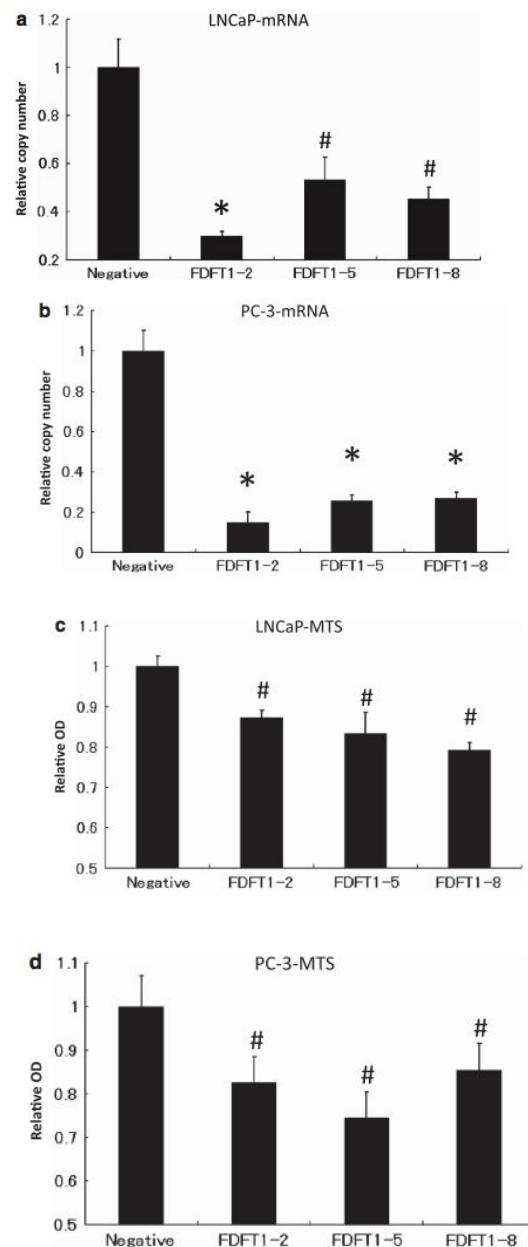
p120 のサブユニット および の遺伝子発現量を定量的 PCR 法で検討するためのアッセイ系の確立を行った。同時測定可能な定量

的 PCR 系が確立でき、生検組織の発現を比較検討した。

4. 研究成果

1) スクアレン合成酵素との関連

これまでの検討から FDFT1 のプロモータに存在する rs2645429 の A アレルが前立腺癌のリスクアレルであることを遺伝子変異アッセイ (mutagenesis) による検討で見いだした。スクアレン合成酵素の高発現がリスクを高め、癌の増殖を促進させることが予想された。スクアレン合成酵素阻害剤である TAK475 により細胞増殖が抑制されることをこれまで見いだしていた。今回の研究では、FDFT1 を siRNA によって発現抑制してその細胞増殖抑制効果を検討した。下記の図のように、遺伝子発現の低下による細胞増殖抑制効果を確認した。(a LNCaP FDFT1 mRNA, b PC-3 FDFT1 mRNA, c LNCaP MTS, d PC-3 MTS)



生検組織での FDFT1 の遺伝子発現量は、癌で発現が高く、特にグリーソンスコアが高い

症例群ではより高いことが示された。またホルモン療法を施行後の組織では発現が低下していた。以上のような追加知見から、前立腺癌のリスクとスクアレン合成酵素の関係が示唆される結果であった。

### 2) スタチンと前立腺癌

スタチンによって LNCaP 細胞は比較的増殖抑制効果に対して抵抗性を示す。一方、PC-3 細胞はアンドロゲン非依存性であるが、スタチンには感受性を示す。その背景に LDL 受容体の発現調節が関連していることをこれまで示していた。すなわち、LNCaP 細胞では正常細胞に近い LDL 受容体の調節を受け、スタチン投与によって LDL 受容体発現が亢進するが、PC-3 細胞では発現が変化しない。今回は、さらにこの受容体発現が細胞内のコレステロール量の変化を実際に伴うかを検討した。PC-3 細胞ではスタチンによって有意にコレステロール濃度が低下するが、LNCaP 細胞では変化がないことを見いだした。siRNA によって LDL 受容体遺伝子発現を低下させると、LNCaP 細胞ではコレステロール量が低下した。このことに関連して細胞増殖も有意に低下することがわかり、スタチンの効果は LDL 受容体の発現から細胞内コレステロール量を制御することに一因があることを示した。

cDNA マイクロアレーによってスタチン投与後に発現が亢進する遺伝子群を取り上げた。スタチンによる増殖抑制効果と関連する遺伝子群を見いだすためである。Annexin10 はこれまで膀胱癌、胃癌で増殖抑制効果が指摘されている。前立腺癌での検討はなく、定量的 PCR およびウェスタンブロットによって遺伝子発現、蛋白発現の変化を確認した。組織内での発現、細胞での siRNA による発現抑制、過剰発現による検討を行い、関係をさらに検討している。

### 3) メトフォルミンと前立腺癌

メトフォルミンは各種癌において増殖抑制効果が報告されている。今回、メトフォルミンの IGF1 受容体に対する効果から検討した。PC-3 細胞に対して、メトフォルミンは増殖抑制を示し、遊走能、浸潤能の低下を伴っていた。その際、IGF-1 受容体の発現抑制を示していた。ヌードマウス皮下移植腫瘍モデルによって、腫瘍重量の有意な抑制を認めた。IGF-1 受容体の発現が腫瘍内で確認されている。図コントロールおよびメトフォルミン 50mg/kg/day



### 4) アンドロゲン受容体共役 p120 因子と前立腺癌

p120 は甲状腺受容体の共役因子として同定された。群馬大学でサブユニットが同定された、アンドロゲン受容体に対する強力な共役因子であることがこれまで報告されている。今回、生検組織を用い、両サブユニットとの関係を検討した。サブユニットはエクソン 9 がないため、同時測定のために、fig1 および table1 のようなプライマー設定を行い、同時測定可能な定量的 PCR 系を確立した。

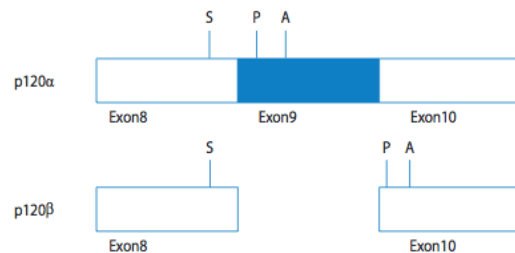


Fig. 1. Schema of p120 $\alpha$  and p120 $\beta$ . In p120 $\alpha$ , we designed an antisense primer and probe on exon 9, while probe p120 $\beta$  was designed on the junction of exons 9 and 10. S, sense primer; A, antisense primer; P, probe.

図 1: p120 の図とプライマーの位置

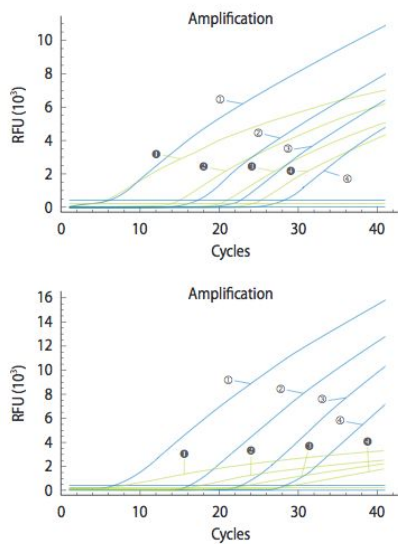
Table 1. Primer and probe sequences

Primer	Sequence
<b>p120<math>\alpha</math></b>	
Sense primer	5'-CCAATATGGAAGAGGCTA-3'
Antisense primer	5'-TCAGGAATCCCAGGAAAC-3'
Probe	5'-FAM-ACCTTGGCCG-ZEN-AGTACCCAGTCA-BkFQ-3'
<b>p120<math>\beta</math></b>	
Sense primer	5'-CCAACCACTATGGAAGAG-3'
Antisense primer	5'-GACACCTGTACTGTTCAG-3'
Probe	5'-FAM-AGCCACAGC-ZEN-CATTTCACTCTCA-BkFQ-3'
<b>18s1</b>	
Sense primer	5'-CCATCACTGCCATTAAGG-3'
Antisense primer	5'-AGGTCAATGTCTGCTTTC-3'
Probe	5'-Cy5-ACACCACATGAGCATATCTTCGGC-IAbRQ-3'
<b>18s2</b>	
Sense primer	5'-CGAAGATATGCTCATGTG-3'
Antisense primer	5'-CATCCTTCTGTCTGTCA-3'
Probe	5'-Cy5-AAGCAGACATTGACCTC-ACCAAGA-IAbRQ-3'

表 1: プライマーのシーケンス

Fig2 のように良好な検量線を与えることが可能であった。

生検組織で肥大症(BPH)、前立腺癌未治療(NTPC)、ホルモン療法後前立腺癌(PCA-ADT)を table2 のように検討した。Table3 に細胞における相対発現量をまとめた。Fig3 のようにサブユニットはホルモン療法を施行していない前立腺癌および肥大症で差を認めた。Fig4 に、および / と組織の関係を示した。このように、組織によって発現プロフィールが大きく異なることが判明した。



**Fig. 2.** Standard curves for real-time polymerase chain reaction. (A) p120α ①5.32E+8 copies, ②5.32E+6 copies, ③5.32E+4 copies, ④5.32E+2 copies, and 18s rRNA; ⑤ 6.12E+8 copies, ⑥ 6.12E+6 copies, ⑦ 6.12E+4 copies, and ⑧ 6.12E+2 copies. (B) p120β ①5.27E+8 copies, ②5.27E+6 copies, ③5.27E+4 copies, ④5.27E+2 copies, and 18srRNA; ⑤ 4.83E+8 copies, ⑥ 4.83E+6 copies, ⑦ 4.83E+4 copies, and ⑧ 4.83E+2 copies. RFU, relative fluorescence units.

図 2：定量的 PCR の検量曲線

表 2

Characteristic	BPH	NTPC	PcA-ADT
No of Pts	81	51	22
Age (yr)	64.8 (46-85)	70.1 (55-86)	68.0 (50-78)
PSA	7.28 (1-40.08)	81.1 (0.5-1,408)	386.1 (0.1-4,629)
Gleason score			
6		11	4
7		11	10
8		8	1
9		10	4
10		11	0

BPH: 前立腺肥大症

NTPC: 未治療前立腺癌

PcA-ADT: ホルモン療法施行後前立腺癌

表 2 症例の背景

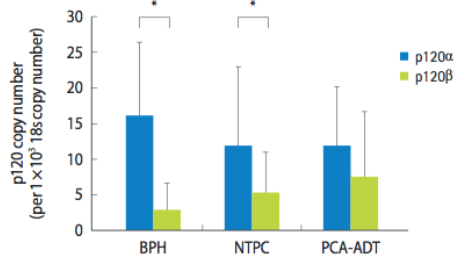
**Table 3.** Relative expression levels of p120α and p120β in prostate cancer cell lines

	p120α	p120β	β/α ratio
LNCaP	1.000±0.936 <sup>a)</sup>	0.089±0.109	0.138±0.121
LNCaPLA	3.136±5.152	0.057±0.010	0.099±0.085
DU145	0.535±0.833	0.007±0.003	0.064±0.075
PC3	0.304±0.277	0.021±0.026	0.144±0.221

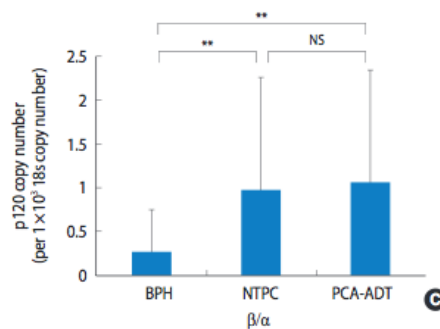
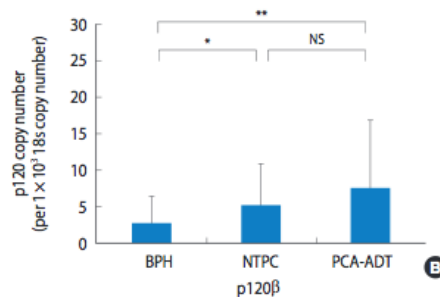
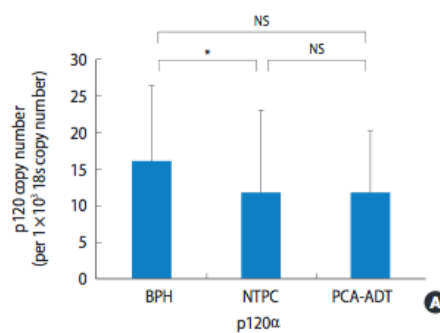
Values are presented as mean±standard deviation. Values of p120α, p120β and β/α are presented as relative ratios vs. those of p120α in LNCaP (n=3).

<sup>a)</sup>Reference.

表 3 前立腺癌細胞における p120α、p120β の発現



**Fig. 3.** Comparison of p120α and p120β among the three groups. The expression of p120α was significantly higher than those of p120β in BPH and NTPC. Bars are expressed as mean±standard deviation. BPH, benign prostatic hyperplasia; NTPC, nontreated prostate cancer; PCA-ADT, prostate cancer after androgen deprivation therapy. \*P<0.05.



**Fig. 4.** Comparison of p120α, p120β, and β/α ratios among the three groups. The amount of p120α expressed was significantly higher in BPH than in the other two groups. p120β expression was significantly higher in NTPC and PCA-ADT than in BPH. (A) p120α copy number, (B) p120β copy number, and (C) β/α ratio. Bars are expressed as mean±standard deviation. BPH, benign prostatic hyperplasia; NTPC, nontreated prostate cancer; PCA-ADT, prostate cancer after androgen deprivation therapy; NS, not significant.

図 4 各群の p120α、p120β、β/α の比較



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8件)

Muramatsu K, Matsui H, Sekine Y, Koike H, Shibata Y, Ito K, Suzuki K. Androgen receptor coactivator p120 subtype  $\beta$  is highly expressed in prostate cancer. Prostate Int. 査読あり 2013;1(1):10-5.

Arai S, Shibata Y, Nakamura Y, Kashiwagi B, Uei T, Tomaru Y, Miyashiro Y, Honma S, Hashimoto K, Sekine Y, Ito K, Sasano H, Suzuki K. Development of prostate cancer in a patient with primary hypogonadism: intratumoural steroidogenesis in prostate cancer tissues. Andrology. 査読あり 2013 Jan;1(1):169-74.

Fukuma Y, Matsui H, Koike H, Sekine Y, Shechter I, Ohtake N, Nakata S, Ito K, Suzuki K. Role of squalene synthase in prostate cancer risk and the biological aggressiveness of human prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 査読あり 2012 Dec;15(4):339-45.

Nishii M, Nomura M, Sekine Y, Koike H, Matsui H, Shibata Y, Ito K, Oyama T, Suzuki K. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone agonist reduces serum adrenal androgen levels in prostate cancer patients: implications for the effect of LH on the adrenal glands. J Androl. 査読あり 2012 Nov-Dec;33(6):1233-8.

Morikawa Y, Koike H, Sekine Y, Matsui H, Shibata Y, Ito K, Suzuki K. Rapamycin enhances docetaxel-induced cytotoxicity in a androgen-independent prostate cancer xenograft model by survivin downregulation. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり 2012 Mar 16;419(3):584-9.

Nomura M, Ito K, Miyakubo M, Sekine Y, Tamura Y, Shimizu N, Aoki S, Suzuki K. Development and external validation of a nomogram for predicting cancer probability at initial prostate biopsy using the life expectancy- and prostate volume-adjusted biopsy scheme. Prostate Cancer Prostatic Dis. 査読あり 2012 Jun;15(2):202-9.

Miyamoto S, Ito K, Miyakubo M, Suzuki R, Yamamoto T, Suzuki K, Suzuki K, Yamanaka H. Impact of pretreatment factors, biopsy Gleason grade volume indices and post-treatment nadir PSA on overall survival in patients with metastatic prostate cancer treated with step-up hormonal therapy. Prostate Cancer

Prostatic Dis. 査読あり 2012 Mar;15(1):75-86.

Ito K, Miyakubo M, Sekine Y, Koike H, Matsui H, Shibata Y, Suzuki K. Diagnostic significance of [-2]pro-PSA and prostate dimension-adjusted PSA-related indices in men with total PSA in the 2.0-10.0 ng/mL range. World J Urol. 査読あり 2013 Apr;31(2):305-11.

〔学会発表〕(計11件)

Sekine Y, Furuya Y, Kato H, Miyazawa Y, Syuto T, Arai S, Nitta T, Koike H, Matsui H, Shibata Y, Ito K, Suzuki K. Statin inhibits Progression of Human Prostate Androgen Independent Cancer Cells via Regulating miRNA Expressions. 4<sup>th</sup> Asian Pacific Prostatic Society 2014年3月21-22日 名護市

Kato H, Sekine Y, Miyazawa Y, Syuto T, Furuya Y, Matsui H, Koike H, Suzuki K. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor. 4<sup>th</sup> Asian Pacific Prostatic Society 2014年3月21-22日 名護市

Kato H, Sekine Y, Miyazawa Y, Furuya Y, Koike H, Suzuki K. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor. AACR Prostate cancer meeting. 2014/01/19 San Diego.

関根芳岳、古谷洋介、加藤春雄、宮澤慶行、新井誠二、村松和道、新田貴士、小池秀和、松井 博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩 ホルモン不応性前立腺癌における、スタチンによる腫瘍内アンドロゲン de novo 合成への影響の解明 第101回日本泌尿器科学会総会 2013年4月25日 札幌市

西井昌弘、野村昌史、関根芳岳、小池秀和、松井 博、柴田康博、羽鳥基明、伊藤一人、鈴木和浩、小山徹也 LH-RH アゴニストによる前立腺癌患者の血清副腎性アンドロゲン濃度の低下: LHの副腎に対する作用への影響 第101回日本泌尿器科学会総会 2013年4月28日 札幌市  
村松和道、松井 博、関根芳岳、小池秀和、柴田康博、伊藤一人、羽鳥基明、野村昌史、新田貴士 アンドロゲンレセプターコアクチベーター-p120のサブタイプは前立腺癌で高発現する 101回日本泌尿器科学会総会 2013年4月26日 札幌市

幌市  
柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井 博、  
本間誠次郎、鈴木和浩 前立腺癌患者に  
おける脂肪組織でのアンドロゲン代謝の  
検討 第 100 回日本泌尿器科学会総会  
2012 年 4 月 21 日 横浜市  
Suzuki K. Effects of LH-RH agonist  
on hormonal and cognitive function of  
prostate cancer patients in relation  
to testicular and adrenal androgens.  
15th International Congress on  
Hormonal Steroids and Hormones &  
Cancer symposium 2012 年 11 月 17 日  
金沢市  
Shibata Y, Arai S, Koike H, Matsui H,  
Ito K, Honma S and Suzuki K. Androgen  
production in periprostatic adipose  
tissue in prostate cancer patients.  
27th Annual EAU Congress 2012 年 2 月  
27 日 Paris, France  
Arai S, Miyashiro Y, Shibata Y, Tomaru  
Y, Kobayashi M, Honma S and Suzuki K.  
Evaluation of adrenal androgens and  
estrogen levels in the prostatic  
tissue with prostate cancer or benign  
prostatic hyperplasia. 15th  
International Congress on Hormonal  
Steroids and Hormones & Cancer 2012  
年 11 月 16 日 金沢市  
新井誠二、柴田康博、本間誠次郎、鈴木  
和浩：脂肪組織内におけるアンドロゲン  
合成酵素の遺伝子発現解析およびアンド  
ロゲン定量 日本アンドロロジー学会第  
30 回学術大会 2011/7/23 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

鈴木 和浩 (SUZUKI KAZUHIRO)  
群馬大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80312891

##### (2) 研究分担者

伊藤 一人 (ITO KAZUTO)  
群馬大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：00302472

関根 芳岳 (SEKINE YOSHITAKA)  
群馬大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00516370

松井 博 (MATSUI HIROSHI)  
群馬大学・重粒子線医学推進機構・講師  
研究者番号：40450374

小池 秀和 (KOIKE HIDEKAZU)  
群馬大学・医学部・講師  
研究者番号：90420091

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：