

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16685

研究課題名(和文) マイクロRNAを基点とした前立腺肥大症・前立腺癌特異的分子経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathway of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer based on microRNA.

研究代表者

山田 康隆 (YAMADA, YASUTAKA)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30814595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は前立腺癌臨床検体から作成したマイクロRNA発現プロファイルの中から、癌組織で発現低下の認められるmiR-455に着目し、機能解析結果から癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。制御する遺伝子群の中で前立腺癌患者予後と有意な相関を示したPIR(member of the cupin superfamily)に着目した。PIRはホルモン感受性前立腺癌・去勢抵抗性前立腺癌において過剰発現しており、siRNA及びinhibitor (bisamide)により癌細胞の遊走能・浸潤能を顕著に抑制した。これら結果からPIRは進行前立腺癌における新規バイオマーカー及び治療標的となる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間中に我々は、新規癌抑制型マイクロRNAを起点とした機能性RNA分子ネットワーク解析を行い、治療抵抗性前立腺癌における新規治療標的分子を探索した。これまでの治療抵抗性前立腺癌における治療の中心として、アンドロゲン受容体を標的としたより強力な抗アンドロゲン剤であったが、本研究結果から得られた候補分子は既存の治療とは異なる経路を標的とするものであり、新たな治療戦略としての可能性を示したといえる。ホルモン依存性の癌である前立腺癌において、アンドロゲン非依存性に増殖能を獲得した治療抵抗性前立腺癌に対する新規治療法の開発は、罹患数の増加が顕著な前立腺癌治療において非常に意義の大きいものである。

研究成果の概要(英文)：miRNA expression signatures by RNA sequencing showed that the miR-455-duplex (miR-455-5p and miR-455-3p) acted as antitumor miRNAs in prostate cancer(PCa) cells. Based on a large patient cohort in The Cancer Genome Atlas, expression of eight miR-455-5p/-3p target genes (PIR: P = 0.0137, LRP8: P = 0.0495, IGFBP3: P = 0.0172, DMBX1: P = 0.0175, CCDC64: P = 0.0446, TUBB1: P = 0.0149, KIF21B: P = 0.0336, and NFAM1: P = 0.0013) was significantly associated with poor prognosis of PCa patients. Here, we focused on PIR (pirin), a highly conserved member of the cupin superfamily. PIR expression was directly regulated by miR-455-5p, and PIR overexpression was detected in hormone-sensitive prostate cancer (HSPC) surgical specimens and CRPC autopsy specimens. Loss-of-function assays using siRNA or an inhibitor (bisamide) showed that downregulation of PIR expression blocked cancer cell migration and invasion. PIR might be a promising diagnostic marker and therapeutic target for HSPC and CRPC.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 前立腺肥大症 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米で罹患率第1位、死亡率第2位の癌であり、本邦においても高齢化社会の到来と食生活の欧米化により、2015年の統計で男性の癌罹患率が胃癌を抜いて第1位となった。それに伴い、前立腺癌死亡者数も増加の一途をたどっており、治療及び研究対象として非常に重要な疾患である。手術療法や放射線治療が適応にならない進行前立腺癌症例に対しては、男性ホルモンであるアンドロゲンの遮断を目的とした全身療法が行われる。このアンドロゲン除去療法は、平均して約数年で治療抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌と呼ばれる病態に進展する。去勢抵抗性前立腺癌における現在の主な治療法としては、より強力な抗アンドロゲン剤を用いる事が多く、さらに抵抗性を示した場合にはタキサン系抗がん剤治療のみとなる。しかしながら、これら治療法も予後延長効果は数か月とされ、多くの症例で再燃を来す。そのため去勢抵抗性前立腺癌の予後は、報告に差はあるものの2年前後とするものが多く、その予後は不良である。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロRNAを起点とした機能性RNA解析を用いて、去勢抵抗性前立腺癌における新規予後マーカー及び治療標的となり得る分子を探索する事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、去勢抵抗性前立腺癌へ進展し、死に至った剖検検体から次世代シーケンサーによりマイクロRNAの発現を網羅的に解析した。独自に作成したマイクロRNA発現プロファイルから、正常組織と比較し、癌部において発現の低下しているマイクロRNAをがん抑制型マイクロRNAの候補として抽出した。マイクロRNAの機能解析は前立腺癌細胞株(PC3, DU145, C4-2)を用いて、細胞増殖・遊走・浸潤能を指標として行った。マイクロRNAの制御する遺伝子群は公共データベースを用いて配列依存的に結合し得る遺伝子の抽出と、マイクロアレイ解析によりマイクロRNAの核酸導入により発現低下を認める遺伝子の抽出を組み合わせる事でより有力な候補遺伝子を同定した。臨床データベース解析はThe Cancer Genome Atlasを用いて行い、患者予後と遺伝子発現の関連を検討した。マイクロRNAの遺伝子制御はluciferase reporter assay、PCR法、ウエスタンブロッティング法により検討を行った。臨床検体における遺伝子発現解析はPCR法、免疫染色法にて解析した。遺伝子の機能解析はsiRNA及びinhibitorを用いて評価した。

4. 研究成果

我々は、独自のマイクロRNA発現プロファイルからmiR-455に着目した。miR-455はこれまでに同研究グループから腎癌における癌抑制型マイクロRNAとして報告があるが、前立腺癌における機能は未だに解明されていない。前立腺癌細胞株における機能解析結果から、miR-455-5p, miR-455-3p共に癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事を見出し、前立腺癌における癌抑制型マイクロRNAである事を解明した。ここで、機能解析結果から、より強く細胞進展能を抑制するmiR-455-5pに着目し研究を進めた。

miR-455-5pの制御する候補遺伝子群の中で、遺伝子発現と患者予後との間に統計学的な有意差を認める遺伝子を4つ同定した(PIR:P=0.0137, LRP8:P=0.0495, IGFBP3:P=0.0172, DMBX1:P=0.0175)。この中で最も予後

との相関を認めるPIRに着目した(図1)。PIRはcupin superfamilyのmemberの一つであり、E-cadherinの発現を抑制し、EMTを誘導するとの報告もある。Luciferase reporter assayによりmiR-455-5pがPIRを直接制御する事が示され、PCR法、ウエスタンブロッティング法によってもmiR-455-5pによる発現制御が示された。

PIRの発現は、mRNA/蛋白レベル双方において正常前立腺組織・ホルモン感受性前立腺癌組織・去勢抵抗性前立腺癌組織と段階的に上昇が見られ、治療抵抗性との関連が示唆された(図2)。また、siRNA及びinhibitor(bisamide)を用いて

PIRの機能解析を行った所、細胞増殖能・遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事が示された。さらに、ベクターを用いてPIRを過剰発現させ、miR-455-5pと共にco-transfectionした所、miR-455-5pにより低下した癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が有意に回復する事が示され、前立腺癌においてmiR-455-5p/PIRの軸が癌細胞の進展に重要である事が示唆された。

これら研究成果から、前立腺癌における治療抵抗性メカニズムにPIRが関連し、新規バイオマーカー及び治療標的となる可能性が示された。

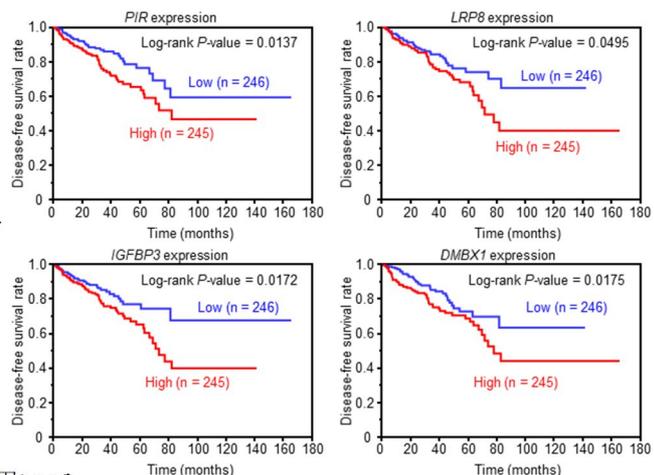
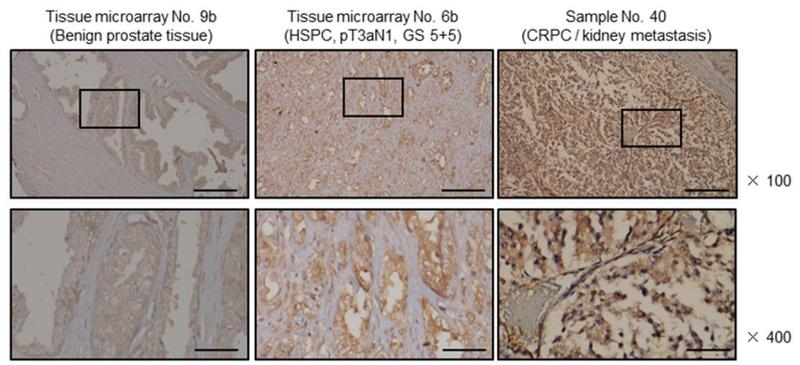
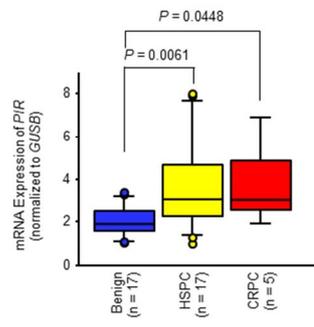


Figure 2



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 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Arai Takayuki, Kojima Satoko, Yamada Yasutaka, Sugawara Sho, Kato Mayuko, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Micro ribonucleic acid expression signature of metastatic castration resistant prostate cancer: Regulation of by antitumor miR 199a/b 3p	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 506 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13911	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 該当する
1. 著者名 Arai Takayuki, Kojima Satoko, Yamada Yasutaka, Sugawara Sho, Kato Mayuko, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Pirin: a potential novel therapeutic target for castration-resistant prostate cancer regulated by miR-455-5p	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 322 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12405	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 該当する
1. 著者名 Yamada Yasutaka, Sugawara Sho, Arai Takayuki, Kojima Satoko, Kato Mayuko, Okato Atsushi, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 25
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of renal cell carcinoma: Impact of the anti-tumor miR-29 family on gene regulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 953 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13783	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 該当する
1. 著者名 Yamada Yasutaka, Arai Takayuki, Sugawara Sho, Okato Atsushi, Kato Mayuko, Kojima Satoko, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Impact of novel oncogenic pathways regulated by antitumor miR-451a in renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13526	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 該当する

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kato M, Kojima S, Sakamoto S, Komiya A, Naya Y, Ichikawa T, Seki N	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of pre-miR-532 (miR-532-5p and miR-532-3p) in regulation of gene expression and molecular pathogenesis in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical and Experimental Urology	6. 最初と最後の頁 11-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Yamada Yasutaka, Arai Takayuki, Kojima Satoko, Sugawara Sho, Kato Mayuko, Okato Atsushi, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Regulation of antitumor miR-144-5p targets oncogenes: Direct regulation of syndecan-3 and its clinical significance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2919 ~ 2936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13722	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 該当する

1. 著者名 Yamada Yasutaka, Arai Takayuki, Kojima Satoko, Sugawara Sho, Kato Mayuko, Okato Atsushi, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-tumor roles of both strands of the <i>miR-455</i> duplex: their targets <i>SKA1</i> and <i>SKA3</i> are involved in the pathogenesis of renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 26638 ~ 26658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25410	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山田 康隆, 菅原 翔, 新井 隆之, 岡東 篤, 市川 智彦, 関 直彦
2. 発表標題 癌抑制型microRNA-451aの制御する腎癌分子ネットワークの探索
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018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
研究協力者	関 直彦 (SEKI Naoiko) (50345013)	千葉大学大学院医学研究院・機能ゲノム学・准教授 (12501)	
研究協力者	新井 隆之 (ARAI Takayuki) (40793055)	千葉大学医学部附属病院・泌尿器科・助教 (12501)	