

平成24年4月20日提出

対象研究テーマ：中皮腫の同所移植モデルを用いた進展機構解明と標的分子の探索

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：癌細胞と脂肪細胞の接触による相互作用の検討

研究代表者：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授 上原久典

研究成果の概要：

様々な腫瘍の進展過程において癌細胞の脂肪組織への浸潤が認められる。近年、脂肪組織は中性脂肪の貯蔵だけでなく、炎症性サイトカインを含む多くの活性物質を放出する内分泌器官としても重要であることが明らかになってきている。従って、脂肪組織に浸潤した癌細胞と脂肪細胞の間には何らかの相互作用が働いている可能性があるが、それについてはこれまで十分な検討が行われていない。本研究では脂肪細胞と癌細胞の共培養モデルを確立し、脂肪細胞との接触による癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、乳癌細胞が成熟脂肪細胞と接触することによって secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) や乳癌の進展との相関が報告されているいくつかの遺伝子の発現上昇を示すこと、および脂肪細胞で脂肪分化マーカーの発現が低下することがわかった。また、脂肪前駆細胞の培養上清が乳癌や前立腺癌細胞の浸潤を促進すること、および脂肪細胞から分泌される FABP4 が前立腺癌細胞の浸潤を促進することが明らかになった。以上より、乳癌細胞が脂肪細胞に接触した際には脂肪細胞を幼若化し、浸潤に有利な環境を形成すること、および脂肪細胞が分泌する FABP4 が腫瘍浸潤を促進する可能性が示唆された。

研究分野：癌の微小環境

キーワード：脂肪細胞、癌の浸潤、細胞接触、網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

これまでに金沢大学がん研究所腫瘍内科 矢野聖二教授との共同研究において、前立腺癌、肺癌、乳癌などの細胞株を用いて癌細胞と骨芽細胞の直接接触による相互作用を検索するための共培養モデルを確立し、癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析することによって、PC3 ヒト前立腺癌細胞では骨芽細胞からの液性因子のみでは有意な遺伝子発現の変動はみられず、骨芽細胞と接触することによってはじめて IL-1 β 、COX-2、IL-6 など代表的な破骨細胞誘導関連遺伝子の発現が上昇し、これに cadherin-11 や N-cadherin が部分的に関与していることを明らかにした (Br J Cancer 104: 505-513, 2011)。

2. 研究の目的

様々な腫瘍の進展過程において癌細胞の脂肪組織への浸潤が認められる。腹腔内、縦隔、皮下などには多量の脂肪組織が含まれており、例えば消化器癌は腹腔内脂肪組織に、肺癌や胸膜中皮腫は縦隔の脂肪組織に、乳癌や皮膚癌は皮下脂肪組織にそれぞれ浸潤する。近年、脂肪組織は中性脂肪の貯蔵だけで

なく、炎症性サイトカインを含む多くの活性物質を放出する内分泌器官としても重要であることが明らかになってきている。従って、脂肪組織に浸潤した癌細胞と脂肪細胞の間には何らかの相互作用が働いている可能性があるが、それについてはこれまで十分な検討が行われていない。

本研究では脂肪細胞と癌細胞との共培養モデルを確立し、脂肪細胞との接触による癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析し、癌細胞の増殖、浸潤への脂肪細胞の関与を明らかにすることを目的とし、これによって新しい分子標的治療の開発に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

1) cDNA マイクロアレイを用いた脂肪細胞との接触による乳癌細胞の遺伝子発現の網羅的解析

女性の胸部脂肪組織から採取された脂肪前駆細胞を脂肪分化培地で2週間培養することにより得られた成熟脂肪細胞とヒト乳癌細胞株 MCF7 を用いた。MCF7 細胞を蛍光色素でラベルした後、cell culture insert を用いた癌細胞と脂肪細胞の二層培養（癌細

胞と脂肪細胞の相互作用が液性因子のみ)、および癌細胞と脂肪細胞を混合して培養する接触培養(癌細胞と脂肪細胞の相互作用が液性因子と直接接触の2つ)を行った。培養は無血清状態で48時間行い、接触培養については培養終了後にソーティングを行い、脂肪細胞と癌細胞を分離した。コントロールとして単独で培養したMCF7細胞を用いた。

培養終了後に得られたMCF7細胞からmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイを行った。また、脂肪細胞を色素で標識し、同様の方法で培養を行い、得られた脂肪細胞を用いたマイクロアレイも行った。

2) 成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清が癌細胞の浸潤に及ぼす影響

マイクロアレイの結果から、MCF7細胞と成熟脂肪細胞が接触することにより脂肪細胞の分化が抑制されることが分かったので、この現象が癌細胞にとって有利であるかどうかを調べるために、成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清を用いて invasion assay を行った。MCF7細胞は invasion assay に適さないため、ヒト乳癌細胞のMDA-MB-231、およびヒト前立腺癌細胞PC-3を用いた。

3) Fatty acid binding protein 4 (FABP4)が癌細胞の浸潤に及ぼす影響

脂肪細胞から分泌されるFABP4が癌の浸潤に及ぼす影響を調べるためにヒト前立腺癌細胞PC-3、DU145を用いて invasion assay を行った。また、アラキドン酸がPC-3細胞の浸潤を促進し、ドコサヘキサエン酸(DHA)がその効果を抑制することが分かっているが、このモデルにFABP4が及ぼす影響についても検討した。

4. 研究成果

1) ヒト乳癌細胞MCF7とヒト成熟脂肪細胞を用いて二層培養、および接触培養を行い、単独で培養した乳癌細胞、あるいは成熟脂肪細胞をコントロールとした。それぞれの培養システムにおけるMCF7細胞の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイを用いて比較したところ、10倍以上の発現の変動がみられた遺伝子は、二層培養と接触培養間で12個(いずれも接触培養により発現上昇)あったが、単独培養と二層培養間では認められなかった。接触培養によって最も高い発現上昇を示したのは、脂肪細胞の分化を抑制することが知られている secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) で、約52倍であった。続いて、decorin, microfibrillar associated protein 5, MMP 2, periostin がいずれも15倍以上の発現上昇を示していた。Decorin以下の4つの遺伝子についてはいずれも乳癌の進展と相関するという報告があり、乳癌細胞と脂肪細胞が接触することで

腫瘍浸潤が促進される可能性を示唆する結果であった。SPARCについては、SPARCが結合する受容体の1つである stabilin-1 を分泌するように遺伝子導入を行ったMCF7細胞をヌードマウス皮下に移植し、SPARCが捕捉されることで腫瘍増殖が抑制されるかどうかを現在検討している。

一方、脂肪細胞については、接触培養において脂肪分化マーカーであるFABP4, PPAR γ , C/EBP α の発現がそれぞれ0.03倍、0.15倍、0.29倍と低下していたことから、癌細胞との接触によって脂肪細胞の分化が抑制されることが示唆された。

2) 癌細胞との接触による脂肪細胞分化の抑制が癌細胞に及ぼす影響を調べるために、成熟脂肪細胞、および脂肪前駆細胞の培養上清を用いて invasion assay を行った。ヒト乳癌細胞のMDA-MB-231、およびヒト前立腺癌細胞PC-3はいずれも脂肪前駆細胞の培養上清によって有意に浸潤が促進されたことから、癌細胞は脂肪分化を抑制することによって浸潤に有利な環境を形成していると考えられた。

3) 脂肪細胞は血中にFABP4を放出していることが知られているが、FABP4が腫瘍に及ぼす影響についてはほとんどわかっていない。FABP4を添加して invasion assay を行うと、用量依存的にヒト前立腺癌細胞の浸潤が促進された。また、FABP4はアラキドン酸のPC-3細胞に対する浸潤促進効果には影響を及ぼさなかったが、DHAの浸潤抑制効果を阻害した。FABP4と脂肪酸の結合を阻害する薬剤を添加することによってFABP4の作用は減弱した。これらの結果から、FABP4が特定の脂肪酸と結合することによってその脂肪酸の癌細胞への作用を阻害している可能性が示唆された。

以上より、乳癌細胞が脂肪細胞に接触した際には脂肪細胞を幼若化し、浸潤に有利な環境を形成すること、および脂肪細胞が分泌するFABP4が腫瘍浸潤を促進する可能性が示唆された。

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 0件)

論文作成中

〔学会発表〕(計 2件)

上原久典、泉啓介 FABP4が前立腺癌細胞の増殖・浸潤に及ぼす影響 第20回日本がん転移学会学術総会

上原久典、高橋徹行、渡邊俊介、泉啓介 FABP4が前立腺癌の運動性と浸潤性に及ぼす影響 第70回日本癌学会学術総会

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部
環境病理学分野・准教授 上原久典

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野 聖二