様式Ｆ－１９

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成　25 年　6　月　17　日現在

機関番号：11401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791738
研究課題名（和文）　前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得機序におけるインスリンシグナルの分子病態解析
研究課題名（英文）　The role of insulin signaling in the mechanism of androgen independent prostate cancer
研究代表者
井上　高光（INOUE TAKAMITSU）
秋田大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60375243

研究成果の概要（和文）：マウス腎癌モデルにおいて、高炭水化物食により引き起こされる高インスリン血症は、腎癌増殖を刺激する。メトフォルミンはマウスモデルにおいて高インスリン血症の改善および直接作用により、腎癌増殖を抑制する。腎癌臨床検体において、インスリンレセプターの高発現は良好な予後と関連した。

研究成果の概要（英文）：Hyperinsulinemia resulted from high carbohydrate diet acceralated the progression of murine renal cell carcinoma. Metformin inhibited the progression of murine renal cell carcinoma due to improvement of hyperinsulinemia and/or direct tumor inhibitory effect. Insulin receptor overexpresssion was independent predictor of a favorable outcome in patients with renal cell carcinoma who underwent radical or partial nephrectomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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

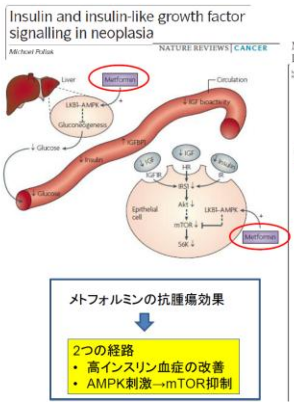
前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得機序におけるインスリンシグナル関与の分子病態を解析し、インスリンシグナル抑制による転移性去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療戦略を模索する目的の研究を行う予定であったが、腎細胞癌の進展におけるメタボリックシンドロームの役割およびその改善による癌進展抑制の分子生物学的解明を主に行なっている。

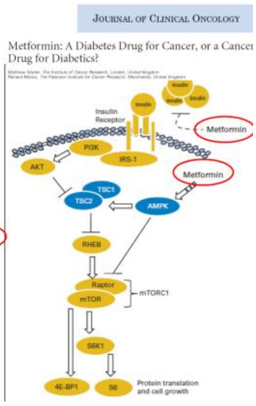
腎細胞癌は前立腺癌や乳癌と並んで、近年罹患率死亡率が上昇している癌腫である。メタボリックシンドローム(MS)が癌の発生および進展のリスクであることは主に前立腺癌や乳癌の疫学で解明されてきた。転移性の前立腺癌や乳癌は以前より比較的長期生存が見込めるため、MS との関連は重要であったが、最近、転移性腎細胞癌においても分子標的医薬の目覚しい発展により比較的長期生存が可能になり、MS と腎細胞癌進展との関連の研究の重要度が増してきた。

腎細胞癌の確立されたリスク要因として肥満が挙げられるが(Br J Cancer 85, 984-990, 2001)、腎細胞癌の発生および腎細胞癌による死亡において、

肥満との相関が前立腺癌や乳癌よりも強いとの報告が多数ある(N Engl J Med 348, 1625-1638, 2003, Lancet 371, 569-578, 2008)。また糖尿病は前立腺癌発症と逆相関するが(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15, 2056-2062, 2006)、腎細胞癌の発生とは相関することが報告されている(J Natl Cancer Inst 89, 1360-1365)。MS において癌進展と大きく関わる分子として、インスリン、インスリン様成長因子(IGF-1)、アディポカインであるアディポネクチン、レプチン、TNFα、IL-6 などが挙げられる。前立腺癌や乳癌の分野では実験室レベルでさまざまな報告があるが、腎癌では MS との関連はほとんど研究されていない。

本研究で我々はインスリンシグナルの腎細胞癌における役割に注目して研究を行った。インスリンは糖代謝における重要な分子であるが、同時に PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達系を IGF-1 と共有する強力な増殖因子でもある。MS マウス腎細胞癌モデルにおけるインスリンシグナルの役割解析は、疫学的理由からより良いモデルであると考えられる。インスリンシグナルを抑制する薬剤としてメトフォルミンが重要であるが、メトフォルミンは糖尿病治療において肝臓での糖代謝を抑制しインスリン抵抗性を改善し、血中インスリン濃度を低下させる。しかしメトフォルミンは LKB1/AMP kinase 経路を活性化することにより mTOR を抑制し、癌細胞の増殖を直接抑制する作用も報告されているが、どちらの作用が癌の進展抑制により重要であるかの解明は充分でない。





さらに乳癌や前立腺癌では臨床検体においてインスリンレセプターの発現と深達度、悪性度や予後との関連が報告されているが、腎細胞癌においては現在まで全く報告がない。

２．研究の目的

マウス腎細胞癌進展モデルにおける高インスリン血症およびインスリンシグナルの役割の分子生物学的解明および腎細胞癌患者の臨床検体を使用したインスリンシグナルの疫学的解明を研究目的とした。

３．研究の方法

腎細胞癌 cell line におけるインスリンレセプター(IR)の発現および in vitro 腫瘍増殖機能の解析

確立された腎細胞癌株(786-O, Caki-1, Caki-2, ACHN, RENCA)を収集し、蛋白を抽出した上で SDS-PAGE を行い、Western Blotting で IR の発現を確認する。IR が発現している cell line について、MMT アッセイを用いてインスリン濃度―腫瘍増殖曲線を描き、各 cell line におけるインスリンの増殖機能解析を行う。インスリン濃度に反応して増殖する cell line があれば、蛋白を抽出し、in vitro でのインスリンシグナルの亢進を SDS-PAGE-Western blotting を用い phospho IR や phospho IRS-1, phospho Akt, phospho p44/42 MAPK で証明する。

高炭水化物食による MS-高インスリン血症マウスモデルの確立と腎細胞癌 in vivo 腫瘍増殖曲線の作成

筆者らは、Swiss nude および C57BL/6 mouse において、高炭水化物食は高インスリン血症を引き起こすことを明らかにした(Inoue et al, Prostate 2010 Jun 16, J Natl Cancer Inst 99, 1793-1800, 2007)。これらのマウスを同カロリーの高炭水化物食群と低炭水化物食群に分け、インスリン抵抗性を糖負荷試験で、高インスリン血症を伏在静脈からの採血の上 ELISA を行い証明する。このマウスの側腹部皮下に先ほどのインスリンに反応する細

胞を約 1×10^6 注射し、腫瘍増殖速度の差を測定する。定期的採血の上、高インスリン血症、高 IGF-1 血症、低アディポネクチン血症などを伏在静脈からの採血の上 ELISA を行い証明する。

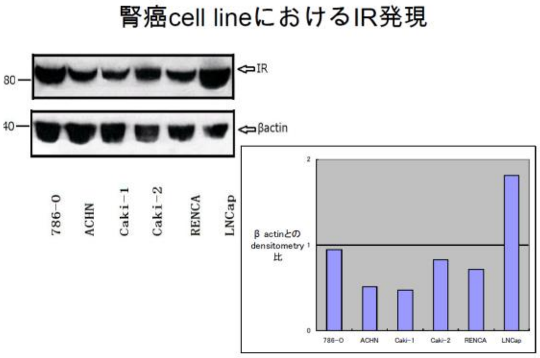
高インスリン血症マウスにおける in vivo 腎細胞癌増殖促進のメトフォルミンによる抑制効果の確認

筆者の以前所属した研究グループはマウスモデルにおいて高脂肪食により引き起こされた高インスリン血症が前立腺癌(J Natl Cancer Inst 99, 1793-1800, 2007)および大腸がんの増殖を促進し、経口血糖降下薬であるメトフォルミンが高インスリン血症を改善し、さらに AMPK-mTOR 経路を介して癌の増殖を抑制することを証明した(Endocr Relat Cancer 17, 351-360, 2010)。マウスケージ内の水供給ボトルにメトフォルミンを混合し、血清インスリンを測定しつつ腫瘍増殖曲線を作成する。腫瘍および血清はマウス安楽死時に液体窒素を用いて凍結保存する。腫瘍より抽出した蛋白を用い、SDS-PAGE の上 Western blotting でシグナル解析を行って、メトフォルミンによる増殖抑制が、インスリンシグナルの低下および AMPK-mTOR 経路を介した作用であることを in vitro および in vivo で検証する。

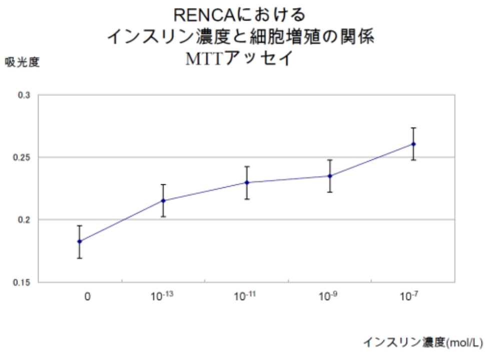
４．研究成果

腎細胞癌 cell line RENCA はインスリン投与により in vitro で腫瘍増殖が刺激され、インスリンリセプターの下流シグナルも亢進していた。

確立された腎細胞癌株(786-O, Caki-1, Caki-2, ACHN, RENCA)を収集し、蛋白を抽出した上で SDS-PAGE を行い、Western Blotting で IR の発現を確認した。IR はすべての cell line について発現していた (Figure1A)。



RENCA について MMT アッセイを用いてインスリン濃度—腫瘍増殖曲線を描いたところ、インスリン濃度に比例して腫瘍の増殖を認めた (Figure 1B)。

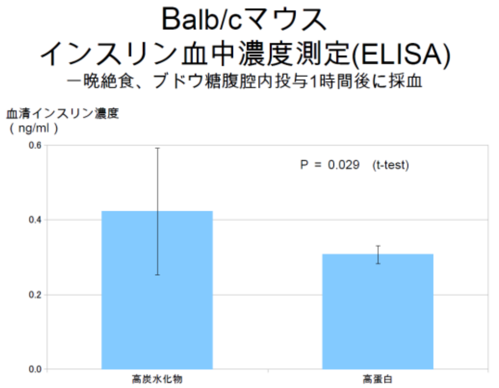


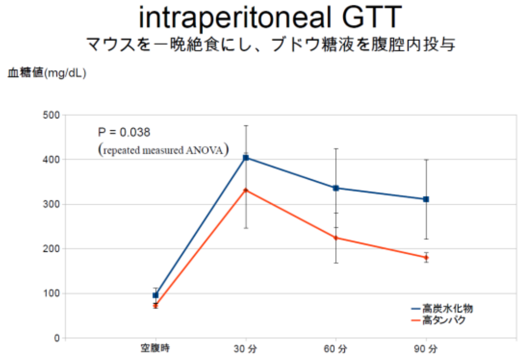
また SDS-PAGE-Western blotting を用い解析している途中である。phospho IR はインスリン濃度に比例して刺激され、インスリンレセプターの下流シグナルである phospho IRS-1, phospho Akt, phospho p44/42 MAPK も phospho IR の亢進に伴い刺激されていると考えられる。

高炭水化物食により Balb/c において高インスリン血症が惹起され、皮下に注射した腎細胞癌の腫瘍増殖が in vivo で刺激された。

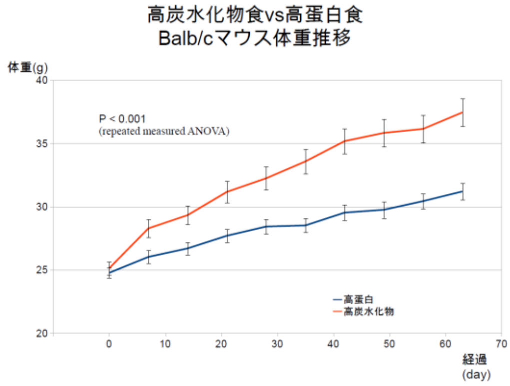
筆者らのグループは、Swiss nude および C57BL/6 mouse において、高炭水化物食は高インスリン血症を引き起こすことを明らかにしてきた(Inoue et al, Prostate 2010 Jun 16, J Natl Cancer Inst 99, 1793-1800, 2007)。そこで本研究では RENCA が増殖可能な Balb/c マウスを上記論文と同様の同カロリーの高炭水化物食群と高蛋白食群に分けて飼

育した。各群のインスリン抵抗性を糖負荷試験で、また高インスリン血症を伏在静脈からの採血の上ELISA を行い証明した。

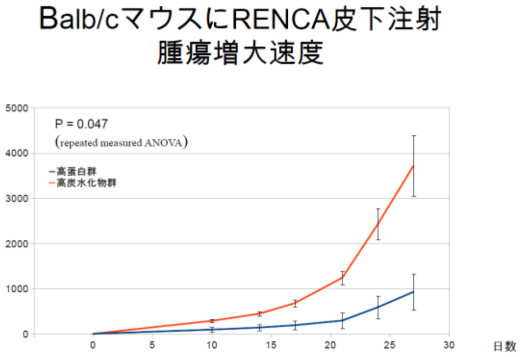




高炭水化物食は有意に高インスリン血症を引き起こし（p = 0.038, Figure 2A)、体重が有意に増加した（p <0.001, Figure 2B)。



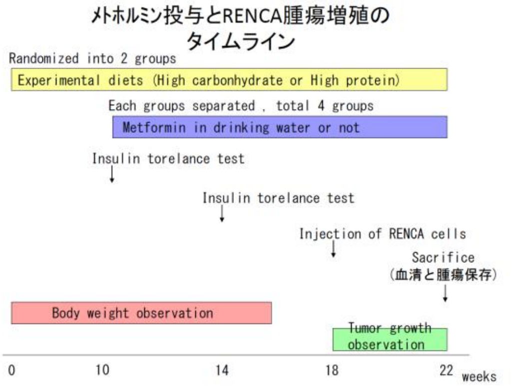
このマウスの側腹部皮下に RENCA を 1×10^6 注射し、腫瘍増殖速度の差を測定したところ、高炭水化物食群に植えた腫瘍は有意に高蛋白食群に植えた腫瘍に比較して大きくなった（p = 0.047, Figure2C)。



また現在、SDS-PAGE-Western blotting を用い腫瘍細胞におけるインスリンシグナル解析しているところである。phospho IR は高炭水化物食群の腫瘍で高蛋白食群のそれに比べ、より刺激されていると考えられる。またインスリンレセプターの下流シグナルである phospho IRS-1, phospho Akt, phospho p44/42 MAPK も高炭水化物食群の腫瘍で刺激されていると考えられる。

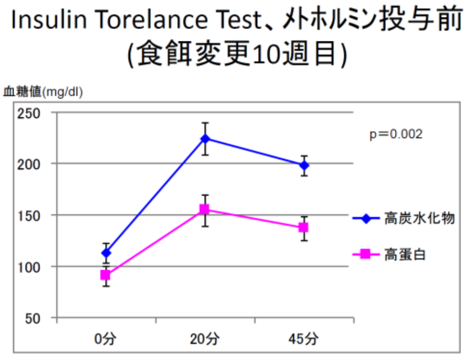
マウスにおける in vivo 腎細胞癌増殖はメトフォルミンにより抑制された。

筆者らの以前所属した研究グループはマウスモデルにおいて高脂肪食により引き起こされた高インスリン血症が前立腺癌(J Natl Cancer Inst 99, 1793-1800, 2007)および大腸がんの増殖を促進し、経口血糖降下薬であるメトフォルミンが高インスリン血症を改善し、さらに AMPK-mTOR 経路を介して癌の増殖を抑制することを証明してきた (Endocr Relat Cancer 17, 351-360, 2010)。

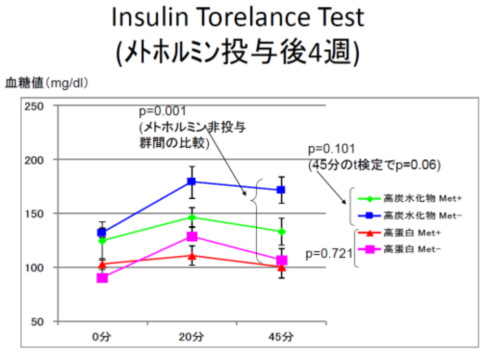


上図の様に、Balb/c マウスを高炭水化物食群と高蛋白食群に分けて約 1 ヶ月飼育したところで、各

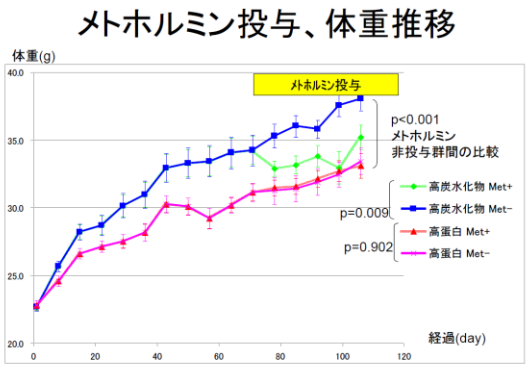
群のインスリン抵抗性をインスリン負荷試験で確かめたところ、高炭水化物群で有意に血糖が高値となった($p = 0.002$, repeated measured ANOVA)。



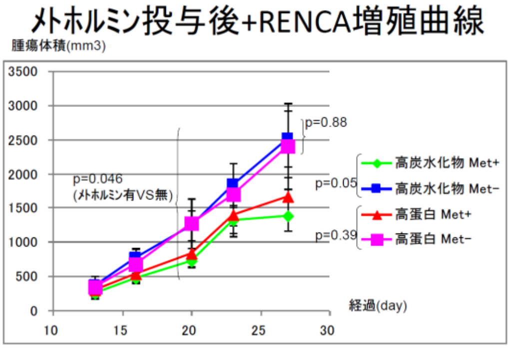
また、各群のインスリン抵抗性が完成される食餌変更 10 週にをメトホルミン投与群と非投与群に分け、投与後 4 週でさらにインスリン負荷試験を行ったところ、メトホルミン非投与群で高炭水化物食と高蛋白食の間に差を認め、メトホルミン投与群では有意差を認めなかった。



このマウスの体重は、高蛋白食群ではメトホルミン投与で変化を認めなかったが、高炭水化物食群ではメトホルミン投与群は有意に非投与群に比べ投与時からの体重が減少した（$p < 0.001$)。



これらのマウスの側腹部皮下に RENCA を 1×10^6 注射し、腫瘍増殖速度の差を測定したところ、高炭水化物食群も高蛋白食群でも、腫瘍はメトフォルミン投与によって有意に縮小した($p = 0.046$)。



腫瘍より抽出した蛋白を用い、SDS-PAGE の上 Western blotting でシグナル解析を行って、メトフォルミンによる増殖抑制が、インスリンシグナルの低下および AMPK-mTOR 経路を介した作用であることを in vitro および in vivo で検証する予定である。

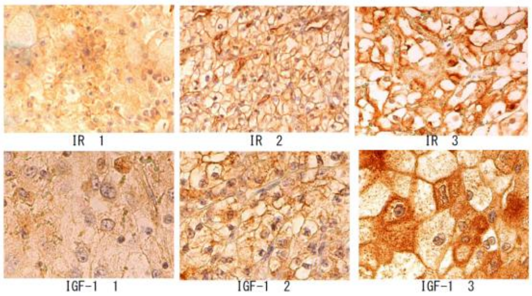
腎摘出術を受けた腎細胞癌におけるインスリン受容体発現と予後との相関

当科において 2007 年 2 月から 2011 年 6 月までに腎摘除術を受け腎細胞癌を診断された下図に示した臨床背景の 99 例について、摘出標本を抗インスリン受容体抗体および抗 IGF-1 受容体抗体で免疫染色を行った。

腎癌臨床検体の背景（現在99例）
IR染色とPFS、OSの関係

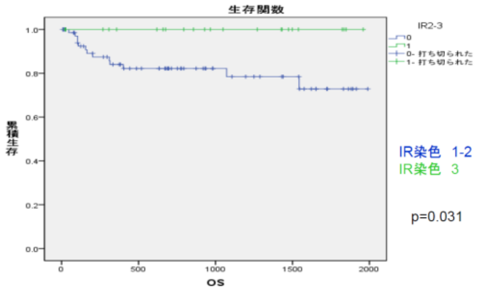
Characteristic	No.		
Sex		Pathology	
Male	29	clear cell	81
Female	70	papillary	7
		chromophobe	4
Age	63.5歳 (22–93歳)	spindle cell	4
		granular	2
TNM stage			
pT1	65	Furman Grade	
pT2	12	G1	25
pT3	21	G2	40
pT4	1	G3	34
N0	88		
N1	4	PFS	674day (0–1989)
N2	7		
M0	82	OS	807day (8–1989)
M1	17		

IRとIGF-Rの染色程度



インスリン受容体の発現は軽度 18 例、中等度 57 例、高度 24 例であった。IGF-1 受容体の発現は軽度 17 例、中等度 54 例、高度 28 例であった。インスリン受容体の発現は有意に長期無病生存期間および長期全生存期間と逆相関した(p = 0.015, p = 0.031, logrank test)。IGF-1 受容体の発現は生存期間と相関しなかった。

OS



インスリン受容体の発現は多変量解析において独立した無病生存期間の規定因子であった (p = 0.047, Cox proportional hazard model)。

Cox回帰分析

Characteristic	No.	HR (95%CI)	p value
Sex			
Male	29	1.757	0.718
Female	70	(0.718-4.297)	
Age			
<70	57	0.570	0.209
≧70	42	(0.237-1.371)	
T stage			
pT1	65	0.819	0.668
pT2-4	34	(0.328-2.046)	
N			
negative	88	5.315	0.001
positive	11	(1.975-14.305)	
Furman Grade			
G1-2	65	5.112	0.001
≧G3	34	(1.933-13.519)	
Insulin Receptor status			
1-2	75	0.188	0.026
3	24	(0.043-0.819)	

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）

1) 井上高光、土谷順彦、羽渕友則（2011）前立腺癌の発症進展メカニズム、日本臨床，**69,** 50-55.

〔学会発表〕（計 7 件）

1) Inoue, T., Zakikhani, M., Mireuta, M., Blouin, MJ., Pollak, M. (2011) In vivo castration-resistant acceleration of prostate cancer inhibited by a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor 1 receptor/insulin receptor tyrosine kinase. The 106th Annual Meeting of the American Urological Association, May, Washisnton DC, USA
2) 井上高光、羽渕友則、Michael Pollak (2011) インスリン・IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ抑制剤による、LNCaP マウス前立腺癌モデルのアンドロゲン非依存性増殖相における増殖抑制効果 20 回泌尿器科分子細胞研究会、3 月、津、
3) 井上高光、羽渕友則、Michael Pollak (2011) マウス前立腺がん xenograft モデルにおけるアンドロゲン除去療法とインスリンシグナル 第 99 回日本泌尿器科学会総会，4 月，名古屋
4) 井上高光、堀川洋平、米田真也、沼倉一幸、小原崇、成田伸太郎、土谷順彦、佐藤滋、羽渕友則 (2011) 転移性腎細胞癌に対する mTOR inhibitor の初期使用経験. 第 49 回日本癌治療学会学術集会、10 月、名古屋
5) 井上高光、米田真也、沼倉一幸、小原　崇、成田伸太郎、堀川洋平、土谷順彦、佐藤　滋、羽渕友則 (2012) 転移性腎細胞癌に対する mTOR inhibitor を含む Sequential Therapy の経験. 第 100 回日本泌尿器科学会総会, 4 月, 横浜
6) 井上高光、沼倉一幸、秋濱晋、齋藤満、成田伸太郎、土谷順彦、佐藤滋、羽渕友則(2012) 転移性腎癌に対する mTOR 阻害剤を含む Sequential Therapy の経験、第 50 回日本癌治療学会学術集会，10 月，横浜
7) 井上高光、沼倉一幸、秋濱　晋、齋藤満、成田伸太郎、土谷順彦、羽渕友則　(2012) 秋田大学におけるエベロリムスの使用経験、ノバルティス Core-J in Morioka 2012，9 月，盛岡

６．研究組織

(1)研究代表者

井上　高光（INOUE TAKAMITSU）
秋田大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60375243