

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02936

研究課題名(和文) 脂質代謝異常に着目した新規前立腺癌診断・治療の開発

研究課題名(英文) Investigation of novel prostate cancer diagnosis and treatment methods focusing lipid metabolism

研究代表者

井上 貴博 (Inoue, Takahiro)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80511881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞株に含有するPhosphatidylcholine (PC)のtargeted lipidomicsを行い、浸潤能の高い前立腺癌株で不飽和脂肪酸の割合が多いことを見いだした。前立腺癌・前立腺肥大症患者尿中の脂質組成変化や揮発性有機化合物を質量分析法で解析し、前者でPCs/LPC比が前立腺癌患者で有意に高値であることを見いだした。脂質過酸化経路に関わるAKR1C3が前立腺癌組織内や治療抵抗性とともその発現の上昇が有ることを報告し、AKR1C3の阻害作用物質を含有するグリーンプロボリスを限局性前立腺癌術後PSA再発症例に投与する前向き臨床試験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry(MALDI/TOF-MS))を用いて尿中脂質を定量的に測定する方法を確立したことは、今後あらたなバイオマーカーの開発に意義深い。またグリーンプロボリスの前立腺癌に対する世界で初めての臨床試験を行い、癌治療の代替療法の可能性を未来に託した点は社会的に意味があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Targeted lipidomics focused on the phosphatidylcholine (PC) species using preparative mass spectrometry (MS) was performed. The two more aggressive cell lines, PC3 and DU145, had higher percentages of polyunsaturated fatty acids (PUFA)s in their PC than LNCaP. We evaluated urinary lipids and volatile organic compounds by MS and found that the urinary PCs/LPC ratio quantified by MALDI/TOF-MS was significantly higher in the PCa group than in the BPH group in the discovery and validation sets. AKR1C3, which has some role in lipid peroxidation pathway, was significantly stronger expressed by immunostainings than the benign epithelia in patients with localized hormone naive prostate cancer (PC). Moreover, AKR1C3 immunostaining was significantly stronger in castration-resistant PC tissues than in HNPC tissues in the same patients. This single-center, single-arm open trial was conducted for 22 patients who underwent radical prostatectomy and experienced biochemical recurrence.

研究分野：前立腺癌

キーワード：脂質 前立腺癌 尿

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の罹患率急増の背景に生活習慣の欧米化による高脂肪食や肥満の影響があることから、脂質代謝と癌の発生・進展との関連が指摘されている。その要因として、ホルモン依存性癌組織中の脂質代謝は性ホルモンの影響を強く受けていること (Deep G 2016 Int J Mol Science)、癌細胞は低酸素などの微小環境の影響を受けて生存・増殖のために脂質の新規合成や脂質の取り込みと利用を盛んに行っていることが報告されている (Menendez JA 2007 Nat Rev Cancer)。進行性前立腺癌の標準治療はホルモン治療であるが、2~3年以内に去勢抵抗性癌 (CRPC) に変異する。近年 CRPC の治療薬の開発が進み臨床現場でも使用されているが、その効果は限定的で、より悪性の高い癌への変異から治療抵抗性の状態となり死に至る。

最近、様々な癌種の治療抵抗性に脂質過酸化経路が関与する重要な論文が報告され (Viswanathan V 2017 Nature)、治療抵抗性癌の多くが脂質過酸化経路を介する ferroptosis からの回避に依存していることが示された。Ferroptosis は 2012 年に Dixon らが報告した新しい Fe (鉄) 依存的な細胞死のひとつであり、神経変性疾患への関与のみならず癌の治療標的経路としても着目されている。申請者らは前立腺癌患者前立腺マッサージ後尿中に発現の高い Fe 関連タンパク質を質量分析法で見だしており、その臨床応用への可能性を研究中でもある。このように脂質過酸化経路は前立腺癌の発生・進展で重要な key となる経路であると認識している。

2. 研究の目的

前立腺癌発生・進展において、脂質の細胞膜への取り込み・再利用と同時に酸化ストレスなどで細胞膜の脂質から発生する過酸化脂質の活性抑制が重要であると考えている。またその過酸化脂質の代謝産物の一部が尿中に揮発性有機化合物 (volatile organic compounds: VOCs) として発生しているとの仮説を立てている。

上記課題を解決する方略として下記の目的を掲げる。

- (1) 患者由来 xenograft (patient-derived xenograft: PDX) モデル (Inoue T 2017 Nat Rev Urol) や前立腺癌細胞株を用いて解析してきた脂質生合成や代謝に関わる遺伝子群とそれらの脂質組成変化に着目して、脂質過酸化反応に関与する経路が前立腺癌の発症および進展に関与しているとの仮説のもと、本経路の治療標的としての可能性を探索すること。
- (2) 前立腺癌の罹患とともに起こる脂質代謝の産物を生体試料、とくに尿中から検出し、前立腺癌早期診断マーカーとしての可能性を探索すること。

3. 研究の方法

- (1) 前立腺癌患者および前立腺肥大症患者尿中の脂質組成変化

- ① 限局性前立腺癌に対して前立腺全摘除術を受けた 31 例の全摘凍結標本を高感度質量顕微鏡 (high-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (HR-MALDI-IMS)) を用いて網羅的に脂質解析を行った。
- ② 京都大学病院および大阪大学病院で治療した前立腺癌・前立腺肥大症患者から独立して採取した直腸診後尿の target-lipidomics 解析をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI/TOF-MS)) を用いて行った。その際、我々が新たに確立した qShot MALDI 解析法で脂質の定量解析を行った。

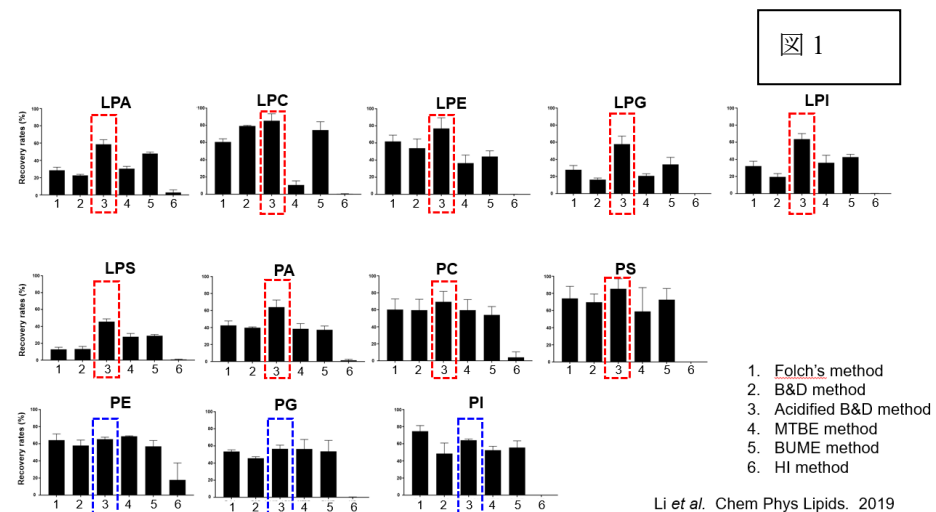
- (2) 前立腺癌および前立腺肥大症患者尿中の揮発性有機化合物の解析

- ① 京都大学病院で診断された前立腺癌および前立腺肥大症患者から採取した直腸診後尿を臭気捕集剤で捕捉し、加熱脱離ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて網羅的に揮発性有機化合物の解析を行った。
- (3) 脂質過酸化反応に関与していると考えられているテストステロン合成経路酵素であるAldo-Keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3)の前立腺癌組織での発現解析
- ① 限局性前立腺癌の全摘除標本および去勢抵抗性前立腺癌組織内のAKR1C3の発現を免疫染色法で評価し、臨床病理学的な因子との関連性を検討した。
- (4) 前立腺癌患者の前立腺全摘後のPSA再発症例に対するグリーンプロポリスの臨床効果と安全性(UMIN000023451)に関する前向き臨床試験
- ① AKR1C3の強力な特異的阻害剤(baccharin)が含有されているグリーンプロポリスに着目し、京都大学病院で治療を行った前立腺癌患者の前立腺全摘後のPSA再発症例に対するグリーンプロポリスの臨床効果と安全性を検討してその成果をまとめた。
- (5) 細胞膜上に豊富なPhosphatidylcholine (PC)の前立腺癌細胞株におけるtargeted-lipidomics解析
- ① アンドロゲン依存性の高分化型細胞株LNCaP、アンドロゲン非依存性の低分化型細胞株PC3、DU145からそれぞれPCを抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析装置・液体クロマトグラフィー質量分析法(Liquid chromatograph mass spectrometry LCMS)にてPCのtargeted lipidomicsを行った。

4. 研究成果

- (1) m/z490-1000の領域でpositive ionizationモードで脂質解析を行った。その結果Phosphatidylcholine (PC)(34:1)とPC(34:2)はがん組織と正常組織とで差異は認めなかったが、lysophosphatidylcholine (LPC)(16:0)はがん組織で有意に発現低下していた。その結果[PC(34:2) + PC(34:1)]/LPC(16:0)は対応するがん組織と正常組織とで有意に差異を認めた。尿中脂質のMALDIを用いた解析に最適な抽出方法を確立した。これまで報告のある Folch法、Bligh&Dyer法、Acidified Bligh&Dyer法、Methyl-tert-Butyl Ether(MTBE)法、1-butanol&methanol (BUME)法、Hexan&isopropanol (HI)法でそれぞれ尿中の脂質抽出を行い、もっとも回収率のよかったのはAcidified Bligh&Dyer法であった (図1)。またMALDIによる尿中脂質解析で

はmatrixとして5mMの9-AAが最適であることも確認した(Li X, Inoue T et al. Chem Phys



Lipids 2019)。

ヒト尿中にはほとんど検出されない脂質を内標に入れることで尿中の脂質をMALDI法で定量解析する方法を確立し、尿中に含有する微量の脂質の定量ができるようになった(qShot MALDI解析法)。そこで組織内で検出した先の3つの脂質をMALDI/TOF-MS²法を用いて尿中で同定した。さらに先の組織で見いだした脂質組成比[PC (34:2) + PC (34:1)]/LPC (16:0)がヒト尿中でも同様の結果になるかどうかを京都大学病院で採取した前立腺癌84例および前立腺肥大症47例の尿中で確認した。さらに独立して採取した大阪大学病院で採取した前立腺癌74例および前立腺肥大症59例の尿でも検証した。その結果、血清PSA値では前立腺癌症例と前立腺肥大症症例とではいずれの施設でも差異はなかったが、脂質組成比[PC (34:2) + PC (34:1)]/LPC (16:0)は前立腺癌症例で有意に高かった。

ただし、脂質組成比[PC (34:2) + PC (34:1)]/LPC (16:0)は癌の悪性度や病期・悪性度との関係性は認めなかった。以上の結果は現在論文投稿中である。

(2) 京都大学病院で診断された前立腺癌および前立腺肥大症患者から採取した直腸診後尿を臭気捕集剤で捕捉し、加熱脱離ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて網羅的に揮発性有機化合物の解析を行った。図2のように揮発性有機化合物のシグナルは検出できたが、公のデータベースなどを用いてその同定を試みたが、いまだに物質の同定には至っていない。

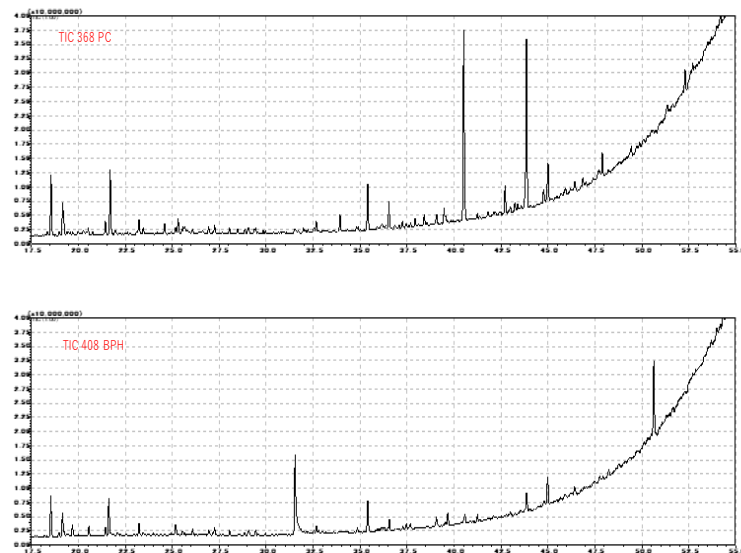


図 2

(3) 京都大学病院でおこなった限局性前立腺癌に対する前立腺全摘除術標本を用いて作成した tissue array を AKR1C3 特異的抗体にて免疫染色を行い解析した。その結果、同一標本内の前立腺癌組織は正常組織に比べ AKR1C3 の発現が有意に高かった ($p < 0.0001$)。さらに AKR1C3 の発現強度に基づいて前立腺癌症例を 2 群に分けて PSA 再発率の違いを Kaplan-Meier 法で検討すると、

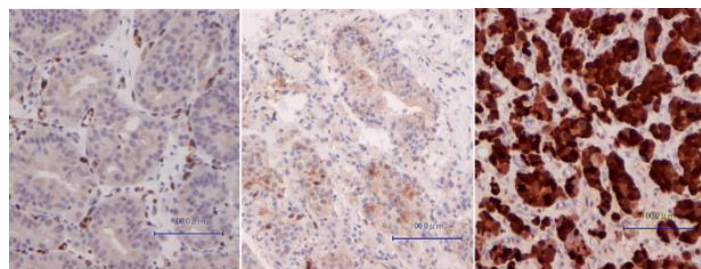


図 3

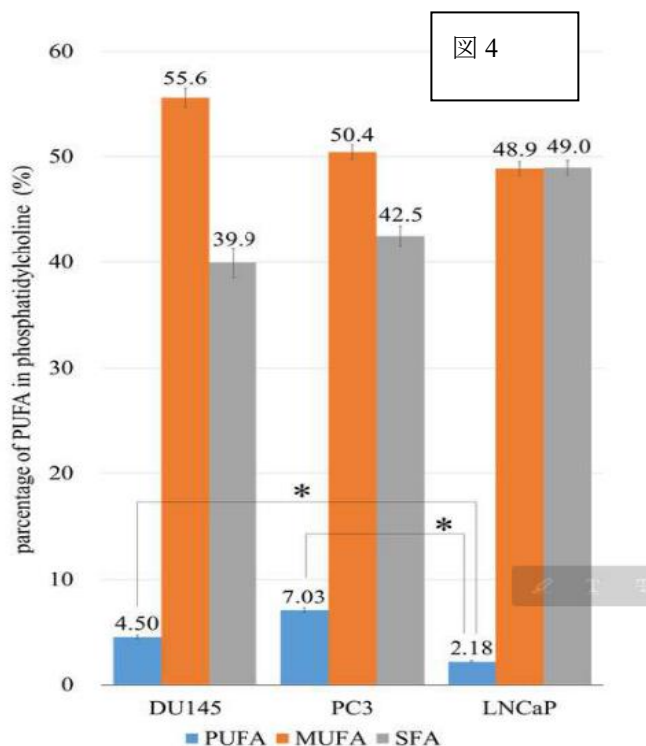
Cancer progression to CRPC

AKR1C3の発現の高い方が再発率は高く、AKR1C3の発現は臨床病理学的因子を含む多変量解析で有意な因子となった。さらに興味深いことにホルモン未治療(HNPC)の時に去勢抵抗性癌(CRPC)に変異した時の双方の組織採取が可能であった11例の症例のうち6例でHNPCに比べCRPC時にAKR1C3の発現上昇を認めた(図3)。AKR1C3はCRPCのシーズになりうる可能性が示唆された(Miyazaki Y, Inoue T et al. J Clin Med 2019)。

(4) 前立腺癌患者の前立腺全摘後のPSA再発症例に対するグリーンプロポリスの臨床効果と安全性(UMIN000023451)に関する前向き臨床試験では22例の登録を行い、アピ株式会社から提供いただいたグリーンプロポリスソフトカプセルを1日9錠投与した。PSA奏効率(Primary endpoint)は0%であり、グリーンプロポリスのPSA再発に対する効果を認めなかった。Secondary endpointとして掲げたPSA slope(PSA-doubling timeの逆数)は22例中15例(68.2%)の症例で低下しており、弱いながら一定の効果を確認できた。とくにこれら前立腺全摘除術採取標本のAndrogen receptorやAKR1C3の発現の低いほどPSA slopeの低下を認める傾向にあった。今回の臨床試験ではグリーンプロポリスのPSA低下効果を認めなかったが、投与したグリーンプロポリスに含有されるAKR1C3を阻害するdrupaninやbaccharinの量が少ないことが一因と推測され、今後はさらに濃縮されたグリーンプロポリスソフトカプセルの開発と投与が期待される。なお本試験の結果は現在論文投稿中である。

(5) 前立腺癌細胞に含有されるPC中の40種の脂肪酸を同定した。濃度が既知の37種の脂肪酸メチルエステルを標準物質と

して細胞内のPCに含有される脂肪酸の組成を定量した。脂肪酸を単価脂肪酸(SFA)、1価不飽和脂肪酸(MUFA)、多価不飽和脂肪酸(PUFA)に分けると多価不飽和脂肪酸の割合はDU145、PC3、LNCaPの順で4.50 ± 0.19%, 7.03 ± 0.24%, and 2.18 ± 0.10%であった。浸潤能の高いアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株(DU145・PC3)でPUFAの割合が高かった(図4)。細胞膜に多いPCの脂肪酸組成がPUFAに偏ると細胞膜の流動性が高くなるので、この結果は細胞の浸潤能や転移能があがることに関係していると推測された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki Yu, Teramoto Yuki, Shibuya Shinsuke, Goto Takayuki, Okasho Kosuke, Mizuno Kei, Uegaki Masayuki, Yoshikawa Takeshi, Akamatsu Shusuke, Kobayashi Takashi, Ogawa Osamu, Inoue Takahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Consecutive Prostate Cancer Specimens Revealed Increased Aldo Keto Reductase Family 1 Member C3 Expression with Progression to Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 601 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8050601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li Xin, Nakayama Kenji, Goto Takayuki, Akamatsu Shusuke, Shimizu Koji, Ogawa Osamu, Inoue Takahiro	4. 巻 223
2. 論文標題 Comparative evaluation of the extraction and analysis of urinary phospholipids and lysophospholipids using MALDI-TOF/MS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104787 ~ 104787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2019.104787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li X, Nakayama K, Goto T, Akamatsu S, Shimizu K, Ogawa O, Inoue T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Data processing on a comparative evaluation of the extraction and analysis procedures for urinary phospholipid and lysophospholipid using MALDI-TOF/MS.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104275.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Ryosuke, Goto Takayuki, Kohno Shigeshi, Kita Yuki, Shimizu Hironori, Kobayashi Takashi, Yamasaki Toshinari, Ogawa Osamu, Inoue Takahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Arteriovenous fistula after robot assisted laparoscopic prostatectomy: A rare case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 184 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue T, Kaneko T, Muramatsu S, Kimura H, Yoshino T, Goto T, Sawada A, Akamatsu S, Kobayashi T, Yamasaki T, Kaya T, Ogawa O	4. 巻 18
2. 論文標題 LacdiNAc-glycosylated Prostate-Specific Antigen density is a potential biomarker of prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Genitourin Cancer.	6. 最初と最後の頁 e28-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clgc.2019.10.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato M, Sasaki T, Inoue T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Current experimental human tissue-derived models for prostate cancer research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 150-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14441.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li X, Nakayama K, Goto T, Akamatsu S, Kobayashi T, Shimizu K, Ogawa O, Inoue T.	4. 巻 10
2. 論文標題 A narrative review of urinary phospholipids: from biochemical aspect towards clinical application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Androl Urol	6. 最初と最後の頁 1829-1849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tau-20-1263.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 井上 貴博
2. 発表標題 患者由来組織ゼノグラフトモデルを用いた泌尿器悪性腫瘍研究の現状と課題
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡所 広祐、井上 貴博 他
2. 発表標題 Evaluation of phospholipid profiles of prostate cancer cell lines by LCMS analysis
3. 学会等名 39th SIU (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 新、井上 貴博 他
2. 発表標題 MALDI-TOF/MS Analyses of Urinary Phospholipids and Lysophospholipids as Potential Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer
3. 学会等名 MSACL 2019 EU (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 新、井上 貴博 他
2. 発表標題 Do Altered Urinary Phospholipid and Lysophospholipid Compositions Become Potential Biomarkers for Prostate Cancer?
3. 学会等名 第76回日本癌学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 新、井上 貴博 他
2. 発表標題 Urinary phospholipids by MALDI-TOF/MS analyses are potential biomarkers for prostate cancer
3. 学会等名 The Urological Association of Asia Congress (UAA) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡所 広祐、井上 貴博 他
2. 発表標題 LCMSによる前立腺癌細胞株におけるリン脂質発現の評価
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡所 広祐、井上 貴博 他
2. 発表標題 Evaluation of phospholipids expression in prostate cancer cell lines in LCMS
3. 学会等名 第35回日韓泌尿器科会議（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 新、井上 貴博 他
2. 発表標題 MALDI-TOF/MS Analyses Determined Urinary Phospholipids as a Potential Biomarker for Prostate Cancer
3. 学会等名 22nd International Mass Spectrometry Conference 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡所 広祐、井上 貴博 他
2. 発表標題 Evaluation of phospholipid profiles of prostate cancer cell lines by LCMS analysis
3. 学会等名 前立腺生物学シンポジウム 伊勢志摩2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 貴博
2. 発表標題 mHSPCに対するupfront治療パラダイムシフトを迎えて:ホルモン感受性オリゴメタ前立腺癌に対する治療戦略
3. 学会等名 日本泌尿器科学会中部総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 貴博
2. 発表標題 ホルモン未治療高リスク前立腺癌(M0/M1 CSPC)に対する治療戦略
3. 学会等名 第56回日本がん治療学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue T, Li X, Sumiyoshi T, Nakayama K, Mizuno K, Okasho K, Goto T, Akamatsu S, Ogawa O.
2. 発表標題 Genomics and lipidomics analysis of blood and urine toward prostate cancer precision medicine
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayama K, Li X, Goto T, Akamatsu S, Shimizu K, Ogawa O, Inoue T.
2. 発表標題 Lipidomics for the Molecular Diagnosis of Prostate Cancer
3. 学会等名 7th European Lipidomics Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xin Li, Kenji Nakayama, Takayuki Goto, Shusuke Akamatsu, Yujiro Hayashi, Kazutoshi Fujita, Takashi Kobayashi, Norio Nonomura, Osamu Ogawa, and Takahiro Inoue
2. 発表標題 The Urinary Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio as a Novel Diagnostic Index for Prostate Cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 前立腺癌の判定法	発明者 井上貴博、小川修、 赤松秀輔、後藤崇 之、李新、清水公治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2020-34556	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 崇之 (Goto Takayuki) (90806605)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	中山 憲司 (Nakayama Kenji) (30442594)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	清水 公治 (Shimizu Koji) (50395901)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	加藤 学 (Kato Manabu) (60626117)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 豪 (Sasaki Takeshi) (20644941)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	山崎 俊成 (Yamasaki Toshinari) (00607749)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	澤田 篤郎 (Sawada Atsuro) (10784796)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関