

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592374

研究課題名(和文) 長鎖脂肪酸による前立腺癌進展の機序解明 - パルミチン酸とMIC-1の関連 -

研究課題名(英文) Diet-induced macrophage inhibitory cytokine 1 and prostate cancer progression.

研究代表者

黄 明国 (Huang, Mingguo)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60448503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、高脂肪食、高パルミチン酸食摂取前立腺がんXenograftマウスでは、Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1)分子の発現が亢進し、前立腺がんの増殖と浸潤を促進することを明らかにした。また、高脂肪食下前立腺がん進展には脂肪酸産生酵素であるFASNの発現変化が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, high-fat diet (HFD) containing Palmitic acid (PA) promoted growth and invasiveness of prostate cancer (PCa) cells through the upregulation of MIC1 expression. In addition, HFD modulates fatty acid synthase (FASN) expression, which may be an important mechanism in HFD-associated PCa progression.

研究分野：泌尿器系癌

キーワード：prostate cancer high-fat diet palmitic acid MIC-1

1. 研究開始当初の背景

近年日本で前立腺がんの増加が著しい。高脂肪食や肥満またはその代謝産物である遊離脂肪酸などが前立腺癌の進展に重要である可能性があるが、その分子メカニズムに関しては不明な点が多い。高脂肪食や肥満によって IGF-1、FGF、EGF、TGF などの細胞増殖、分化因子の発現の増強、それに伴う PI3K、ERK、MAPK などシグナル伝達経路の異常活性化が前立腺癌の進展に寄与するという説が注目を浴びている (Kalaany NY et al, Nature, 2009, Zhibu Ding et al, Nature, 2011) が、詳細に関してはまだ十分な検討がなされていない。高脂肪食またはその代謝産物である脂肪酸による複雑な生理因子のネットワークが前立腺癌の発症、進展における役割を分子レベルで解明することは、前立腺がんの治療、予防につながる標的分子を明らかにする上で重要である。

2. 研究の目的

我々はこれまで分子生物学的アプローチで前立腺癌発症・進展のメカニズム解明を目的に研究を進め、報告してきた (Kote-Jarai Z, Nat Genet, 2011, Huang M, Carcinogenesis, 2011, Narita S, Clin Cancer Res, 2009)。前立腺癌の進展に深くかかわっている可能性がある。また、日本人の疫学調査で長鎖脂肪酸のパルミチン摂取量が多いグループは少ないグループよりも前立腺癌のリスクが 1.5 倍高いとの報告がある (Kurahashi N, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008)。基礎的、臨床的研究において調査脂肪酸合成に重要である脂肪酸シンターゼが前立腺癌の oncogene である可能性が注目されている (Migita T, J Natl Cancer Inst, 2009, Nguyen PL, J Clin Oncol, 2010)。一方、マクロファージ阻害性サイトカインである MIC-1 (Macrophage inhibitory cytokine-1) はメタボリックシンドロームに深く関与する食欲制御タンパクであるのみならず、前立腺癌を含めた癌の進展に関与すると報告されている (Brown DA, Clin Cancer Res, 2009, Jhonen H, Nat Med, 2007)。今回、我々は予備実験でパルミチンが前立腺癌細胞株浸潤能を促進し、また同時にパルミチン刺激で細胞内 MIC-1 が上昇することを見いだした。さらに、高脂肪食摂取 LNCaP Xenograft マウス血清中の MIC-1 は低脂肪食群より有意に高値であった。高脂肪食、肥満状況下で産生増強されたパルミチン酸によって前立腺癌が進展する可能性がある。しかし、今までこのような検討は皆無で、加えてパルミチン酸による MIC-1 産生メカニズムに関しては未だに報告がない。今回、我々は高脂肪食の重要な代謝産物であるパルミチン酸による MIC-1 の発現増強が前立腺癌の増殖と浸潤に及ぼす影響を検討し、その分子機序を明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

In vitro でパルミチン摂取による MIC-1 シグナルの活性化亢進および前立腺癌増殖、進展と経路阻害によるこれらの抑制を評価する。臨床検体では MIC-1 と肥満、前立腺癌の悪性度や予後の評価を施行する。マウスモデルで上記の確認と経路阻害による癌抑制効果を検討する。

1. 前立腺癌増殖と浸潤におけるパルミチン酸と MIC-1 の役割と下流シグナルの解析

パルミチン酸の直接投与、パルミチン酸食摂取マウス血清を用いて培養した前立腺癌細胞株 (PC3、DU145、LNCaP、C4-2) および良性前立腺細胞 (PNT1B, BPH-1) における MIC-1 関連遺伝子、タンパクの発現を定量 RT-PCR、ウェスタンブロットで検討する。

パルミチン酸の直接投与、パルミチン酸食摂取マウス血清を用いて培養した前立腺癌細胞株 (PC3、DU145、LNCaP、C4-2) および良性前立腺細胞 (PNT1B, BPH-1) における前立腺癌増殖・浸潤・遊走能を細胞増殖アッセイ、Matrigel Invasion Assay 法、wound healing assay 法で検討する。

異なったパルミチン酸濃度、および MIC-1 を recombinant MIC-1 や siRNA (siMIC-1) を用いて活性を on-off し、上記細胞株の機能解析 (転移、浸潤、増殖能) を行う。MIC-1 特異的な siRNA は (QIAGEN 社) 確認済である。

2. マウス Xenograft を用いたパルミチン酸摂取による MIC-1 活性化及びがん増殖、浸潤能の検討

MIC-1 siRNA、MIC-1 cDNA が組み込まれているウイルスベクターを用いて MIC-1 阻害 LNCaP 細胞、MIC-1 高発現 LNCaP 細胞株を樹立。この細胞をヌードマウスに移植し、パルミチンと MIC-1 が癌増殖能における役割とその関連するシグナルを探索する。

1. xenograft 腫瘍径の測定

2. 血清 MIC-1 の測定

3. 採取した xenograft 内の MIC-1 関連遺伝子、タンパク発現解析

c. ヒト前立腺癌サンプルを用いた MIC-1 の発現と機能解析

1. 前立腺組織における MIC-1 発現と臨床因子 (病理学的悪性度、予後、BMI、胸囲) の関連。

2. 患者血清中の可溶性 MIC-1 発現と臨床因子 (病理学的悪性度、予後、BMI、胸囲) の関連。

3. MIC-1 遺伝子多型と肥満の関連、前立腺癌の予後との関連。

4. 研究成果

我々は、初めて長鎖脂肪酸パルミチン (PA) 刺激で前立腺癌細胞 LNCaP、PC-3、DU145 で

の MIC-1 の遺伝子発現の亢進を確認し、さらに PA 刺激で PC-3, DU145 細胞内と細胞培養液中の MIC-1 の産生が亢進することを確認した。LNCaP xenograft 解析では、高脂肪食 (HFD) 摂取群では低脂肪食群 (LFD) より癌の大きさ (2569.9 ± 151.1 vs 2010.3 ± 120.7 mm³, $p = 0.025$)、癌組織中の脂肪酸量 (172.2 ± 43.9 vs 119.6 ± 17.8 nMol/mg, $p < 0.001$)、血清中の MIC-1 濃度 (24155.2 ± 4281.6 vs 18343.8 ± 7019.9 pg/mL, $p = 0.012$) は有意に高く、さらに血清 MIC-1 は癌の大きさと相関していた ($r = 0.642$, $p = 0.022$)。マウス血清を用いた細胞増殖アッセイでは、HFD 群はコントロール群より有意に LNCaP, C4-2 細胞の増殖と浸潤を促進し、リコンビナント MIC-1 (rMIC-1) も同様に前立腺癌細胞の増殖と浸潤を促進した。さらに、HFD 血清、rMIC-1 によって ERK シグナルが活性化されることを確認している。健常者 54 人と前立腺癌患者 168 人の血清 MIC-1 を比較では、前立腺癌患者血清 MIC-1 は健常者に比べて有意に高く (1154.2 ± 889.9 vs 784.0 ± 299.6 pg/mL, $p = 0.002$)、前立腺癌患者血清 MIC-1 は、Gleason score (GS) が高くなるにつれて有意に高く ($p < 0.01$)、患者の肥満度と関連している可能性が示唆された ($p = 0.087$)。以上の結果より、MIC-1 は高脂肪食や肥満による前立腺癌進展に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、高脂肪食又はその代謝産物であるパルミチン酸による MIC-1 の亢進が前立腺癌の進展を促進することを明らかにした。

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7件)

1. Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov.* 2015 Apr 16. pii: CD-14-1329.

2. Kanda S, Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Huang M, Chiba S, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Satoh S, Saito S, Ohyama C, Arai Y, Ogawa O, Habuchi T. Effects of functional genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene on prostate cancer risk and survival. *Int J Cancer.* 2015 Jan 1;136(1):74-82.

3. Numakura K, Satoh S, Tsuchiya N, Saito M, Nara T, Huang M, Tsuruta H, Akihama S,

Inoue T, Narita S, Habuchi T. De novo renal cell carcinoma in an allograft kidney treated with nephron-sparing surgery: a case report. *Prog Transplant.* 2014 Dec;24(4):328-31.

4. Numakura K, Tsuchiya N, Akihama S, Inoue T, Narita S, Huang M, Satoh S, Habuchi T. Successful mammalian target of rapamycin inhibitor maintenance therapy following induction chemotherapy with gemcitabine and doxorubicin for metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014 Jul;8(1):464-466.

5. Chiba S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Narita S, Inoue T, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Huang M, Satoh S, Habuchi T. Functional mononucleotide repeat polymorphism in the promoter region of HGF is associated with risk and malignant aggressiveness of bladder cancer. *Int J Oncol.* 2014 Mar;44(3):678-84.

6. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced macrophage inhibitory cytokine 1 promotes prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Dec 16;21(1):39-50.

7. Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Saito M, Numakura K, Huang M, Hatakeyama S, Satoh S, Saito S, Ohyama C, Arai Y, Ogawa O, Habuchi T. Insulin-like growth factor-1 genotypes and haplotypes influence the survival of prostate cancer patients with bone metastasis at initial diagnosis. *BMC Cancer.* 2013 Mar 25;13:150.

[学会発表](計5件)

1. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced alteration of fatty acid synthase promotes prostate cancer progression. 第73回日本癌学会 2014. 9. 25 - 27. 横浜

2. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced alteration of fatty acid synthase promotes prostate cancer progression. 第109回米国泌尿器科学会、2014. 5. 16 - 21. オランダ.

3. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced alteration of fatty acid

synthase promotes prostate cancer progression. 第 102 回日本泌尿器科学会 2014 . 4 . 25 - 27 神戸

研究者番号 : 70282176

4. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced macrophage inhibitory cytokine 1 promotes prostate cancer progression. 第 72 回日本癌学会 2013 . 10 . 3 - 5 . 横浜
5. Huang M, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced macrophage inhibitory cytokine 1 promotes prostate cancer progression. 第 101 回日本泌尿器科学会 2013 . 4 . 25 - 28 札幌

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

黄明国 (Huang Mingguo)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 60448503

(2) 研究分担者

成田伸太郎 (Narita Shintaro)
秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 40396552

土谷順彦 (Tsuchiya Norihiko)
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授