

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592329

研究課題名(和文)腎癌微小環境のエネルギー産生におけるFABP7の機能解明と発癌予防に向けた探索

研究課題名(英文)aaa

研究代表者

大園 誠一郎(Ozono, Seiichiro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00183228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腎癌のマーカー遺伝子の探索を進めており、その候補として脳型脂肪酸結合蛋白質(FABP7)に注目して研究を進めている。そこから長鎖不飽和脂肪酸が腎癌に与える影響についての解析を行なった。腎癌細胞株の培養中に長鎖不飽和脂肪酸を高濃度添加すると細胞増殖阻害が起こる傾向があり、 ω -3脂肪酸は ω -6脂肪酸より低濃度で細胞増殖阻害を起こす傾向があった。またFABP7を強制発現させると ω -3脂肪酸のDHAの細胞増殖阻害がより低濃度で起こった。そこからDHAの投与を増やした条件でFABP7を発現させる事は腎癌を抑制する効果が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We are searching a marker gene of kidney cancer and we pay attention to brain type fatty acid-binding protein (FABP7) as the candidate and push forward a study. We performed analysis about the influence of long chain unsaturated fatty acid on a kidney cancer thence. High concentration of long chain unsaturated fatty acid tends to suppress cell proliferation of kidney cancer cell strains, and these inhibitions tend to occur at low concentration with the ω -3 fatty acid than the ω -6 fatty acid. In addition, inhibition of cell proliferation with the DHA occurred with low concentration when cells expressed FABP7 gene. It would expect that expression of FABP7 gene would restrain cell proliferation of a kidney cancer at the condition adding the DHA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は腎癌で脳型脂肪酸結合蛋白 (FABP7) が高発現し、限局性腎癌では術前の尿中に認められた FABP7 が術後には消失することを示し、脳と腎癌以外に発現のない FABP7 は、腎癌における特異的なマーカーであることを報告してきた。(Tertani T, et al. Urology 2007;69:236-40, Domoto T, et al. Cancer Sci 2007;98:77-82)

(2) FABP7 のプロモーター解析から、治療におけるターゲットとなりえる遺伝子をいくつか同定している。(Takaoka N, et al. 2009, 2010 annual meeting of the Japanese Cancer Association)

(3) Imaging mass spectrometry (IMS) を用いて、腎癌部と正常部における脂肪酸の分布を検討し、腎癌部では、リノール酸 (LA) の蓄積が増加し、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) の蓄積が低下していることを見出した。(Takayama T, et al. 2009 annual meeting of ECCO-ESMO)

2. 研究の目的

腎癌で高頻度に発現している脳型脂肪酸結合蛋白 (FABP7) に対する多価不飽和脂肪酸の影響を検討し、腎癌の増殖進展機構を解明するとともにその予防効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株では Docosahexaenoic acid (DHA) を過剰量添加すると細胞増殖が阻害され、さらに FABP7 を過剰発現させた株ではコントロール株に比較して低い DHA 濃度で細胞増殖が阻害される事 (Cancer Res. 2000 Nov 15;60(22):6482-7) が報告されている。脂肪酸負荷により細胞増殖がどの様に影響するか腎癌細胞株で明らかでないため、FABP7 発現の有無を確認した各種腎癌細胞株を用いて、各種脂肪酸を負荷し、MTS アッセイで細胞増殖能を検討した。我々が確認したところ、腎癌細胞株には FABP7 を発現する株と発現しない株がある事が明らかになった。そこで FABP7 の発現の有無が各種脂肪酸の負荷実験の細胞増殖速度にどの様に影響するかを FABP7 発現腎癌細胞株と FABP7 非発現腎癌細胞株で比較し検討した。

(2) ノードマウスの皮下に腎癌細胞株を植え、前述の実験で細胞増殖抑制が認められた脂肪酸を経口投与し、腫瘍に与える影響について観察した。

(3) FABP7 は細胞株の浸潤能や増殖の亢進に関わっている報告 (BMC Cancer. 2006; 6: 97, Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):4443-9、Neoplasia. 2007 Sep;9(9):734-44、BMC Cancer. 2008 Sep 30;8:276) がある一方、乳癌細胞株の増殖の抑制に関わっているという報告 (Cancer Res. 1997 Aug 1;57(15):3084-91) がある。また腎癌細胞株で FABP7 が細胞株の浸潤能や増殖にどの様に機能しているかは明らかでない。それから脂肪酸負荷下での

FABP7 の機能も腎癌細胞株では明らかにされていない。そこで腎癌で発現している FABP7 蛋白質の機能を解明するため、FABP7 発現ベクターを作製後、FABP7 を発現していない腎癌細胞株に transfection し、細胞増殖能や細胞遊走能を MTS アッセイや Wound healing 法を用いて検討した。また脂肪酸負荷実験で細胞増殖に影響を与える脂肪酸を FABP7 発現株とコントロール株で比較し、FABP7 の脂肪酸負荷の与える影響を検討した。

(4) FABP7 の発現が細胞内の脂肪酸濃度を上昇させている可能性がある。そこで FABP7 発現腎癌細胞株と FABP7 非発現腎癌細胞株で上記の各々の細胞培養条件における各種脂肪酸の細胞内濃度を液体クロマトグラフィーで測定した。更に細胞内 ATP 濃度を測定した。

(5) FABP7 の発現と FABP7 のプロモーター領域に結合領域をもつ BRN2 の発現が腎癌の予後にどの様に影響するか腎癌患者の検体をを用い調査した。

4. 研究成果

(1) リノール酸または DHA 添加による腎癌細胞株での細胞増殖阻害を検討した。幾つかの腎癌細胞株と胎児の腎細胞由来の HEK293 株で行ない、どの株でも高濃度の脂肪酸添加で強い細胞増殖抑制 (多分細胞死が起こっている) が見られた。DHA に比較するとリノール酸の抑制効果は高濃度にしなければ (100 μ M 以上) 見られなかった。また細胞密度が細胞増殖抑制効果にかなり影響を与え、細胞密度が低くないと増殖抑制効果は現れ難いまたは見られなかった。また培地中の FBS も増殖抑制効果に影響を与え、FBS 添加では殆ど増殖抑制効果が見られなかった。この様な因子が影響するため細胞間の比較が難しいのだが、HEK293 株はやや増殖抑制が低濃度で現れる傾向があるが、FABP7 発現する腎癌細胞株 TUHR14TKB は他の FABP7 発現しない腎癌細胞株に比較して増殖抑制効果の現れ方に大きな違いが見られなかった。この事から長鎖不飽和脂肪酸には腎癌細胞株の増殖を抑制する効果があり、効果の強い DHA は腎癌の予防に利用出来る可能性がある。

(2) ノードマウスの皮下に腎癌細胞株を移植し、2 週間後から毎週リノール酸と DHA を経口投与した。腫瘍大きさはコントロールでは若干大きくなる傾向が見受けられるもの、DHA 投与では腫瘍の増大が起らず、リノール酸投与では投与 4 週目で若干腫瘍が増大した。この事から DHA は腫瘍の増大を抑える働きをもつ可能性がある。

(3) HEK293 株と FABP7 の発現のない腎癌細胞株 786-O に FABP7 を強制発現させた処、細胞増殖速度と細胞遊走能への FABP7 強制発現による影響は見られなかった。その一方で FABP7 を発現する腎癌細胞株

TUHR14TKB は継代を進めると FABP7 の発現を失い、低継代株と高継代株を比較すると高継代株で細胞増殖速度が速くなっていた。さらに FABP7 の発現を失った TUHR14TKB 株に FABP7 を再発現させると細胞増殖速度が遅くなり、細胞遊走能が低下した。また脂肪酸負荷実験を FABP7 再発現 TUHR14TKB 株で行った処、リノール酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)とアラキドン酸添加では FABP7 発現株はコントロール株より低濃度の脂肪酸で細胞増殖抑制が起こる一方、エイコサペンタエン酸(EPA)とドコサペンタエン酸添加では FABP7 強制発現株とコントロール株で大きな違いが見られなかった。これらの事から FABP7 発現はある腎癌細胞株の増殖を抑制する効果が見られるが、何か別の因子が加わる事によって起こっている事が推測される。また FABP7 発現はリノール酸、DHA とアラキドン酸添加による細胞増殖抑制を促進していると思われるが、その細胞増殖抑制促進効果は EPA とドコサペンタエン酸添加では見られなかった。それから -3 脂肪酸の DHA と EPA は -6 脂肪酸より低濃度で細胞増殖阻害を起こす傾向があった。(1) の結果と合わせると DHA は腎癌予防に効果があり、それは FABP7 を発現させる事によって更にその効果を高める事が期待出来る可能性がある。

(4) HEK293 株と腎癌細胞株 6 株 (ACHN、Caki-1、TUHR14TKB、OS-RC-2、786-0、769-P) の脂肪酸濃度を比較した処、-3 脂肪酸の EPA と DHA や -6 脂肪酸のリノール酸、エイコサジエン酸、ジホモ-リノレン酸、アラキドン酸、ドコサテトラエン酸とドコサペンタエン酸の濃度が HEK293 株に比較して腎癌細胞株で高かった。

更に FABP7 の発現のある TUHR14TKB 株と他の腎癌細胞株を比較すると、-3 脂肪酸の EPA と DHA や -6 脂肪酸のアラキドン酸とドコサペンタエン酸の濃度が他の腎癌細胞株と比較して TUHR14TKB 株で高かった。それから FABP7 の発現を失った TUHR14TKB 株に FABP7 を強制発現させた場合、-3 脂肪酸の EPA と -6 脂肪酸のドコサペンタエン酸の濃度が高まり、細胞当りの脂肪酸量ではアラキドン酸も上昇していた。また FABP7 発現のある TUHR14TKB 低継代株と FABP7 発現のない高継代株を比較すると、低継代株の方が ATP 濃度が高かった。

これらの結果から腎癌では幾つかの -3 と -6 脂肪酸の蓄積が高まっている可能性があり、内でも EPA の蓄積は FABP7 発現によって促進している可能性がある。また FABP7 発現株で ATP 濃度が高かった事から、FABP7 発現が ATP 濃度を高め、細胞内のエネルギー環境を良くして、アポトーシス等の細胞死を減らしている可能性がある。

我々はゲルシフトアッセイで BRN2 が FABP7 プロモーター領域に結合し、BRN2 発

現と FABP7 プロモーター活性に逆相関が見られる事を腎癌細胞株で明らかにした。そこで腎癌患者で FABP7 と BRN2 発現と予後を調べると、女性で FABP7 の発現がなく BRN2 の発現のある患者はそれ以外のグループと比較して予後が悪かった。また淡明細胞型腎癌細胞癌では他の細胞型に比較して BRN2 の発現がない傾向があった。これらの結果から、FABP7 と BRN2 発現と性別を組み合わせると予後の危険因子として上がってくる可能性があり、この事は腎癌進展への FABP7 と BRN2 の関与を示唆しており、また腎癌細胞癌が性別によって違う理由の鍵になっている可能性がある。また BRN2 の発現は腎癌細胞癌の種類によって違う可能性がある。

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8件)

Tan C, Takayama T, Takaoka N, Fujita H, Miyazaki M, Sugiyama T, Ozono S. Impact of Gender in Renal Cell Carcinoma: The Relationship of FABP7 and BRN2 Expression with Overall Survival. Clin Med Insights Oncol 8:21-7, 2014. 査読有、doi: 10.4137/CMO.S13684.

高山達也, 甲斐文文, 杉山貴之, 永田仁夫, 鶴 信雄, 古瀬 洋, 伊原博行, 栗田 豊, 麦谷荘一, 牛山知己, 鈴木和雄, 大園誠一郎. 腹腔鏡下根治的腎摘除術を施行した pT1N0M0 腎癌の長期成績, Jpn J Endourol 26:83-86, 2013. 査読有、doi: 10.11302/jsejje.26.83.

大園誠一郎. Current Organ Topics : Genitourinary Tumor 泌尿器系腫瘍 . パラダイムシフトした腎癌薬物療法、癌と化学療法 40:36-40、2013. 査読なし
高山達也, 杉山貴之, 甲斐文文, 麦谷荘一, 大園誠一郎. T1a 腎癌における再発危険因子、腎癌研究会会報 42:106、2012. 査読なし

Takayama T, Sugiyama T, Kai F, Suzuki T, Nagata M, Imanishi T, Mizuno T, Sato S, Furuse H, Mugiya S, Ozono S. Characteristics of aggressive variants in T1a renal cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 137:1653-9, 2011. doi: 10.1007/s00432-011-1040-y.

Takaoka N, Takayama T, Teratani T, Sugiyama T, Mugiya S, Ozono S. Analysis of the regulation of fatty acid binding protein 7 expression in human renal carcinoma cell lines. BMC Mol Biol 11 2:31, 2011. 査読有、doi: 10.1186/1471-2199-12-31.

Akaza H, Tsukamoto T, Fujioka T, Tomita Y, Kitamura T, Ozono S, Miki T, Naito S, Zembutsu H, Nakamura Y. Combined

immunotherapy with low-dose IL-2 plus IFN-alpha for metastatic renal cell carcinoma: survival benefit for selected patients with lung metastasis and serum sodium level. Jpn J Clin Oncol 41:1023-1030, 2011. 査読有、doi: 10.1093/jjco/hyr067.

Takayama T, Sugiyama T, Kai F, Ito T, Furuse H, Mugiya S, Ozono S. Should ipsilateral solitary adrenal involvement in renal cell carcinoma be staged as M1? Jpn J Clin Oncol 41:792-6, 2011. 査読有、doi: 10.1093/jjco/hyr031.

〔学会発表〕(計 10 件)

高岡 直央、宮崎 美紀、藤田 博美、古瀬 洋、杉山 貴之、大園 誠一郎、腎癌細胞株での脳型脂肪酸タンパク質 FABP7 の機能解析、第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会

高岡 直央、高山 達也、宮崎 美紀、藤田 博美、譚 成、大園 誠一郎、脂肪酸結合蛋白質 7 による腎癌細胞株の細胞増殖の抑制、第 72 回日本癌学会学術総会

藤田 博美、高山 達也、高岡 直央、譚 成、宮崎 美紀、甲斐 文文、杉山 貴之、大園 誠一郎、TMA を用いた免疫染色の有用性の検討、第 72 回日本癌学会学術総会

譚 成、高山 達也、高岡 直央、藤田 博美、宮崎 美紀、杉山 貴之、甲斐 文文、大園 誠一郎、腎細胞癌の全生存率における FABP7 と Brn2 の発現に性差が影響する、第 72 回日本癌学会学術総会

高岡 直央、高山 達也、宮崎 美紀、藤田 博美、寺谷 工、大園 誠一郎、腎癌細胞株 TUHR14TKB での脳型脂肪酸結合タンパク質 FABP7 の機能解析、第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会

譚 成、高山 達也、高岡 直央、藤田 博美、宮崎 美紀、甲斐 文文、杉山 貴之、麦谷 荘一、大園 誠一郎、FABP7 と Brn2 の発現の組み合わせは、腎癌の新たな予後予測因子である、第 71 回日本癌学会学術総会

Takayama T, Zaima N, Takaoka N, Miyazaki M, Tan C, Sugiyama T, Furuse H, Mugiya S, Setou M, Ozono S. Docosahexaenoic Acid Inhibits Cell Growth of Renal Cell Carcinoma. 32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie(SIU)

高岡 直央、高山 達也、杉山 貴之、甲斐 文文、寺谷 工、宮崎 美紀、藤田 博美、麦谷 荘一、大園 誠一郎、腎癌で高発現する FABP7 の腎癌細胞株での発現制御機構の解析、第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会

高岡 直央、高山 達也、杉山 貴之、甲斐 文文、宮崎 美紀、藤田 博美、寺谷 工、譚 成、麦谷 荘一、大園 誠一郎、腎癌細胞系での腎癌標識遺伝子脂

肪酸結合蛋白質 7 の機能解析、第 70 回日本癌学会学術総会

譚 成、高山 達也、高岡 直央、藤田 博美、宮崎 美紀、甲斐 文文、杉山 貴之、麦谷 荘一、大園 誠一郎、腎細胞癌における脳型脂肪酸結合蛋白質の発現、第 70 回日本癌学会学術総会

〔図書〕(計 3 件)

大園 誠一郎、文光堂、第 4 部 臨床との連携 腎癌の疫学、腫瘍病理鑑別診断アトラス「腎癌」、2013、pp208-215

大園 誠一郎、杉山 貴之、南山堂、第 3 章 分子標的薬の各論：1 受容体・シグナル伝達系阻害薬(小分子化合物)；3.mTOR 阻害薬 1)Everolimus、抗がん薬の臨床薬理、2013、pp487-490

大園 誠一郎、杉山 貴之、南山堂、第 3 章 分子標的薬の各論：1 受容体・シグナル伝達系阻害薬(小分子化合物)；3.mTOR 阻害薬 2)Temsirolimus、抗がん薬の臨床薬理、2013、pp491-493

〔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
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

大園 誠一郎(OZONO SEIICHIRO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00183228

(2)研究分担者

高山 達也(TAKAYAMA TATSUYA)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90324250

高岡 直央(TAKAOKA NAOHISA)
浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：30467229

寺谷 工 (TERATANI TAKUMI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70373404

杉山 貴之 (SUGIYAMA TAKAYUKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70444346

(3)連携研究者
該当者なし