

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18087

研究課題名（和文）網羅的マイクロRNA発現解析による去勢抵抗性前立腺癌・新規治療標的分子の探索

研究課題名（英文）Comprehensive microRNA expression analysis for castration-resistant prostate cancer and novel therapeutic target molecules

研究代表者

新井 隆之（Arai, Takayuki）

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：40793055

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）：我々の前立腺癌マイクロRNA発現プロファイルおよび、公共の遺伝子発現データベースから、非癌、未治療前立腺癌、去勢抵抗性前立腺癌と段階的に発現低下していたmiR-499a-5pに着目した。この制御する有力な癌促進遺伝子として、NCAPGおよびCDC6を同定した。これらは細胞周期に深く関与する遺伝子が、miR-499a-5pにより直接制御を受けており、miR-499a-5pの核酸導入による前立腺癌細胞株における癌抑制的機能を実証した。さらにデータベース解析で、これら標的遺伝子の発現が高い患者はp53の機能喪失を多く認められており、p53がマイクロRNA発現制御の一部を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の解析対象となるマイクロRNAは、これまで論文報告が殆ど無く、これらマイクロRNAが制御する分子経路の探索は、学術的新規性を有している。また、本研究で得られたマイクロRNAや分子は、前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌における新規予後バイオマーカーや新たな治療標的としての可能性を秘めている。我々のこれまでの継続した研究の中で、複数のマイクロRNAの制御を受ける有力な癌遺伝子を見出しており、前立腺癌の分子機構解明に有益な情報を提供できると考える。

研究成果の概要（英文）：Based on our prostate cancer microRNA expression profiles and public gene expression databases, we focused on miR-499a-5p, which was progressively downregulated from non-cancer, untreated prostate cancer, to castration-resistant prostate cancer. We identified NCAPG and CDC6 as the most potent cancer-promoting genes regulating this. These genes, which are deeply involved in the cell cycle, are directly regulated by miR-499a-5p, demonstrating the tumor suppressive function of miR-499a-5p nucleic acid transfection in prostate cancer cell lines. Furthermore, database analysis showed that patients with high expression of these target genes showed more loss of function of p53, suggesting that p53 may play a part in the regulation of microRNA expression.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：microRNA miR-499a-5p 前立腺癌 去勢抵抗性前立腺癌 NCAPG CDC6

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、2017年の統計では、欧米男性における罹患率1位、死亡率3位の癌腫である。本邦においても、罹患者数は年々増加しており、死亡者数も増加し続けており、毎年1万人以上が前立腺癌で死亡する。前立腺癌は、アンドロゲン依存性に増殖し、進行癌であっても多くはホルモン遮断療法に良好に反応する。しかし、治療の継続により、いずれ多くはホルモン療法に抵抗性を示すようになり、去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) と呼ばれる病態となる。CRPCに至ると、高頻度に遠隔転移を来し、致命的になる。近年、CRPCに対する新規薬剤の開発が進んできており、アンドロゲン受容体を標的としたエンザルタミドや、CYP17阻害薬であるアピラテロン、新規抗癌剤であるカバジタキセルが臨床で使用できるようになり一定の有効性が示された。しかしながら、これらの新規治療でも、その効果は限定的であり、病態の克服には至っていない。そのため、前立腺癌が治療抵抗性を獲得するメカニズムやCRPCの局所浸潤、遠隔転移に関わる分子機構の解明はCRPC治療のために極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的では、CRPCに対して、マイクロRNAを起点とした機能性RNAネットワークの探索を行い、治療抵抗性獲得に関わる分子経路を探索する事を目的とした。去勢抵抗性前立腺癌において活性化している分子経路を見出すことで、疾患特異的な新規バイオマーカー同定や、その分子や経路を遮断する新たな治療法の開発つながりえる。

3. 研究の方法

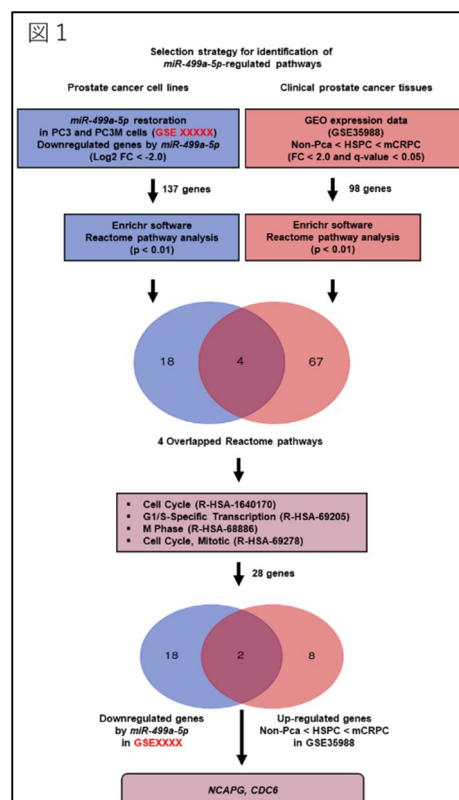
本研究では、前立腺癌患者の手術検体および、去勢抵抗性前立腺癌 CRPC 剖検検体を用いて独自に作成したマイクロRNA発現プロファイルから、正常組織と比較し、前立腺癌、去勢抵抗性前立腺癌において発現の低下しているマイクロRNAを癌抑制型マイクロRNAの候補として抽出した。さらに公共のデータベースと合わせて、解析候補のマイクロRNAを見出した。機能解析は前立腺癌細胞株 (PC3, PC3M, C4-2) を用いて、細胞増殖・遊走・浸潤能を指標として行った。マイクロRNAの制御する遺伝子群は公共データベースを用いて配列依存的に結合し得る遺伝子の抽出と、マイクロアレイ解析によりマイクロRNAの核酸導入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など公共のデータベースを用いて行い、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、ウエスタンブロット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。

4. 研究成果

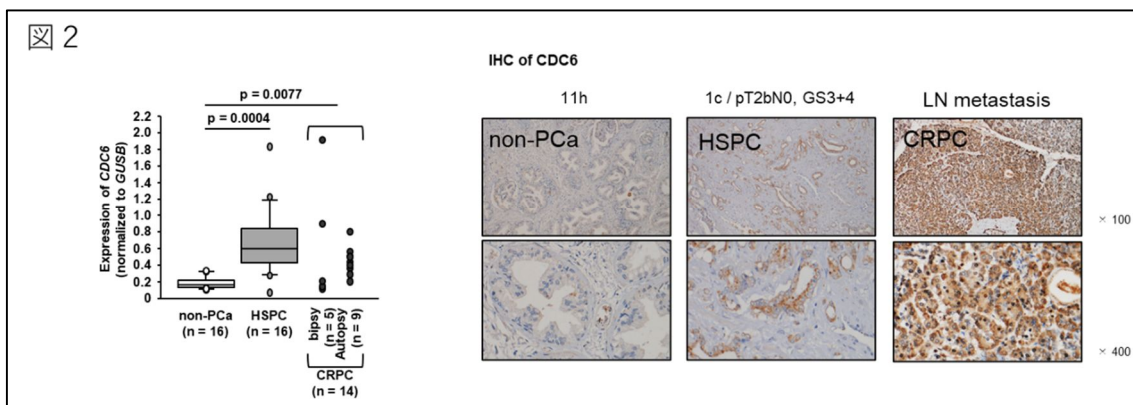
我々の前立腺癌マイクロRNA発現プロファイルおよび、公共の遺伝子発現データベースから、非癌、未治療前立腺癌、CRPCと段階的に発現低下していたmiR-499a-5pに着目した。miR-499a-5pと前立腺癌に関する報告は少ない。前立腺癌細胞株における機能解析結果から、miR-499a-5pが癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事が判明し、前立腺癌における有力な癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。

また、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析と、公共のデータベース解析を組み合わせることで、このマイクロRNAの制御する有力な癌促進遺伝子として、NCAPGとCDC6を同定した(図1)。NCAPGは、すでに我々研究グループが、他のマイクロRNAが制御する癌遺伝子として報告している(Arai T. et al. *Cancer Med.* 2018 May;7(5), Goto Y, Arai T. et al. *Br J Cancer.* 2017 Jul 25;117(3))。

さらに、Luciferase reporter assayによりmiR-499a-5pがNCAPGとCDC6を直接制御する事が示され、PCR法、ウエスタンブロットング法によってもmiR-499a-5pによるこれらの遺伝子レベルおよび蛋白レベルでの発現制御が示された。NCAPGについては、我々の既報の通りであるが、今回CDC6についても、その発現が、mRNA/蛋白レベル共に前立腺癌/CRPC臨床検体でも



上昇しており、前立腺癌の発生・進展に関与している可能性が示された(図 2)。



NCAPG と CDC6 は細胞周期に深く関与する遺伝子であり、データベース解析で、これら標的遺伝子の発現が高い患者は p53 の機能喪失を多く認めていた。このことから、p53 がマイクロ RNA 発現制御の一部を担っている可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai Takayuki, Sazuka Tomokazu, Sato Hiroaki, Kato Mayuko, Kamada Shuhei, Katsura Sota, Seito Ayako, Miyamoto Shu, Wakai Ken, Takeuchi Nobuyoshi, Imamura Yusuke, Sakamoto Shinichi, Komiya Akira, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 27
2. 論文標題 A clinical investigation of recurrence and lost follow-up after renal cell carcinoma surgery: a single-center, long-term, large cohort, retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-022-02204-x	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 Arai Takayuki, Sazuka Tomokazu, Sato Hiroaki, Imamura Yusuke, Sakamoto Shinichi, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Efficacy of photodynamic diagnosis assisted transurethral resection of bladder tumor for T1 bladder cancer: Novel second transurethral resection initiatives utilizing photodynamic diagnosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14962	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 Arai Takayuki, Takeuchi Nobuyoshi, Sazuka Tomokazu, Sato Hiroaki, Imamura Yusuke, Sakamoto Shinichi, Komiya Akira, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Successful treatment of metastatic bladder cancer by gemcitabine cisplatin re challenge after pembrolizumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 360 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12348	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新井隆之
2. 発表標題 癌抑制型マイクロRNA455-5pの制御する分子ネットワーク解析 : 去勢抵抗性前立腺癌・新規治療標的分子としてのPIRの可能性
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井隆之
2. 発表標題 間質性膀胱炎におけるマイクロRNAプロファイル : miR-320familyを起点とした分子経路探索
3. 学会等名 第85回日本泌尿器科学会東部総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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