

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09708

研究課題名(和文) microRNA発現からみた脂肪細胞の前立腺癌細胞への作用解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of the effects of adipocytes on prostate cancer cells from the viewpoint of microRNA expression and its clinical application

研究代表者

渡邊 昌俊 (Watanabe, Masatoshi)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90273383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、前立腺癌の進行リスクは、肥満度に比例するという報告などを基に、前立腺癌細胞と脂肪細胞の相互作用に着目し、in vitro培養系で、脂肪細胞により誘導される前立腺癌細胞のmicroRNAの発現および機能解析を行った。脂肪細胞由来の培養液が、前立腺癌細胞の増殖、移動、浸潤能に影響を与え、前立腺細胞株により異なるmicroRNA発現パターンを示し、抽出したmiR-5787が増殖能や移動能に關与することを認めた。これらより、microRNA発現制御を介して、脂肪細胞が前立腺癌細胞に影響を与えることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の発生と進展は、肥満と關係するという疫学的報告もあるが、必ずしも一致した結果は出ていない。一方、細胞生物学的な解析より、adipocytokineなどの脂肪細胞から分泌される物質が、前立腺癌細胞の挙動に影響することが報告されている。ここに、そのメカニズムの一つとして、前立腺癌細胞内でのmicroRNAを介した機序の可能性を示し、診断、治療への可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the interaction between prostate cancer cells and adipocytes based on reports about the relationship between the risk of prostate cancer progression and the degree of obesity, and analyzed microRNA expression and function in prostate cancer cells induced by adipocytes in an in vitro culture system. We found that adipocyte-conditioned medium affected the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells, and that different prostate cell lines showed different microRNA expression patterns, indicating that the extracted miR-5787 was involved in proliferation and migration potential. From these results, we proved that adipocytes affect prostate cancer cells through the regulation of microRNA expression.

研究分野：腫瘍病理、医工学

キーワード：前立腺癌 脂肪細胞 microRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦の前立腺癌は、高齢化および社会生活の西洋化に伴い着実に上昇し、2020-24年にはその罹患数は男性の癌罹患数の第1位になると予測され、米国と同様に社会的にも憂慮される。前立腺癌の基礎・臨床上的研究課題は、浸潤・転移及び去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC)への移行であり、前立腺癌患者に不幸な結末をもたらす。もし前立腺癌が局所で制御されるなら、予後も変わりうると考えられる。癌の進展過程は、原発巣での腫瘍細胞の増生、局所浸潤、脈管への浸潤、脈管内での生存、循環そして生着、増殖という複雑な過程であるとされる。この過程において、癌細胞自身のみに基づく理解では進展の過程は理解できず、癌細胞周囲の間質を含む腫瘍微小環境の関与が注目されている。すなわち癌細胞が局所で増殖し、原発巣を形成する時、癌細胞の性質は立体構造由来の階層性(酸素、二酸化炭素、代謝物などの濃度勾配の発生やストレス)や他の細胞との相互作用により変化すると考えられている。前立腺癌でも同様と考えられ、腫瘍微小環境が HIF-1 α を介して前立腺癌細胞の浸潤・転移能の上昇、転移の誘導、間質細胞との協働で副腎性アンドロゲン DHEA から DHT への促進を含めた去勢抵抗性獲得への関与あるいは抗癌剤抵抗性獲得、骨転移時の微小環境の重要性が報告されている。

腫瘍微小環境には、癌細胞以外に脂肪細胞、線維芽細胞、免疫系細胞、血管などから構成されている。腫瘍微小環境の細胞間の相互作用には、サイトカインやホルモンが知られていたが、最近ではエクソソームが重要な役割を果たしていると考えられる。エクソソームはタンパク質や核酸などを含み、細胞外へ放出され、離れた部位あるいは周囲の細胞に影響を及ぼすと考えられている。エクソソームの内容物に microRNA も存在することが明らかにされている。microRNA は、癌細胞の生物学的特性のみならず、腫瘍微小環境形成にも関与していると報告されている。

申請者らはヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞や線維芽細胞のリコンビネーションモデルを構築し、前立腺癌の進展及び CRPC への進展には脂肪細胞あるいは癌関連線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs)が産生する増殖因子やサイトカイン、細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM)が前立腺癌細胞の進展などに腫瘍微小環境が重要な役割を担うことを報告してきた (Ito, Watanabe *et al.*, *Prostate*, 2015; Ishii, Watanabe *et al.*, *J. Clin. Med.*, 2018)。脂肪細胞との関係において、疫学的に肥満と癌との関係が報告され、また高脂肪食や脂肪細胞の発癌あるいは癌の進展への影響が細胞あるいは動物レベルで自例を含めて報告されている (Fujiwara, Watanabe *et al.*, *Gut*, 2008)。特に脂肪細胞特有あるいは炎症系サイトカインなどのタンパク質が前立腺癌細胞の進展に影響することが比較的多く報告されているが、癌細胞および腫瘍微小環境における microRNA の関与におけるデータは極めて少ない。そのため、申請者らはリスクと考えられる肥満、組織学的には肥満細胞による前立腺癌細胞の増殖・進展を制御する microRNA の働きを制御することができれば、より効率的に前立腺癌の増殖・進展を抑制することが可能と考えた。

2. 研究の目的

前立腺癌の腫瘍微小環境を仮定した共培養系 (あるいは conditioned medium) のもとで、脂肪細胞/癌関連脂肪細胞による前立腺癌細胞の細胞挙動の変化(細胞増殖、移動能、浸潤能など)、前立腺癌細胞およびエクソソーム内在 microRNA 発現を網羅的に解析し、主要な microRNA を抽出し、その機能を解析する。腫瘍微小環境における脂肪細胞/癌関連脂肪細胞の重要性を microRNA の発現制御の面から *in vitro*系で明らかにする。これにより、微小環境を構成する細胞を標的にする療法が CRPC を含む前立腺癌の進展を阻止する可能性を科学的に検証する。また、前立腺癌細胞の microRNA 発現のデータをもとに、臨床検体での発現解析を行い、診断および治療への応用展開の可能性を探る。

3. 研究の方法

脂肪細胞/癌関連脂肪細胞の影響による前立腺癌細胞株 (DU145, PC-3)の挙動解析: ヒト白色脂肪前駆細胞 (HWP subcutaneous, PCI) をプロトコールに従い、成熟脂肪細胞に分化誘導した。その成熟脂肪細胞より条件培地 (CM: conditioned medium) を回収し、使用時まで -80 で保存した。細胞増殖能は、WST-8 cell proliferation kit (OZB, CA) を用いて測定した。また、細胞遊走能は Wound healing assay を、細胞浸潤能は Matrigel invasion chamber (BD Biosciences, NJ) を用いて Invasion assay を行なった。

脂肪細胞/癌関連脂肪細胞の影響による前立腺癌細胞株の microRNA 発現のプロファイリング: PC-3 あるいは DU145 細胞を、コントロールおよび CM 培養で、24 時間あるいは 48 時間後に回収し、microRNA を回収し、Agilent G4870C SuperPrint G3 Human v21 miRNA 8x60K Microarray

kitを用いて、Aligent G2600D SureScan Microarray Scanner で取り込み、Agilent Feature Extraction v11.5 で数値化を行なった。

抽出 microRNA の機能解析： の解析より、CM 培養での DU145 細胞株で抽出された microRNA の発現を確認した。さらに、抽出された microRNA を mimic を用いて、一過性発現 DU145 細胞株を作成し、細胞増殖能、運動能を確認した（横浜国立大学共同研究）。

4 . 研究成果

脂肪細胞 / 癌関連脂肪細胞の影響による前立腺癌細胞株 (DU145, PC-3) の挙動解析： コントロール群に比べ、DU145 細胞株は 24 時間 ($p < 0.05$)、48、72 時間 ($p < 0.01$) の有意差を持って増殖し、PC-3 細胞株は 24、48、72 時間 ($p < 0.001$) の有意差を持って増殖した。細胞遊走能は、両細胞株ともに有意差を持ち促進されることが確認された ($p < 0.05$)。細胞浸潤能は、同様に両細胞株ともに有意差を持ち促進されることが確認された ($p < 0.01$)。本研究で用いた脂肪細胞の CM では、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株に対して、細胞増殖、遊走、増殖を促進することが明らかになった。

脂肪細胞 / 癌関連脂肪細胞の影響による前立腺癌細胞株の microRNA 発現のプロファイリング： 数値化ソフト Feature Extraction から出力したデータから、シグナル強度が十分に強くてプローブに対応する microRNA が発現しているといえるプローブのシグナル強度をカツゲンプロファイルとしてまとめた。microRNA プローブ 2549 種類に対して検出数は 235-289 個となった。階層的クラスタリング解析では、PC-3 と DU145 細胞株は遠く離れたクラスタを形成し、microRNA 発現の挙動が異なることが明らかになった。PC-3 細胞株では、CM より培養時間による影響が大きかった。一方、DU145 細胞株では、CM とコントロールの発現パターンが異なることが明らかになった。各グループでの発現比で Log2 値が 1 以上または -1 以下の microRNA を選択したところ、65 個の microRNA が認められた。発現比の絶対値が大きいものの中で、2 つの細胞株がともに、24 時間後より 48 時間後に発現が高くなった has-microRNA-5787 を抽出した。

抽出 microRNA の機能解析： CM で培養した DU145 細胞株において、24、48 時間後に has-microRNA-5787 の発現は、コントロールに比較して高くなった (48 時間後 $p < 0.01$)。脂肪細胞分泌物により、前立腺癌細胞株 DU-145 での has-microRNA-5787 の発現が誘導されると考えられた。この has-microRNA-5787 一過性発現 DU145 細胞株を利用した細胞増殖能および運動能の解析では、72 時間後に細胞増殖を有意に上昇を認め ($p < 0.05$)、運動能も同様に有意に上昇を認めた ($p < 0.05$)。

以上の in vitro 系の解析結果より、(1) 脂肪細胞が前立腺癌細胞に悪性方向の挙動に向かわせる、(2) DU145 細胞において、adipocytokines を含む脂肪細胞の分泌物で誘導発現される microRNA は 65 個であった、(3) その中の一つである has-microRNA-5787 発現は CM 培養での前立腺癌細胞株 DU-145 で上昇した。has-microRNA-5787 の一時的な高発現細胞株においても、細胞増殖や運動能は上昇されるも、CM 培養で認められた前立腺癌細胞株の挙動変化への影響は、他の microRNA を含めた因子が関わっている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kajiwara Shinya, Ishii Kenichiro, Sasaki Takeshi, Kato Manabu, Nishikawa Kohei, Kanda Hideki, Arima Kiminobu, Watanabe Masatoshi, Sugimura Yoshiki	4. 巻 100
2. 論文標題 Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0352-4	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 Hirokawa Yoshifumi S., Kanayama Kazuki, Kagaya Michiko, Shimojo Naoshi, Uchida Katsunori, Imai Hiroshi, Ishii Kenichiro, Watanabe Masatoshi	4. 巻 117
2. 論文標題 SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104542 ~ 104542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2020.104542	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 Kim Yelee, Park Jun Bum, Fukuda Junji, Watanabe Masatoshi, Chun Yang-Sook	4. 巻 13
2. 論文標題 The Effect of Neddylation Blockade on Slug-Dependent Cancer Cell Migration Is Regulated by p53 Mutation Status	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 531 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030531	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊昌俊、大里里紗、飯島一智、白杵恵梨、上村博司
2. 発表標題 前立腺癌細胞挙動におけるRhoA-cofilin系の挙動
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣昌樹、笠原広介、山川大史、松田知世、渡邊昌俊
2. 発表標題 一次線毛と細胞増殖・分化・癌化
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masatoshi Watanabe, Eri Usugi, Ysuhisa Nakagawa, Kenichiro Ishii, Yoshifumi Hirokawa, and Hiroji Uemura
2. 発表標題 Modulation of RhoA-cofilin pathway by Zyxin in prostate cancer cells
3. 学会等名 アメリカ癌学会(AACR)（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊昌俊
2. 発表標題 がん研究の巨大な潮流の中で：腫瘍微小環境を標的に
3. 学会等名 明治大学先端数理科学インスティテュート「現象数理学研究拠点」共同研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊昌俊、中野洋
2. 発表標題 カーボンナノチューブ暴露におけるがん細胞株のmicroRNA網羅的発現解析
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塩里沙、中川泰久、渡邊昌俊、飯島一智
2. 発表標題 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性におけるmiRNA発言の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	上村 博司 (Uemura Hiroji) (50244439)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授 (22701)	
研究分担者	石井 健一郎 (Ishii Kenichiro) (90397513)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

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
---------	---------