

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462466

研究課題名(和文) 高脂肪食摂取下の前立腺癌増殖・進展におけるmicroRNAの役割

研究課題名(英文) Impact of microRNAs on high-fat diet induced prostate cancer progression

研究代表者

成田 伸太郎(Narita, Shintaro)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：40396552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食下の前立腺癌増殖へのmicroRNAの関連を検討した。高脂肪食下で増殖したLNCaP xenograft腫瘍内で発現変化する59のoncogenic-およびsuppressive-microRNAを同定した。その中でmiR-130aは前立腺癌細胞株で低発現し、高脂肪食摂取マウス血清培養液中で増殖する前立腺癌細胞株で低発現した。miR-130aの標的タンパクとしてMET、AR、DICER1が候補となり、ヒト前立腺癌上皮ではmiR-130a発現が低下すると共に、肥満前立腺癌患者の癌上皮細胞質ではMETが高発現した。miR-130a/MET経路は高脂肪食下前立腺癌進展に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We assessed the roles of altered miRNAs in HFD-induced PCa progression. We found 59 up- and down-regulated miRNAs in xenografts under the HFD condition using microRNA Array analysis. In those miRNAs, we focused on miR-130a because of the expression levels with significantly lower in three PCa cells. In ex vivo, PCa cells cultured in medium containing HFD-fed mouse serum had significantly higher cell proliferation with lower expression levels of miR-130a. The PCa cells transfected with miR130a down-regulated MET, AR and DICER1, and MET expression was higher in HFD-induced PCa models. In human tissues, the mean miR-130a expression level of cancer epithelia was significantly lower than that of normal epithelia, and cytoplasmic MET in PCa tissues overexpressed in patients with higher BMI. In conclusion, a substantial number of miRNAs altered in HFD-induced PCa growth. In particular, miR-130a/MET pathway was associated with HFD-induced PCa progression.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：前立腺癌 microRNA 高脂肪食 MET

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米諸国において罹患率の最も高い癌のひとつであり、近年、日本人においてその増加が著しい。癌増殖・進展には遺伝的因子と後天的因子が関与すると考えられるが、前立腺癌ではラテント癌の頻度が人種間で同じにもかかわらず臨床癌が欧米諸国に多いこと、また欧米諸国への移民に頻度が高くなることより後天的因子としての環境因子の関与が注目されている

(Venkateswaran et al., *Nat Rev Urol*, 2010)。

その中で高脂肪食、高カロリー食に代表される食事の違いと前立腺癌発症や進展の関係が注目されており、疫学的研究より高脂肪食は前立腺癌のリスクファクターと言われている (Whittemore et al., *J Natl Cancer Inst*, 1995, Hsing et al., *Am J Clin Nutr*, 2007)。また前立腺癌患者において、高脂肪食がそのリスクとなる肥満症が生物学的再発や高悪性度癌のリスクと言われており (Cao et al., *Cancer Prev Res*, 2011)、高脂肪食・肥満がどのようなメカニズムで癌化へ関連するかを検討することは重要であるが、その生物学的機序を検討した研究は少なく、詳細な機序は未だ不明である。

我々はこれまでに分子生物学的手法を用いて高脂肪食・肥満下の前立腺癌増殖・進展の機序の一部を明らかにしてきた。ヒト前立腺癌 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、血清因子のプロテインアレイや網羅的遺伝子発現解析により多くの遺伝子、タンパクがその腫瘍増殖に関与していることを報告した

(Narita et al., *Prostate*, 2008, Huang et al., *Prostate*, 2011)。また網羅的発現解析で注目した遺伝子 (TWEAK, Fn14) が前立腺癌転移、浸潤能に関与していることを報告した

(Huang et al., *Carcinogenesis*, 2010)。近年タンパク質をコードしない非コード RNA が様々な病態に関与することが報告され、その中で多くの生物に存在する約 22 塩基の microRNA がヒトにおいても 1000 以上同定されており、生体機能に関与していると考えられている。前立腺癌に関わる microRNA も多数報告されており (Gap et al., *Nature*, 2009, Watahiki et al., *PLoS one*, 2011)、また食事を介した microRNA 変化が脂質代謝、インスリン抵抗性など様々な生体反応に関与していることが報告されている (Baek D, *Nature*, 2008)。また、これまでの我々の研究からサイトカインなどの血清因子の前立腺癌増殖への関与が注目されるが、体液中に存在するエクソソーム内の microRNA の病態への関連が注目されている (Hu G, *Front Gene*, 2012)。以上よりこれまで我々が報告してきた血清因子や遺伝子以外に食事と前立腺癌増殖をつなぐメカニズムに microRNA が関与している可能性が強く示唆されるが、これら

を検討した報告はきわめて少なく (Saini et al., *Pharm Res*, 2010)、他領域癌でも食事や肥満と癌化機序への関与の報告は少ない

(Mandal et al. *Carcinogenesis*, 2012)。我々はすでに pilot study において幾つかの microRNA が高脂肪食摂取下の前立腺癌増殖と関与する可能性を見出している。先行研究の結果を踏まえながら、より重要な候補 microRNA を探索し、その候補 microRNA の働きを解明するための研究が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

我々は高脂肪食下の前立腺癌増殖・進展に microRNA が関与していると仮説を立て、マウス xenograft モデルにおいて食事を介して発現変化する microRNA を網羅的発現解析からターゲットとして絞り込み、その機能解析および癌治療への可能性を臨床検体、動物実験、細胞実験を用いて探索することを目的とした。高脂肪食と前立腺癌の関係を分子レベルで解明し、その克服手段の基盤となる知見を得ることは重要で、とくに microRNA は複数の機序をターゲットにするため癌に関与する多数の分子標的を一つの microRNA をターゲットとすることで可能となり、従来の分子標的治療より高い効果を期待できる可能性がある。また、候補 microRNA の遺伝子多型などがその活性に影響すれば、食事を介した個別のがん予防の戦略に繋がる知見を得られる可能性がある。

## 3. 研究の方法

本研究では関連 microRNA 探索のための網羅的解析とその結果をもとにした機能解析を細胞株、実験動物、臨床検体を用いて多角的に検討した。

① 候補 microRNA の網羅的発現解析: 食餌の違う 2 系統のマウス LNCaP xenograft を作成し、腫瘍体積と体重を測定。腫瘍組織から RNA を採取し、miRCURY LNA™ microRNA Array を用いた網羅的 microRNA 解析。

② 候補 microRNA の検証: ①の候補 microRNA の前立腺細胞株での発現を確認。癌で高、低発現する microRNA を探索する。また高脂肪食、コントロール食を与えたマウスから採取した血清を用いて、前立腺癌細胞株を培養した際の細胞増殖解析及び候補 microRNA の測定。

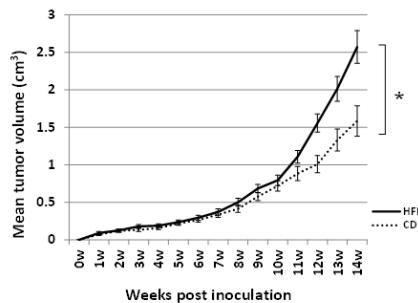
③ 候補 microRNA の機能解析: microRNA の標的分子を探索する。Pre-mir-precursor を用いて標的 microRNA をノックインし、文献や web サイトから抽出した候補標的のウェスタンブロット解析を行う。

④ 候補 microRNA と標的遺伝子のヒト前立腺組織における検討: ヒト前立腺上皮と正常または肥大症上皮をレーザーキャプチャマイクロダイゼクションで分離し、候補

microRNA の発現を評価。また候補標的タンパクの前立腺全摘組織の癌上皮での発現と BMI の関連を解析する。

#### 4. 研究成果

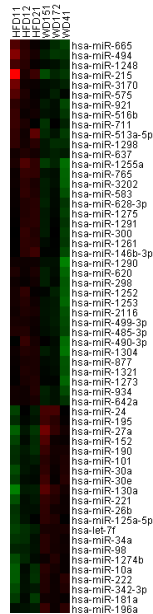
(1) 高脂肪食 (全カロリーの 59.9% を脂質) を摂取した前立腺癌マウス xenograft は低脂肪食群 (41.6% を脂質) に比べて有意に腫瘍増殖が亢進した【図 1】(HFD group  $2.57 \pm 0.22 \text{ cm}^3$  vs CD group  $1.58 \pm 0.20 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0.003$ )。また高脂肪食摂取群と低脂肪食摂取群の腫瘍組織内の microRNA 発現を網羅的 microRNA 発現解析で比較、発現比 1.5 倍以上、FDR < 0.2 と設定すると高脂肪食群で有意に発現が亢進する oncogenic-microRNA 38 および suppressive-microRNA が 21 同定された【図 2】。



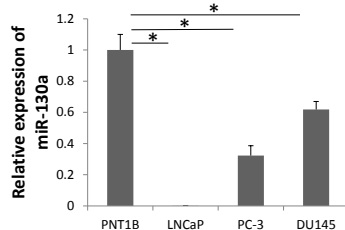
【図 1】食事の違いによる前立腺癌マウス xenograft の増殖

(2) 抽出した候補 microRNA に関して、3 種類の前立腺癌細胞株と 1 種類の前立腺細胞株 PNT1B の発現を比較し、全 3 種類の前立腺癌細胞株で miR-130a の発現が有意に低下した【図 3】。更に、高脂肪食マウス血清を用いて培養した前立腺癌細胞株は増殖が亢進し、miR-130a が低下した。miR-130a を高発現した前立腺癌細胞株では MET、DICER1、AR が亢進し、標的遺伝子である可能性が示唆された【図 4】。

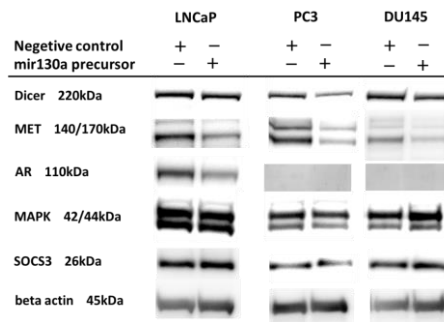
【図 2】マウス xenograft 内の microRNA の網羅的発現解析



【図 3】前立腺細胞株における miR-130a 発現

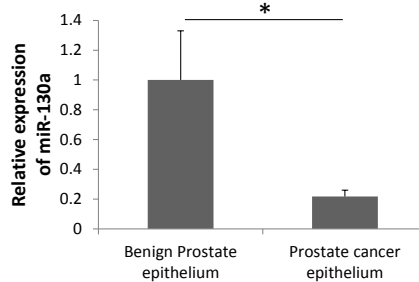


【図 4】前立腺細胞株における miR-130a 標的タンパク

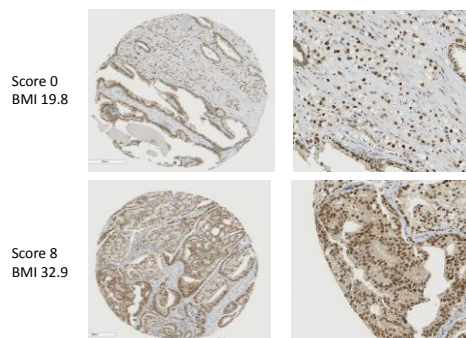


(3) ヒト前立腺組織をレーザーキャプチャマイクロダイゼクションで癌と正常上皮に分離すると癌上皮で miR-130a の発現が有意に低下していた ( $p = 0.023$ )【図 5】。また前立腺癌全摘組織の MET 発現が BMI の高い群で高値になる傾向が見られた。また BMI 26 以上の患者群の前立腺癌上皮細胞質における MET 発現スコアは BMI 26 より小さい群に比較し有意に上昇していた ( $p = 0.021$ )【図 6】。以上より高脂肪食は miR-130/MET 経路の亢進を介して、前立腺癌増殖に関与する可能性があると考えられた。また今回は詳細な検討ができなかったが、miR-665、miR-24、miR-27a も高脂肪食摂取下の前立腺癌増殖進展に関わっている可能性があり、miR-130a は DICER1 や AR など重要な下流標的因子の候補が存在する。本研究はこれまで解明されていなかった生活習慣と前立腺癌の関与の一機序を解明したのみではなく、miR-130a/MET 経路阻害が食生活による癌増悪防止につながる可能性があると考えられ、前臨床モデルでの今後の再検証が待たれる。

【図 5】ヒト前立腺上皮の miR-130a 発現



【図 6】肥満と前立腺組織の MET 発現



## 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 3 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. (2016) Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis*. 2016 Feb 15;5:e195. 査読有り

2) 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. (2013) Impact of body mass index on clinicopathological outcome and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **16**(3), 271-6. 査読有り

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

[学会発表] (計 6 件)

1) Nara, T., Narita, S., Huang, M., Yoshioka T., Takayama, K., Numakura, K., Tsuruta, H., Maeno, A., Saito, M., Inoue, T., Satoh, S., Tomonori Habuchi, T. (9, May, 2016) MiR-130a modulates high-fat diet-induced tumor progression through the activation of MET in prostate cancer. 31th Annual European Association of Urology Congress, Munchen.

2) 成田伸太郎、伊藤隆一、鶴田大、秋濱晋、齋藤満、井上高光、土谷順彦、佐藤滋、羽瀨友則。(2015年4月18日) 腎癌と肥満およびアディポネクチンシグナルの関連検討。第103回日本泌尿器科学会総会, 金沢

3) Narita, S., Nara, T., Mingguo, H., Tsuchiya, N., Tsuruta, H., Akihama, S., Saito, M., Inoue, T., Satoh, S., Habuchi, T. (19, May, 2015) Expression of androgen and glucocorticoid receptors in residual cancer cells after neoadjuvant chemohormonal therapy with docetaxel for high-risk localized prostate cancer. The 110<sup>th</sup> annual meeting of the American Urological Association, New Orleans, USA

4) Huang, M., Narita, S., Tsuchiya, N., Inoue, T., Satoh, S., Nanjo, H., Sasaki, T., Habuchi, T. (16, May, 2014) Diet induced alteration of fatty acid synthase is involved in prostate cancer

progression. The 110<sup>th</sup> annual meeting of the American Urological Association, New Orleans.

5) Ito, R., Narita, S., Mingguo, H., Tsuruta, H., Akihama, S., Saito, M., Inoue, T., Tsuchiya, N., Satoh, S., Habuchi, T. (16, May, 2014) The impact of obesity and adiponectin signaling in patients with renal cell carcinoma. The 110<sup>th</sup> annual meeting of the American Urological Association, New Orleans.

6) Nara, T., Narita, S., Huang, M., Yoshioka T., Numakura, K., Akihama, S., Saito, S., Inoue, T., Tsuchiya, N., Satoh, S., Tomonori Habuchi, T. (4, May, 2013) Candidate microRNAs involved in high-fat diet induced tumor progression in prostate cancer. The 108<sup>th</sup> annual meeting of the American Urological Association, San Diego, USA

7) Narita, S., Mitsuzuka, K., Yoneyama, T., Kawamura, S., Arai, Y., Ohyama, C., Tochigi, T., Habuchi, T. (15, Feb, 2013) Impact of body mass index on clinicopathological outcome and biochemical recurrence after radical prostatectomy in Japanese prostate cancer patients. The Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology of Genitourinary Cancer symposium, Feb, Orland, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成田 伸太郎 (NARITA, Shintaro)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：40396552

### (2) 研究分担者

井上 高光 (INOUE, Takamitsu)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：60375243

黄 明国 (HUANG, Mingguo)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：60448503