

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 2日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791464

研究課題名（和文）高脂肪食、肥満による前立腺癌増殖進展における TWEAK-Fn14 シグナルの役割

研究課題名（英文）Role of TWEAK-Fn14 signaling under high-fat diet or obesity on prostate cancer progression

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

研究成果の概要（和文）：

近年、日本での前立腺癌の増加は著しい。その疫学的背景に高脂肪食や肥満が前立腺癌の発症や進展に関与していることを示唆する基礎的、臨床的データは多いが、その分子生物学的なメカニズムは未だ明らかではない。高脂肪食によって IGF-1、FGF、EGF などの細胞増殖因子の発現の増強、それに伴う PI3K、ERK 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）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。

我々は前立腺癌細胞株 xenograft モデルを用いて高脂肪食が前立腺癌増殖を促進することを証明し、その際、網羅的遺伝子発現解析により、成長因子、サイトカインを介した IGF-IGFIR, TWEAK-Fn14 等のシグナル伝達経路の受容体が前立腺癌増殖時に高発現していることを報告した(Narita S et al, *Prostate*, 2008)。

本研究で、我々は初めて前立腺癌細胞、前立腺癌モデルマウス、さらにヒト前立腺癌組織を用いて前立腺癌の増殖、浸潤、apoptosis における Fn14 の役割を明らかにした。Fn14, TWEAK 発現は、ホルモン応答性前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞に低発現、ホルモン不応性前立腺癌細胞株 PC-3, DU145 細胞に高発現していた。rTWEAK 刺激によって、PC-3 細胞の Fn14 発現が時間依存的、濃度依存的に増強された。Fn14 siRNA, rTWEAK による機能解析によって、TWEAK-Fn14 シグナルが PC-3, DU145 細胞の浸潤能、遊走能を制御していることが確認された。また、Fn14 の発現は、PC-3, DU145 細胞の apoptosis に関連していることが示された。さらに、Fn14 安定高発現 PC-3/Fn14 細胞は PC-3/Mock 細胞より増殖能が有意に亢進した。Fn14 siRNA 処理した PC-3 細胞は、Control siRNA 処理した PC-3 細胞より MMP-9 の遺伝子発現、活性化 MMP-9 の産生が有意に低下した。一方、rTWEAK 刺激によって、PC-3 細胞は、MMP-9 の遺伝子発現、活性化 MMP-9 の産生が有意に亢進した。PC-3/Fn14 細胞は PC-3 細胞に比較し、4 倍くらいの浸潤能を示し、また MMP-9 特異的な阻害剤の処理によって浸潤能が有意に低下した。PC-3/Fn14 Xenograft は、PC-3/Mock Xenograft より有意に大きく、また Fn14, MMP-9 の発現も有意に亢進していた。癌細胞の横隔膜浸潤モデルの解析では、PC-3/Fn14 は、PC-3/Mock に比べて有意に高い浸潤能を示した。112 例の前立腺癌全摘標本における Fn14 の解析では、Fn14 高発現群 (12 例、10.7%) では、中発現 (61 例、54.5%)、低発現 (39 例、34.8%) より非再発生存期間が有意に短かった。

今回の研究で、Fn14 はホルモン不応性前立腺癌細胞に高発現しており、また Fn14 の発現は MMP-9 の発現を制御し、前立腺癌細胞の増殖、浸潤に重要であることが明らかになった。さらに、臨床検体の検討では Fn14 の発現は前立腺癌患者の予後に関与する可能性が示唆された。Fn14 は前立腺癌の増殖、浸潤に重要であり、前立腺癌の治療のターゲットになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

In Japan, prostate cancer (Pca) morbidity and mortality have been increasing, presumably due to changes in dietary habits, higher rates of screening and an expanding elderly population. Recent studies shown that high-fat diet (HFD) active PI3K and MAPK by the modulate many important growth factors including IGF-1, FGF and EGF in prostate cancer (Kalaany NY et al, *Nature*, 2009).

Recently we demonstrated HFD influence progression of prostate cancer, and found that many receptors of growth factors and cytokine implicated progression of prostate cancer in the prostate cancer xenograft (Narita S et al, *Prostate*, 2008).

In this study, we investigated the role of Fn14 on prostate-cancer progression using prostate cancer cells, LNCaP prostate cancer xenograft model and human prostate cancer samples. Fn14 and its ligand TWEAK were highly expressed in the androgen independent prostate cancer cells, and Fn14 was shown to modulate expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and influence the proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. Clinically, high expression of Fn14 was significantly associated with higher PSA recurrence rate in patients who underwent radical prostatectomy.

In conclusion, the overexpression of Fn14 may contribute to multiple malignant cellular phenotypes associated with prostate cancer progression, in part via MMP-9. TWEAK-Fn14 signaling may be a novel therapeutic target of prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の疫学的背景に高脂肪食や肥満が前立腺癌の発症や進展に關与していることを示唆する基礎的、臨床的データは多いが、その分子生物学的なメカニズムは未だ明らかではない。高脂肪食によって IGF-1、FGF、EGF などの細胞増殖因子の発現の増強、それに伴う PI3K、ERK 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) 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。

我々は前立腺癌細胞株 xenograft モデルを用いて高脂肪食が前立腺癌増殖を促進することを証明し、その際、網羅的遺伝子発現解

析により、成長因子、サイトカインを介した IGF-IGFIR, TWEAK-Fn14 等のシグナル伝達経路の受容体が前立腺癌増殖時に高発現していることを報告した (Narita S et al, *Prostate*, 2008)。

TNFファミリーに属するサイトカイン TWEAKとその膜受容体である Fn14 によるシグナルは、NF κ B, MAPKを介して、様々な生命現象に關与していると考えられ、特に近年、血管新生、浸潤能、アポトーシスなどの機序を介して幾つかの癌（乳癌や神経膠腫等）に關与していることが報告されている

(Winkles JA. *Nat Rev*. 2008)。また、興味深いことに、TWEAK-Fn14 シグナルが脂肪細胞の分化に抑制の働きをするとの報告もあり (Burkly LC et al, *Cytokine*, 2007)、肥満や高脂肪食摂取後の生体反応にこの経路が關与している可能性がある。このように TWEAK-Fn14 シグナル伝達経路は高脂肪食摂取や肥満細胞で活性化され、前立腺癌増殖や転移能増強に關与している可能性が示

唆されるが、このような検討は皆無で、加えてTWEAK-Fn14 シグナル伝達経路と前立腺癌との関与は未だ報告がない

2. 研究の目的

1) ヒト前立腺癌細胞株を用いた高脂肪食血清培養中のTWEAK-Fn14 発現・機能解析:

Invitro において高脂肪食摂取がTWEAK-Fn14 シグナルを活性化するかどうか、またTWEAK-Fn14 シグナルが前立腺癌増殖、進展に関与するかどうかを検討する。高脂肪食摂取患者もしくはマウス血清で刺激し、その発現変化や活性変化を検討する。また我々はすでにsiRNAによるFn14ノックダウンに成功しており、ベクターを用いてFn14高発現LNCaP細胞株(LNCaP-Fn14)を樹立している。これらを用いて増殖能、浸潤能など機能解析を行う予定である。

2) ヒト検体を用いたTWEAK-Fn14 の発現と臨床因子との関連検討:

我々は約200例の前立腺癌患全摘標本とその患者臨床因子をデータベースとして所有している。これらのデータベースと組織標本を用いて、TWEAK-Fn14 シグナル伝達経路関連遺伝子の免疫染色を行い、臨床因子(特にBMI,胸囲)との関連を検討する。

3) 高脂肪食マウスxenograftモデルを用いたTWEAK-Fn14の活性化および浸潤能、転移能、増殖能の検討:

LNCaP-Fn14 細胞をヌードマウスに皮下移植し、高脂肪食を与えると低脂肪食に比較して増殖、浸潤能がどのように変化するかを検討する。また、同モデルを用いて形成された腫瘍からmRNAやタンパクの抽出、免疫組織染色を行い、TWEAK-Fn14の関連遺伝子、タンパクの発現変化を検討する。

4) In vivo imaging system(IVIS)を用いた前立腺癌マウス骨転移モデルにおけるtargeted therapyの効果、低脂肪食の転移抑制効果

我々は以前よりin vivo imaging systemを用いたマウス膀胱癌正所性モデルや腎癌骨転移モデルを用いて実験を行ってきた。今回は前立腺癌細胞株の左心室直接注入により前立腺癌骨転移モデルを作成し、低脂肪食およびTWEAK-Fn14シグナル遮断による転移抑制効果と低脂肪食による転移抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

1) ヒト前立腺癌細胞株を用いた高脂肪食血清培養中のTWEAK-Fn14 発現・機能解析:

- A. 各種前立腺癌細胞株(PC3、DU145、LNCaP)におけるTWEAK-Fn14の発現と高脂肪食摂取患者血清培養による

TWEAK-Fn14の発現変化を定量RT-PCR、ウェスタンブロットで検討する。

- B. siRNA(siFn14)を用いたKnockdown modelによる機能解析(転移、浸潤、増殖能)を行う。Fn14特異的なsiRNAは(QIAGEN社)確認済である。Matrigel Invasion Assay法、wound healing assay法でInvitro浸潤能、転移能を検討し、MTT法で増殖能を検討する。
- C. 上述の方法でrecombinant TWEAK、Fn14高発現細胞株を用いた機能解析(転移、浸潤、増殖能)を行う。
- D. 高脂肪食摂取患者もしくはマウス血清培養による前立腺癌細胞株の機能解析(転移、浸潤、増殖能)を行う。

2) ヒト検体を用いたTWEAK-Fn14の発現と臨床因子との関連検討:

- A. 前立腺組織におけるTWEAK-Fn14の発現と臨床因子(特にBMI,胸囲)の関連検討を行う。
- B. 前立腺癌患者血清中の可溶性TWEAKの発現と臨床因子(特にBMI,胸囲)の関連検討を行う。
- C. TWEAK、Fn14遺伝子多型と肥満の関連、前立腺癌の予後との関連検討を行う。
(当科での前立腺癌患者DNAバンクを用いて施行)

3) 高脂肪食マウスxenograftモデルを用いたTWEAK-Fn14の活性化および浸潤能、転移能、増殖能の検討:

我々はすでにsiRNAによるFn14ノックダウンに成功しており、ベクターを用いてFn14高発現LNCaP細胞株(LNCaP-Fn14)を樹立している(Fig4)。前立腺癌細胞株LNCaPにFn14高発現するLNCaP-Fn14細胞をヌードマウスに移植し、高脂肪食を与えると低脂肪食に比較して癌の浸潤能、転移能、増殖能などがどのように変化するか研究する。

4. 研究成果

今回の研究で、Fn14はホルモン不応性前立腺癌細胞に高発現しており、またFn14の発現はMMP-9の発現を制御し、前立腺癌細胞の増殖、浸潤に重要であることが明らかになった。さらに、臨床検体の検討ではFn14の発現は前立腺癌患者の予後に関与する可能性が示唆された。Fn14は前立腺癌の増殖、浸潤に重要であり、前立腺癌の治療のターゲットになる可能性がある。

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 2 件)

1. Overexpression of Fn14 promotes androgen-independent prostate cancer progression through MMP-9 and correlates with poor treatment outcome

Carcinogenesis. 2011, 32(11):1589-96.

Mingguo Huang, Shintaro Narita, Norihiko Tsuchiya, Zhiyong Ma, Kazuyuki Numakura, Takashi Obara, Hiroshi Tsuruta, Mitsuru Saito, Takamitsu Inoue, Yohei Horikawa, Shigeru Satoh and Tomonori Habuchi

2. A high-fat diet enhances proliferation of prostate cancer cells and activates MCP-1/CCR2 signaling

The Prostate, 2012, in press

Mingguo Huang, Shintaro Narita, Kazuyuki Numakura, Hiroshi Tsuruta, Mitsuru Saito, Takamitsu Inoue, Yohei Horikawa, Norihiko Tsuchiya and Tomonori Habuchi

[学会発表] (計 2 件)

1. Prostate cancer progression under high fat diet is enhanced by the MCP-1/CCR2 signaling

Mingguo Huang, Shintaro Narita, Kazuyuki Numakura, Hiroshi Tsuruta, Mitsuru Saito, Takamitsu Inoue, Yohei Horikawa, Norihiko Tsuchiya and Tomonori Habuchi

2011年アメリカ泌尿器科学会で発表

2. A high-fat diet enhances prostate cancer growth by MCP-1/CCR2 signaling

Mingguo Huang, Shintaro Narita, Kazuyuki Numakura, Hiroshi Tsuruta, Mitsuru Saito, Takamitsu Inoue, Yohei Horikawa, Norihiko Tsuchiya and Tomonori Habuchi

2011年日本癌学会で発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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