

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462407

研究課題名(和文)腎癌のFABP7機能解明とトリグセリド代謝の検討ならびに発癌予防に向けた探索

研究課題名(英文)The functional analysis of FABP7, the examination of the triglyceride metabolism and the research to the prevention of renal cell carcinoma

研究代表者

大園 誠一郎(Ozono, Seiichiro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00183228

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)：腎癌で特異的に発現する脳型脂肪酸結合蛋白質が細胞増殖に与える影響は他因子との影響で亢進にも抑制にも働くことが示唆され、癌の複雑な発生機序の一端が明らかになった。また、脳型脂肪酸結合蛋白質の発現で腫瘍形成促進効果がみられたので、この蛋白質は腎癌の治療標的として利用できる可能性がある。さらに、解糖系とトリグセリド合成系を結ぶ代謝経路上にあるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ1は、腎正常組織に比較して腎癌腫瘍組織で発現が弱く、腎癌の治療に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of brain-type fatty acid-binding protein (FABP7) is specifically on renal cell carcinoma (RCC). FABP7 would be worked to stimulation or repression of cell proliferation according to the influence of other factors. It suggests the complicated outbreak mechanism of cancer became clear. In addition, FABP7 has a possibility to be applicable for a treatment target of RCC, because a neoplasia promotion effect was seen by the expression of FABP7. Further, the glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1) is on the metabolic pathway that links the triglyceride synthetic pathway to the glycolytic pathway. Expression of GPD1 was weaker in RCC than a kidney tissue. It suggests that GPD1 may be available for the treatment of RCC.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：FABP7 ドコサテトラエン酸 EPA GPD1 GPD2

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは腎癌における脂肪酸の役割を中心に研究を進め、脂肪酸結合蛋白質(FABP)ファミリーの発現を検討したところ、FABP7が高発現し、腎癌のマーカーとして有望であることを過去に報告した(Teratani T, et al. Urology 2007;69:236-40, Domoto T, et al. Cancer Sci 2007;98:77-82)。

(2) グリセロール-3-リン酸はグリセロールからトリグリセリドを生合成する経路の中間代謝産物であるとともに解糖系から生合成される代謝産物であるが、腎癌腫瘍部で低下していることをメタボローム解析から明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 腎癌で高頻度に発現している脳型脂肪酸結合蛋白質(FABP7)に対する多価不飽和脂肪酸の影響を検討し、腎癌の発症ならびに進展機構の一端を解明するとともに、その予防効果を検討する。

(2) われわれは、腎の正常部に比較して腎癌腫瘍部でのグリセロール-3-リン酸が低下することを過去に確認しているが、その事実から腎癌でトリグリセリドの生合成経路に異常が起きていることが予想され、この代謝系を解析することにより、腎癌の発症ならびに進展機構の一端の解明とともに、腎癌の有望なマーカー遺伝子がないかを検討する。

3. 研究の方法

(1) FABP7の機能解析

FABP7発現腎癌細胞株の作成

Gateway pT-Rex-DEST30 ベクターに FABP7 を結合させ FABP7 を発現できる DEST30-FABP7 ベクターを作成し、そのベクターを 786-0 株と TUHR14TKB 株にトランスフェクションし、G418 を培地に添加することによって FABP7 持続発現 786-0 株 (786-0 FABP7) と TUHR14TKB 株 (TUHR FABP7) を作成した。

細胞増殖能測定

腎癌細胞株を 96 穴プレートに撒き、1,2,3 日間培養後、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit で細胞量を OD₄₉₀ の測定で定量した。

In vivo での腫瘍形成能

FABP7 を発現する 786-0 FABP7 株とコントロールの 786-0 lacZ 株をマウスに移植し、週 2 回ノギスで腫瘍の長径と短径を測定し、長径×短径²を腫瘍の大きさとみなし、腫瘍形成を測定した。

(2) 脂肪酸の培地添加効果

FABP7 発現株 (TUHR FABP7) とコントロール株 (TUHR lacZ) の脂肪酸組成の測定を SRL Inc. に依頼した。その結果、ドコサテトラエン酸と EPA が FABP7 発現株で蓄積がみられた。そこで、50 μM のドコサテトラエン酸または EPA を培地に添加し、TUHR lacZ 株の細胞増殖能を CellTiter 96® Aqueous One Solution

Cell Proliferation Assay Kit で測定した。(3) 腎癌でのグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 発現

当科で治療した 13 例の淡明細胞型腎癌の摘出腫瘍断片とその周辺の腎正常組織断片からキアゲンの AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から cDNA を合成し、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1 (GPD1) とグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 2 (GPD2) の mRNA 発現をリアルタイム PCR で測定した。

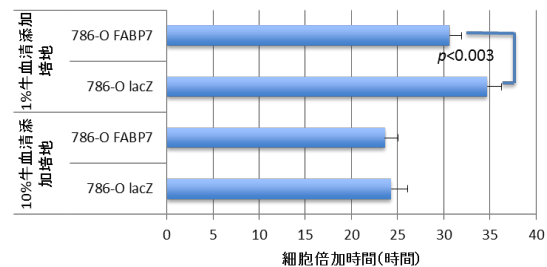
4. 研究成果

(1) FABP7の機能解析

FABP7の細胞増殖に及ぼす影響

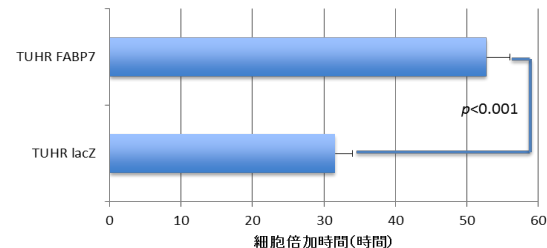
FABP7 発現株 786-0 FABP7 とコントロール株の 786-0 lacZ を通常の 10%牛血清添加培地と牛血清制限量の 1%牛血清添加培地で培養し、細胞増殖を測定した。結果は図 1 の様に牛血清制限培地では FABP7 発現株の方がコントロール株より細胞増殖が亢進していた一方、通常の培地では FABP7 発現による細胞増殖の影響はみられなかった。

図1.FABP7発現の細胞増殖への影響(786-0株)



しかし、FABP7 発現株 TUHR FABP7 とコントロール株 TUHR lacZ を通常の 10%牛血清添加培地で培養し細胞増殖を測定すると、結果は図 2 のように 786-0 株とは逆に FABP7 発現が細胞増殖を抑制した。

図2.FABP7発現の細胞増殖への影響(TUHR14TKB株)



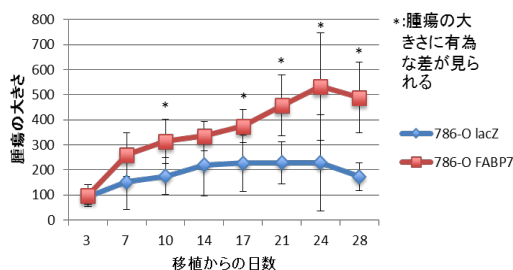
これらの結果から FABP7 の細胞増殖に及ぼす影響は細胞株や培養条件によって異なることが明らかになった。そこから FABP7 の細胞増殖に及ぼす影響は多因子の複合的な影響によって生じていることが推測される。

FABP7の腫瘍形成に与える影響

われわれは FABP7 を発現する 786-0 FABP7 株とコントロールの 786-0 lacZ 株をマウスに移植し、FABP7 の腫瘍形成に与える影響を検討した。結果は、図 3 のように FABP7 発現株では腫瘍の増大速度が早く、FABP7 が腫瘍

増大を促進する働きがあることが示唆された。

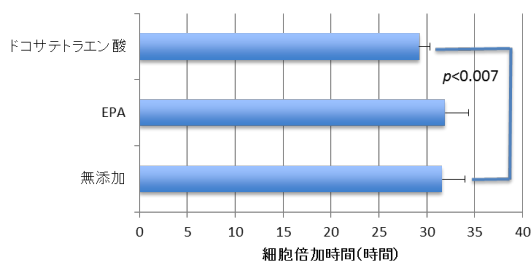
図3. FABP7の腫瘍形成に与える影響



(2) 脂肪酸の培地添加効果

われわれは FABP7 発現で蓄積のみられたドコサテトラエン酸と EPA を培地に添加し、細胞増殖能を TUHR lacZ 株で測定すると、図4のようにドコサテトラエン酸で細胞増殖の亢進がみられた。このことはドコサテトラエン酸蓄積による細胞増殖促進効果が FABP7 と何らかの因子による増殖抑制効果によって打ち消されている可能性が示唆される。

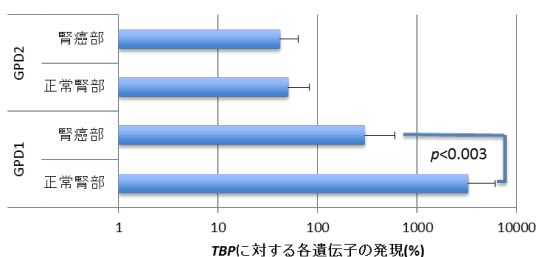
図4. 脂肪酸添加の細胞増殖に与える影響



(3) 腎癌でのグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 発現

解糖系とトリグリセリド合成系を結ぶ代謝経路上にあるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現を腎癌組織と腎正常組織で比較した。図5のように腎正常組織に比較して腎癌組織で GPD1 発現は 1/10 以下へ有意に低下していた。一方、GPD2 発現は腎正常組織と腎癌組織に差はみられなかった。淡明細胞型腎癌では脂肪の蓄積によりグリセロールやトリグリセリド合成系がフィードバック阻害を受け、GPD1 発現が低下した可能性がある。腎癌の GPD1 発現や機能解析は淡明細胞型腎癌の鑑別や治療などに利用できる可能性がある。

図5. 腎癌でのGPD1とGPD2の発現



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2件)

- (1) Takaoka N, Takayama T, Ozono S.: Functional analysis of fatty acid binding protein 7 and its effect on fatty acid of renal cell carcinoma cell lines. BMC Cancer 17(1):192-199, 2017.
- (2) Fujita H, Takayama T, Takaoka N, Tan C, Igarashi H, Sugimura H, Ozono S.: Validity of Tissue Microarray by Immunohistochemistry. Clin Lab 61(5-6):569-574, 2015.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 高岡 直央, 宮崎 美紀, 藤田 博美, 本山大輔, 松本 力哉, 谷島 崇史, 鈴木 孝尚, 杉山 貴之, 大塚 篤史, 古瀬 洋, 河崎 秀陽, 三宅 秀明, 大園 誠一郎: 腎癌細胞株での培養が脳型脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) 発現に与える影響. 第 26 回泌尿器科分子細胞研究会 (2017)
- (2) 高岡 直央, 宮崎 美紀, 藤田 博美, 杉山 貴之, 古瀬 洋, 三宅 秀明, 大園 誠一郎: 腎癌細胞株での脳型脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) が発現する培養条件. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016)
- (3) 高岡 直央, 宮崎 美紀, 古瀬 洋, 田村 啓多, 鈴木 孝尚, 杉山 貴之, 大塚 篤史, 三宅 秀明, 大園 誠一郎: 淡明細胞型腎癌での glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 遺伝子発現の検討. 第 47 回腎癌研究会 (2016)
- (4) 高岡 直央, 河崎 秀陽, 宮崎 美紀, 藤田 博美, 大園 誠一郎: 腎癌細胞株での FABP7 発現を誘導する培養条件. 第 25 回泌尿器科分子細胞研究会 (2016)
- (5) 高岡 直央, 宮崎 美紀, 藤田 博美, 大園 誠一郎: 腎癌細胞株を用いた脳型脂肪酸結合タンパク質 FABP7 の機能解析. 第 46 回腎癌研究会 (2015)
- (6) 高岡 直央, 藤田 博美, 宮崎 美紀, 杉山 貴之, 古瀬 洋, 大園 誠一郎: 腎癌細胞株を用いた脂肪酸結合蛋白質 7 の解析. 日本癌学会 73 回総会 (2014)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大園 誠一郎 (OZONO, Seiichiro)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00183228

(2) 研究分担者

古瀬 洋 (FURUSE, Hiroshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00345828

本山 大輔 (MOTOYAMA, Daisuke)
浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：00727787

高岡 直央 (TAKAOKA, Naohisa)
浜松医科大学・医学部・特任研究員
研究者番号：30467229

(3) 連携研究者 該当者なし

(4) 研究協力者 該当者なし