

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08403

研究課題名(和文) 外因性リガンドとしての脂肪酸結合蛋白FABP4の前立腺癌増殖における意義

研究課題名(英文) Role of fatty acid binding protein 4 (FABP4) as an exogenous ligand, on growth of prostate cancer cells

研究代表者

上原 久典 (UEHARA, Hisanori)

徳島大学・病院・教授

研究者番号：30263809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：疫学的に肥満は前立腺癌進展と関連することが知られている。その機構を調べるためにアディポカインの1つであるFatty acid binding protein 4 (FABP4)に注目して研究を行った。今回の研究で、FABP4が前立腺癌細胞の細胞膜に存在するlipolysis stimulated lipoprotein receptor との相互作用により、PI3K/Akt 経路の活性化や細胞増殖に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Epidemiologically, obesity is known to be associated with prostate cancer development. In order to investigate its mechanism, we focused on Fatty acid binding protein 4 (FABP4) which is one of adipokines. In this study, it was revealed that FABP4 is involved in activation of PI3K / Akt pathway and cell proliferation by interaction with lipolysis stimulated lipoprotein receptor present on the cell membrane of prostate cancer cells.

研究分野：癌の浸潤・転移

キーワード：前立腺癌 肥満 FABP4 LSR

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満とがんの関連を指摘した多くの疫学的データが報告されている。前立腺癌ではレプチンや IL-6 といったアディポカインが前立腺癌細胞の進展に関与することが報告されている。

Fatty acid binding protein 4 (FABP4)は脂肪酸結合タンパクファミリーに属しており、アディポカインのひとつと考えられている。我々はこれまでに外因性の FABP4 が前立腺癌細胞の浸潤を促進すること、および PI3K/Akt 経路を活性化することを明らかにした。

その後の質量分析による解析により、FABP4 がリガンドとして細胞膜に存在する lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) と結合し、シグナル伝達に関与している可能性が考えられた。FABP4 と LSR の結合に関してはこれまで報告されておらず、その作用やシグナル伝達への影響について調べることで肥満に関連した前立腺癌の進展機序の解明と新規治療法の開発に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌細胞の細胞膜に存在する LSR と外因性の FABP4 の結合を介した前立腺癌細胞のシグナル伝達機構を明らかにするために、以下の点を明らかにすることを目的とする。

1) ヒト前立腺癌細胞において、LSR のノックダウンを行うと、*in vitro*、および *in vivo* での増殖、浸潤にどのような影響が認められるのかについて。

2) 我々は、これまでに FABP4 と脂肪酸の結合を阻害する FABP4 インヒビターを経口投与することにより、ヌードマウスに移植された前立腺癌細胞の増殖が抑制されることを報告しているが、LSR をノックダウンした細胞では、より強い腫瘍抑制効果が認められるかどうかについて。

3. 研究の方法

・細胞：ヒト前立腺癌細胞 DU145, PC-3
・質量分析：DU145 に FABP4 を添加し、膜画分を抗 FABP4 抗体を用いて免疫沈降し、その溶解物を電気泳動 (SDS-PAGE) した。これを銀染色し、コントロールと比較し、FABP4 を添加した細胞より得られたサンプルにのみ認められたバンドを切り出し、質量分析を行った。

・フローサイトメトリー解析：DU145 に FITC 標識した FABP4 と抗 LSR 抗体を添加し、FABP4 の結合が阻害されるかどうかをフローサイトメトリーによって解析した。

・免疫沈降：FABP4 と LSR の混合物を抗 FABP4 抗体を用いて免疫沈降し、その沈降物について、抗 LSR 抗体を用いて western blotting を行った。また、その逆の抗 LSR 抗体による免疫沈降と抗 FABP4 抗体を用いた western

blotting も行った。

・siRNA によるノックダウン：siRNA により DU145 細胞の LSR をノックダウンし、(1) FABP4 を添加後、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体を用いた western blotting、(2) FITC 標識した FABP4 を添加し、フローサイトメトリー解析、を行った。

・ヒト前立腺癌細胞の LSR 低発現株の作製：DU145 細胞に発現ベクターを導入し、LSR 低発現株を作製した。

・骨髄間質細胞とヒト前立腺癌細胞の共培養：balb/c マウスの骨髄から骨髄間質細胞を採取し、DU145 あるいは PC-3 細胞と cell culture insert を用いた二層培養、あるいは骨髄間質細胞の上から前立腺癌細胞を播種し、両者が混在する状態での培養を行った。72 時間後に培養上清を採取し、FABP4 の量を ELISA 法で測定した。

・LSR 低発現株の xenograft モデルを用いた FABP4 inhibitor 腫瘍抑制効果の検討：ヌードマウスの前立腺、あるいは脛骨に DU145 細胞の LSR 低発現株、あるいはコントロール細胞を移植した。さらに、これらのマウスを FABP4 inhibitor 投与群と vehicle 投与群に分け、前立腺への移植群は 8 週間、脛骨への移植群は 6 週間、連日投与を行った。その後、マウスを安楽死させ、前立腺、あるいは脛骨を採取し、ホルマリンで固定パラフィン包埋標本作製した。HE 標本で腫瘍の形成頻度と、骨病変については最大断面での面積を測定し、抗 LSR 抗体、抗 ki-67 抗体、抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) LSR の PI3K/Akt 経路への関与の確認
質量分析により、前立腺癌細胞の細胞膜表面に存在する LSR が FABP4 と何らかの相互作用を起こす候補分子と考えられた。そこで、LSR と FABP4 の相互作用を確認するために、実験を行い、以下の結果を得た。

LSR を発現している DU145 細胞に FITC 標識した FABP4 を添加して、フローサイトメトリー解析を行うと、容量依存性に蛍光強度が増加し、抗 LSR 抗体を同時に添加することにより、蛍光強度が減少した。

FABP4 タンパクと LSR タンパクの混合物を抗 FABP4 抗体、あるいは抗 LSR 抗体で免疫沈降すると、その沈降物についてそれぞれ、LSR、FABP4 由来のバンドが認められた。

DU145 細胞に FABP4 を添加することにより、Akt のリン酸化が起こるが、siRNA によって LSR をノックダウンすると、FABP4 による Akt のリン酸化が抑制された。

siRNA により LSR をノックダウンした DU145 細胞に FITC 標識した FABP4 を添加して、フローサイトメトリー解析を行うと、コントロールの細胞と比べて蛍光強度の減少が認められた。

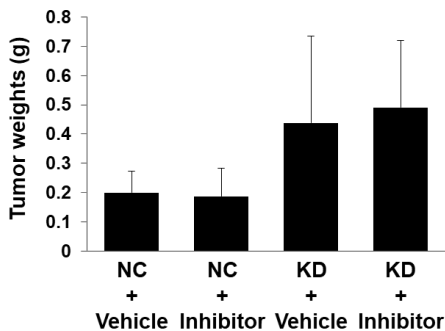
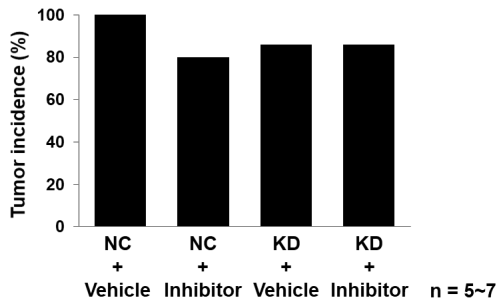
この結果より、LSR が FABP4 に関連したシグナル伝達に関与していることが推測さ

れた。

(2) ヒト前立腺癌細胞の LSR 低発現株の作製
DU145 細胞に発現ベクターを導入し、LSR 低発現株、およびその negative control となる細胞株を作製した。in vitro では、LSR 低発現株、negative control の細胞株、ともに増殖に差は認められなかった。

(3) ヒト前立腺癌細胞のヌードマウスへの同所移植モデルを用いた FABP4 inhibitor 投与と LSR ノックダウンの効果の検討

DU145 の LSR 低発現株、あるいはコントロール細胞株をヌードマウスの前立腺に移植後、8 週間連続で FABP4 inhibitor (50mg/kg) あるいは vehicle の経口投与を行った。その後、マウスを安楽死させ、前立腺に形成された腫瘍の重量と腫瘍発生頻度を検索した。棒グラフに示すように、腫瘍の形成頻度に有意差は認められず、腫瘍重量は LSR 低発現株のほうが有意に増加していた。



免疫染色では低発現株の腫瘍は LSR の発現が低下していた。ki-67 の免疫染色による増殖能の検索では、LSR 低発現株の腫瘍で高い増殖能がみられ、重量増加を裏付ける結果となった。LSR 低発現株を移植した群で腫瘍頻度や腫瘍重量の低下が認められることを予想していたが、それとは逆の結果になった。ヒトでは前立腺周囲は脂肪組織で覆われており、前立腺は、恒常的に高い濃度の FABP4 に暴露していると考えられるが、マウスでは、前立腺周囲に脂肪組織は乏しく、FABP4 の影響は少ないのかもしれない。また、前立腺には、LSR を介して細胞増殖を抑制するような何らかの因子が存在し、LSR の発現が低下することにより、その作用が働かなくなった可

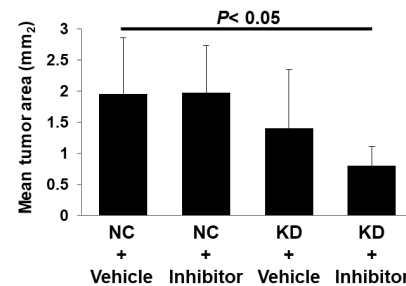
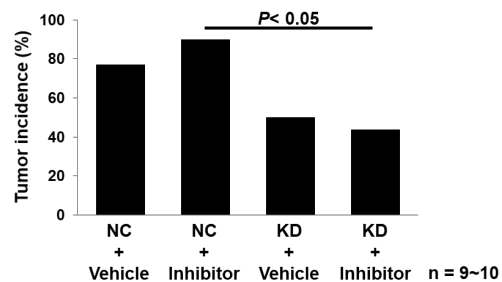
能性もある。FABP4 inhibitor も有意な抑制効果は示さなかったが、前立腺まで十分な量が到達しなかった可能性がある。

(4) 骨髄間質細胞とヒト前立腺癌細胞の共培養による FABP4 産生の増加

balb/c マウスの骨髄から採取された骨髄間質細胞と、DU145 あるいは PC-3 細胞を 72 時間共培養後、培養上清中のマウス FABP4 量を ELISA 法で測定した。cell culture insert を用いた二層培養では、FABP4 量は、骨髄間質細胞のみを培養した場合と同程度であった。一方、骨髄間質細胞と前立腺癌細胞が混在・接触する状態で培養を行うと、FABP 量の有意な増加が認められた ($P < 0.00001$)。この結果から、骨に転移した前立腺癌細胞が骨髄間質細胞との相互作用により、骨髄間質細胞からの FABP4 分泌を促進し、高濃度の FABP4 が存在する微小環境を形成する可能性が示唆された。

(5) ヒト前立腺癌細胞のヌードマウス脛骨への移植モデルを用いた FABP4 inhibitor 投与と LSR ノックダウンの効果の検討

DU145 の LSR 低発現株、あるいはコントロール細胞株をヌードマウスの脛骨に移植後、6 週間連続で FABP4 inhibitor (50mg/kg) あるいは vehicle の経口投与を行った。その後、マウスを安楽死させ、前立腺に形成された腫瘍の重量と腫瘍発生頻度を検索した。棒グラフに示すように、腫瘍の形成頻度、腫瘍の面積ともに LSR 低発現株を移植した群で優位に低下しており、FABP4 inhibitor を投与した群でより強い腫瘍抑制効果が認められた。



ki-67 の免疫染色による増殖能の検索では、LSR 低発現株の腫瘍で増殖能が有意に低下しており、cleaved caspase-3 陽性細胞が増加傾向にあった。骨微小環境では前立腺と異なり、高濃度の FABP4 が存在している可能性が

あり、腫瘍増殖もそれに依存しているために LSR の発現低下や FABP4 inhibitor が腫瘍抑制に有効に働いたのかもしれない。

<引用文献>

Onuma M, Bub JD, Rummel TL, Iwamoto Y. Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem.* 278(43): 42660-42667, 2003

Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 57(1): 141-146, 1997

Uehara H, Takahashi T, Oha M, Ogawa H, Izumi K. Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression. *Int J Cancer.* 135(11): 2558-2568, 2014

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1件)

Uehara H, Kobayashi T, Matsumoto M, Watanabe S, Yoneda A, Yoshimi B. Adipose tissue: Critical contributor to the development of prostate cancer. *J Med Invest.* 65(1.2): 9-17, 2018. doi: 10.2152/jmi.65.9. (査読有)

[学会発表](計2件)

上原 久典

骨における前立腺癌細胞の増殖への lipolysis stimulated lipoprotein receptor の関与

第105回日本病理学会総会

平成28年5月12 - 14日、仙台

上原 久典、高橋 徹行

脂肪細胞由来の FABP4 による前立腺癌細胞の骨内増殖促進 (シンポジウム「骨転移 - Bedside to Bench」) 第24回日本がん転移学会学術集会・総会

平成27年7月24日、大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上原 久典 (UEHARA, Hisanori)

徳島大学・病院・教授

研究者番号：30263809

(2)研究分担者

高橋 徹行 (TAKAHASHI, Tetsuyuki)

武蔵野大学・付置研究所・講師

研究者番号：00403692