

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293332

研究課題名(和文) 包括的脂肪・糖代謝解析による肥満に伴う泌尿器癌進展の分子機序解明と克服

研究課題名(英文) Molecular analysis and target exploration underlying progression of urologic cancers associated with obesity

研究代表者

羽瀧 友則 (HABUCHI, Tomonori)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00293861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の泌尿器癌(特に前立腺癌や腎癌)の増加は著しいが、原因として高カロリー・高脂肪食の影響が示唆されている。本研究は実験動物、細胞生物学、分子疫学、臨床検体やメタボロミクスの包括的解析手法を生かした包括的解析により高脂肪食や肥満に伴う泌尿器癌進展の分子機構を多方面から解明、標的分子を同定し、治療や予防への可能性を検討した。

成果として、生体内で豊富に存在する飽和脂肪酸であるパルミチン酸(PA)による前立腺癌進展の下流分子にケモカインのMIC-1が重要であり、治療ターゲットになりうることを示した。またPAの脂肪酸合成酵素(FASN)が前立腺癌の進展に関与しており、治療標的分子となることを示した。

研究成果の概要(英文)：It is strongly suggested that recent remarkable increase in the incidence of urologic cancers may be caused by high-calorie or high-fat diet. In this study, we attempted to delineate the molecular mechanisms underlying the progression associated with high-fat diet or obesity and to find molecular therapeutic and preventive targets, using multi-modal analytical methods, such as animal experiments, molecular cellular biology, molecular epidemiology, clinical materials and metabolomics. As the results, we showed that palmitic acid, which is the most abundant fatty acids in the body, plays an important role in the progression of prostate cancer via macrophage inhibitory factor 1 (MIC-1), and MIC-1 is a promising target in the cancer treatment. Furthermore, we showed that fatty acid synthase (FASN), which is the important enzymes involved in the production of palmitic acid, plays a significant role in the progression of prostate cancer.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：前立腺癌 腎細胞癌 高脂肪食 肥満 palmitic acid fatty acid synthase MIC-1

1. 研究開始当初の背景

近年の泌尿器癌（特に前立腺癌や腎細胞癌）の増加は著しいが、原因として高カロリー・高脂肪食の影響が示唆されている。

肥満に伴う癌の進展に“脂肪が悪いのか？高血糖が悪いのか？”に関しては大きな論争がある。これまでの研究では、高脂肪食・高カロリー食による GH IGF-1 axis の活性化と耐糖能異常による高 Insulin 血症が癌進展に関与することが示唆されている。我々の LNCaP Xenograft モデルでも、高脂肪食下の腫瘍では IGF-1R が高発現しており（*Prostate 2008*）この説を支持する。Kalaany らは様々な癌細胞においてカロリー制限によって成長が影響されるか否かは PI3K-AKT 経路が異常か正常かに依存することを示した（*Nature 2009*）。この経路の上流として Insulin・IGF-1 が想定されるが、PI3K-経路に集約される経路は他に多くあり、検討を要する。一方、我々は高脂肪血清、脂肪組織からのサイトカイン（TWEAK や MCP-1）、アディポカインが癌進展に重要であることを発表（*Carcinogenesis 2011, Prostate 2012*）、さらに Nieman らは脂肪代謝が癌進展に重要であることを報告した（*Nature Med 2011*）。このようにカロリー摂取と癌進展の機構を明確にすることは泌尿器癌に限らず多くの癌に非常に重要な課題であり、当該経路を標的とした癌予防や治療薬開発に繋がる可能性がある。

私どもは、実験動物、細胞生物学、分子疫学、臨床検体を用いた解析により、高カロリー・高脂肪食による泌尿器癌進展の分子機構に関する研究を進めてきた。本研究では、さらに近年のメタボロミクスの包括的解析手法の発展を生かして、肥満に伴う泌尿器癌進展の分子機構を多方面から解明、標的分子を同定し、治療や予防への可能性を検討するものである。

2. 研究の目的

- 1) 高脂肪・高カロリー食による泌尿器癌進展の腫瘍細胞内シグナルや腫瘍微小環境の標的分子（脂質、蛋白、microRNA）の同定と生物学的意義を包括的な脂質代謝・糖代謝の面から解明する。
- 2) 標的分子の臨床検体や分子疫学的解析による実地検証
- 3) 標的分子の抑制または亢進による治療や予防の可能性を動物モデルで検証、である。

3. 研究の方法

- 1) 担癌患者と正常患者の腫瘍周囲脂肪細胞からの分泌蛋白の包括的解析によって、新規の腫瘍促進・抑制のアディポカイン・サイトカインを同定:

腎癌患者の腫瘍周囲脂肪細胞、正常腎周囲脂肪細胞を患者より採取。一部を mRNA 抽出、一部を短期培養とした。

腎癌周囲脂肪細胞と正常者腎周囲脂肪細胞の各培養上清より蛋白抽出、抗体アレイを用いて、両群間で差のあるサイトカイン、ケモ

カインを同定した。

同定された候補サイトカイン・ケモカインに対する抗体、その受容体の抗体を用いて腫瘍進展抑制効果などを検証した。

同定された候補サイト・ケモカインの遺伝子や受容体遺伝子の siRNA を作成、腎癌だけでなく前立腺癌、膀胱癌も含めて、腫瘍促進あるいは抑制効果の有無を検証した。

- 2) In vitro において脂肪酸負荷による遺伝子発現プロファイル、メタボロームの変化、分泌蛋白・サイトカインの解析：パルミチン酸は飽和脂肪酸の最も重要な脂肪酸であり、脂肪代謝において重要な脂肪酸である。パルミチン酸による LNCaP や C4-2 前立腺癌細胞で変化、さらにパルミチン酸添加によって変動するサイトカインの解析を行った。候補サイトカインについて、前立腺癌や腎癌での進展への関与を in vitro、in vivo での siRNA や vector による発現制御によって機能解析を行った。
- 3) LNCaP Xenograft モデルとアレイ解析を用いて候補遺伝子や候補蛋白を同定する。本研究ではさらに in vitro、in vivo での siRNA や vector による発現制御による挙動観察（成長速度、浸潤、遊走、転移能、抗アポトーシス能）、上流下流のシグナル系活性化有無（PI3K-AKT、MAPK 系、IP3 系、RAS-系、STAT3 系）遺伝子改変マウス、等の解析を行った。とくに IGF-1 / Insulin 系の阻害剤（例：AMPK 活性化作用のある metoformin 等）を用いて、脂質系か IGF-1 / Insulin 系のどちらが高カロリー下の腫瘍進展に必要なのかを前立腺癌株や腎癌細胞株を用いて検証した

4. 研究成果

生体内で最も豊富に存在する飽和脂肪酸であるパルミチン酸（PA）に注目し、前立腺癌と高脂肪食との関係を分子レベルで解析し、PA による前立腺癌進展の下流分子に macrophage inhibitory cytokine 1（MIC-1）が重要であること。MIC-1 をブロックすることで高脂肪食による進展が阻止できる可能性があること。高脂肪食（=肥満？）による前立腺癌進展には MIC-1 が深くかかわっており、この MIC-1 は治療ターゲットになりうることを、分子レベルで示し、論文発表した（Huang, Habuchi ら、*Endocrine-Related Cancer 2013*）。

共同研究者と共同で、多くのイノシトールリン脂質（PIPs）などの精密な測定系を立ち上げ、腎癌細胞や前立腺癌細胞において、様々なイノシトールリン脂質の細胞内濃度測定に成功している。この精密な測定系は、我々の知る限り、世界でも 2-3 施設しか確立しておらず、生体において非常に重要な役割を担うイノシトールリン脂質と癌進展や高

脂肪食との関係が別の角度から解明できると期待される。現在、癌の脂質分子マーカーや治療ターゲットとなりうるリン脂質の同定を試みている。

PA 合成に深く関与する Fatty acid synthetase (FASN) と前立腺癌進展の分子機構を評価中で、これまで、LNCaP xenograft において、高脂肪食群では低脂肪食群より癌の増殖、癌組織中の FASN mRNA が亢進していること。血清 FASN は高脂肪食群では低脂肪食群より有意に低く、癌の大小と逆相関し、高脂肪食群では、癌組織中の PI3K, MAPK シグナルが亢進、AMPK シグナルは低下してこと等を観察しており、FASN-AMPK-PI3K/MAPK 系の3つのシグナルにフィードバックの抑制系・促進系のシグナル伝達があることを示し、発表した(Huang, Habuchi ら Oncogenesis 2016)。

肥満や高脂肪による癌進展に関わっているとされる IGF-1 遺伝子について、そのプロモーター領域の遺伝子多型と転移性前立腺癌の進展や予後不良との関連を遺伝子多型解析により示した (Tsuchiya, Habuchi ら BMC Cancer 2013)。

以上、高カロリー・高脂肪食による泌尿器癌進展の分子機構を、従来の細胞生物学的解析と、近年のメタボロミクスの包括的解析手法の発展を生かして多方面から解明、標的分子を同定、解析中である。

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 15 件)

- 1) Huang M, Koizumi A, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Nakanishi H, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T. Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis*. 2016;5:e195. doi: 10.1038/oncsis.2015.42.
- 2) Mitsuzuka K, Kyan A, Sato T, Orikasa K, Miyazato M, Aoki H, Kakoi N, Narita S, Koie T, Namima T, Toyoda S, Fukushi Y, Habuchi T, Ohyama C, Arai Y; Tohoku Evidence-Based Medicine Study Group; Michinoku Urological Cancer Study Group. Influence of 1 year of androgen deprivation therapy on lipid and glucose metabolism and fat accumulation in Japanese patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016;19(1):57-62.
- 3) 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;5(7):730-9.
- 4) 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;136(1):74-82.
- 5) Amin Al Olama A, Benlloch S, Antoniou AC, Giles GG, Severi G, Neal D, Hamdy FC, Donovan JL, Muir K, Schleutker J, Henderson BE, Haiman C, Schumacher FR, Pashayan N, Pharoah PD, Ostrander EA, Stanford JL, Batra J, Clements JA, Chambers SK, Weischer M, Nordestgaard BG, Ingles SA, Sorensen KD, Orntoft TF, Park JY, Cybulski C, Maier C, Doerk T, Dickinson JL, Cannon-Albright L, Brenner H, Rebbeck TR, Zeigler-Johnson C, Habuchi T, Thibodeau SN, Cooney K, Chappuis PO, Hutter P, Kaneva RP, Foulkes WD, Zeegers MP, Lu YJ, Zhang HW, Stephenson R, Cox A, Southey MC, Spurdle AB, FitzGerald L, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Guy M, Dadaev T, Little SJ, Govindasami K, Sawyer E, Wilkinson R, Herkommer K, Hopper JL, Lophatonanon A, Rinckleb AE, Kote-Jarai Z, Eeles RA, Easton DF. Risk Analysis of Prostate Cancer in PRACTICAL, a Multinational Consortium, Using 25 Known Prostate Cancer Susceptibility Loci. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015 ;24(7):1121-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0317.
- 6) Koie T, Mitsuzuka K, Yoneyama T, Narita S, Kawamura S, Kaiho Y, Tsuchiya N, Tochigi T, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C, Yoneyama T, Tobisawa Y. Neoadjuvant luteinizing-hormone releasing hormone

- agonist plus low-dose estramustine phosphate improves prostate-specific antigen-free survival in high-risk prostate cancer patients: a propensity score-matched analysis. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(5):1018-25.
- 7) Ishibashi Y, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Ohashi T, Tanaka M, Narita S, Koie T, Habuchi T, Nishimura S, Ohyama C, Yoneyama T. Serum tri- and tetra-antennary N-glycan is a potential predictive biomarker for castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2014;74(15):1521-9.
- 8) Yoneyama T, Ohyama C, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Koie T, Mori K, Hidari KI, Yamaguchi M, Suzuki T, Tobisawa Y. Measurement of aberrant glycosylation of prostate specific antigen can improve specificity in early detection of prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(4):390-6.
- 9) 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;44(3):678-84.
- 10) Hatakeyama S, Amano M, Tobisawa Y, Yoneyama T, Tsuchiya N, Habuchi T, Nishimura SI, Ohyama C. Serum N-glycan alteration associated with renal cell carcinoma detected by high-throughput glycan analysis. *J Urol*. 2014;191(3):805-13.
- 11) 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;21(1):39-50.
- 12) Sugiyama N, Yoneyama MS, Hatakeyama S, Yamamoto H, Okamoto A, Koie T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Inoue T, Habuchi T, Ohyama C, Tsuboi S. In vivo selection of high-metastatic subline of bladder cancer cell and its characterization. *Oncol Res*. 2013;20(7):289-95.
- 13) Narita S, Mitsuzuka K, Yoneyama T, Tsuchiya N, Koie T, Kakoi N, Kawamura S, Kaiho Y, Ohyama C, Tochigi T, Yamaguchi T, Habuchi T, Arai Y. Impact of body mass index on clinicopathological outcome and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013;16(3):271-6.
- 14) 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;13:150.
- 15) Tsuchiya N, Matsui S, Narita S, Kamba T, Mitsuzuka K, Hatakeyama S, Horikawa Y, Inoue T, Saito S, Ohyama C, Arai Y, Ogawa O, Habuchi T. Distinct cancer-specific survival in metastatic prostate cancer patients classified by a panel of single nucleotide polymorphisms of cancer-associated genes. *Genes Cancer*. 2013;4(1-2):54-60.
- [学会発表](計 5件)
- 1) Takayama, K., Inoue, T., Narita, S., Huang, M., Tsuruta, H., Saito, M., Tsuchiya, N., Habuchi, T. (2015) Castration-induced acceleration of bone metastasis prevented by RANK inhibitor osteoprotegerin in murine castration-resistant prostate cancer model. The 30th Annual European Association of Urology Congress, March, Madrid, Spain.
- 2) Ito, R., Narita, S., Mingguo, H., Tsuruta, H., Akihama, S., Saito, M., Inoue, T., Tsuchiya, N., Satoh, S., Habuchi, T. (2015) Effect of obesity and adiponectin signaling in patients with renal cell carcinoma treated with surgery. The 110th Annual Meeting of the American Urological Association, May, New Orleans, USA.
- 3) Takahashi, M., Inoue, T., Huang, M., Tsuruta, H., Saito, M., Narita, S., Tsuchiya, N., Habuchi, T. (2015) Inverse Relationship between Insulin Receptor Expression and Cancer Progression in Renal Cell Carcinoma: Clinical and Experimental Evaluation. The 110th Annual Meeting of the American

Urological Association, May, New Orleans, USA.

- 4) Huang, M., Narita, S., Tsuchiya, N., Inoue, T., Satoh, S., Nanjo, H., Sasaki, T., Habuchi, T. (2014) Diet induced alteration of fatty acid synthase is involved in prostate cancer progression. The 109th Annual Meeting of the American Urological Association, May, Orlando, USA
- 5) Habuchi, T., Huang, M., Narita, S., Inoue, T., Tsuchiya, N., Satoh, S., Nanjo, H., Sasaki, T. (2014) Diet-induced Macrophage Inhibitory Cytokine 1 Promotes Prostate Cancer Progression. Annual Meeting of the Urological Research Society, September, Munich, Germany

〔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

秋田大学大学院医学系研究科 腎泌尿器科学

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~hinyoki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽瀧 友則 (HABUCHI, Tomonori)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00293861

(2) 研究分担者

大山 力 (OHYAMA, Chikara)

弘前大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80202135

湯浅 健 (YUASA, Takeshi)

公益財団法人がん研究会有明病院・

泌尿器科・副部長

研究者番号：00314162

南條 博 (NANJO, Hiroshi)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：70250892

沼倉 一幸 (NUMAKURA, Kazuyuki)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90566415

(3) 連携研究者

佐々木 雄彦 (SASAKI, Takehiko)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50333365

中西 広樹 (NAKANISHI, Hiroki)

秋田大学・生体情報センター・助教

研究者番号：10466740