

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591777

研究課題名（和文） ホルモン不応性前立腺癌における、微小環境に着目したマイクロRNAの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of miRNAs in microenvironment of CRPC.

研究代表者

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90245572

研究成果の概要（和文）：前立腺癌は西欧諸国において最も罹患率が高く、死亡率も 2 番目に高い癌である。前立腺癌は進行癌に至る過程において、ホルモン抵抗性・難治性の形質獲得していく。今までの研究において、この進呈過程を解析する有用な実験モデルを提唱してきた。本研究では、がん微小環境調節因子として、血管新生促進因子やマクロファージ遊走因子（MCP-1）の発現を解析し、それらの亢進を伴っていることを明らかにし、その発現制御には miRNA による機能制御異常が一因となり得ることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Prostate cancer (PCa) is one of the most commonly diagnosed malignant tumors in men and the second leading cause of cancer-related deaths in the United States. One of the most troublesome aspects of PCa is that androgen-dependent PCa inevitably progresses to highly aggressive and life-threatening castration-resistant prostate cancer (CRPC) after androgen ablation therapy. We have previously reported and proposed a useful *in vitro* model: sequential progression process of human CRPC: C4-2AT6. In this study, we investigated the angiogenesis-related factors or MCP-1 expression in PCa. Our results have demonstrated that aggressive angiogenesis of tumor microenvironment in human castration resistant prostate cancer is induced by VEGF or MCP-1, accompanied by dysregulation of miRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・腫瘍学

キーワード：前立腺癌、微小環境、血管新生、miRNA

1. 研究開始当初の背景

我々は、前立腺癌が進展やホルモン抵抗性獲得の過程において、血管新生促進因子の発現

亢進を伴うこと、また血管新生を標的とした治療の有用性を、ヒト臨床検体や動物実験モデルを用いて報告してきた (Kosaka T.

Miyajima A. et al. Prostate. 2007, 2010)が、ホルモン不応性前立腺癌・去勢抵抗性前立腺癌(Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC)への進展のメカニズムを更に深く理解するために、微小環境という観点からその調節因子と難治性との関連を明らかにすることは重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、CRPCの微小環境の調節因子として、血管新生関連因子やマクロファージ浸潤との関連を検討し、さらに遺伝子発現調節因子としてのmiRNAを、特にがん微小環境での血管新生促進因子の発現調節という点に着目し、解析することで、CRPCの進展における微小環境調節因子を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

どのようなメカニズムでCRPCは腫瘍の血管新生を増勢するのであるか？我々は、この疑問を解くために、アンドロゲン除去療法(ADT)の環境下でPCaはCRPCに進展していく、という臨床的知見に基づき、ヒトCRPC細胞株であるC4-2をADT下で6カ月間培養し、新規にCRPC細胞株:C4-2AT6を樹立した。C4-2AT6の解析から、血管新生に関連する転写因子として、必ずしも低酸素環境ではなくても、HIF-1 α などの低酸素応答関連転写因子の発現が上昇してくることを既に明らかにし、CRPCにおいてこれらの転写因子群が、悪性度や進展に伴って上昇し、血管新生因子の発現が誘導されることを明らかにした(Kosaka T. Prostate 2010)。今回、前立腺癌におけるがん微小環境を更に明らかにするために、血管新生関連因子やマクロファージ走化因子(MCP-1)の発現解析を臨床検体を対象として施行する。また、我々が樹立したヒトCRPC細胞株(C4-2AT6)を対象として、miRNAの発現解析と、そのmiRNAの強制発現系にて、血管新生促進因子の蛋白レベルでの発現調節との関連を解析する。

4. 研究成果

アンドロゲン除去という環境による、miRNAの発現の変化に着目し、C4-2やC4-2AT6におけるmiRNAの発現をマイクロRNAアレイを用いて比較検討した。C4-2AT6におけるマイクロRNAの発現解析では、有意に発現が変動するいくつかのクラスターを見出した。定量的なマイクロRNAの発現解析にて、C4-2AT6において有意に変動するマイクロRNAとして、miRNA200のクラスターの発現制御異常が認められた。miR-200ファミリーを強制発現すると、VEGFの発現が低下することが明らかとなり、miRNAによる血管新生因子の発現調節機構の存在も、CRPCにお

ける血管新生増勢の一因であることが示唆された。アンドロゲン除去という環境による、miRNAの発現の変化に着目し、C4-2やC4-2AT6におけるmiRNAの発現をマイクロRNAアレイを用いて網羅的に比較検討した。アレイにて、発現異常を認めたmiRNAのうち、定量PCR法にてmiR-200ファミリーの有意な発現低下を認めた。miR-200ファミリーの強制発現した際に、VEGFAの発現低下を認めたことから、miRNAによる血管新生関連因子の発現調節機構の存在も、CRPCにおける血管新生の増勢や難治性の一因の要因であることが示唆された。今後、がん微小環境とmiRNAとの関連を明らかにするために、更に検討を進めていく予定である。

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6件)

- 1: Kosaka T, Miyazaki Y, Miyajima A, Mikami S, Hayashi Y, Tanaka N, Nagata H, Kikuchi E, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. Br J Cancer. 2013 Apr 16. doi: 10.1038/bjc.2013.169. 査読有
- 2: Kosaka T, Miyajima A, Nagata H, Maeda T, Kikuchi E, Oya M. Human castration resistant prostate cancer rather prefer to decreased 5 α -reductase activity. Sci Rep. 2013;3:1268. doi: 10.1038/srep01268. 査読有
- 3: Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T, Tanaka N, Kikuchi E, Mikami S, Okada Y, Oya M. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer. Am J Pathol. 2012 Mar;180(3):1008-16. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.027. 査読有
- 4: Hasegawa M, Miyajima A, Kosaka T, Yasumizu Y, Tanaka N, Maeda T, Shirotake S, Ide H, Kikuchi E, Oya M. Low-dose docetaxel

enhances the sensitivity of S-1 in a xenograft model of human castration resistant prostate cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jan 15;130(2):431-42. doi: 10.1002/ijc.26012. 査読有

5: Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, Kikuchi E, Oya M. Phosphorylated Akt up-regulates angiotensin II type-1 receptor expression in castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2011 Feb 14. doi: 10.1002/pros.21367. 査読有

Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, Suzuki E, Kikuchi E, Oya M. Long-term androgen ablation and docetaxel up-regulate phosphorylated Akt in castration resistant prostate cancer. *J Urol*. 2011 Jun;185(6):2376-81.

doi:10.1016/j.juro.2011.02.016. 査読有

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、宮崎保匡、菊地栄次、大家基嗣：PI3K-Akt-mTOR シグナル経路の制御による去勢抵抗性前立腺癌のドセタキセル抵抗性改善に関する検討：第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会：高知、2013、3、9
2. 宮嶋哲、城武卓、小坂威雄、菊地栄次、中川健、大家基嗣：前立腺癌における MCP-1 発現の臨床的意義：第 50 回日本癌治療学会学術集会：横浜、2012、10、26
3. 小坂威雄、宮嶋哲、菊地栄次、長田浩彦、中川健、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌における各種遺伝子異常：第 19 回東京前立腺癌フォーラム「去勢抵抗性前立腺癌の治療戦略～内分泌療法の可能性と限界」：東京、2012、10、6
4. 安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、城武卓、

菊地栄次、大家基嗣：Combination Therapy with PI3K-mTOR Pathway

Inhibitor and Docetaxel in Castration

Resistant Prostate Cancer：第 71 回日本癌学会学術総会：札幌、2012、9、21

5. 宮嶋哲、城武卓、小坂威雄、菊地栄次、大家基嗣：前立腺癌における MCP-1 の発現制御に関する検討：第 16 回学術集会日本がん分子標的治療学会：北九州、2012、6、28
6. 安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、城武卓、菊地栄次、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌に対する PI3K・mTORC1/2 阻害剤とドセタキセル併用効果についての検討：第 16 回学術集会日本がん分子標的治療学会：北九州、2012、6、28
7. Kosaka T., Miyajima A., Shirotake S., Kikuchi E., Oya M. Long-term androgen ablation and treatment with taxanes up-regulate phosphorylated akt in castration resistant prostate cancer. The107th American Urological Association Annual Meeting. Atlanta. 2012. 5. 21
8. Shirotake S., Miyajima A., Kosaka T., Tanaka N., Kikuchi E., Oya M. Regulation of MCP-1 expression through angiotensin II type1 receptor in castration-resistant prostate cancer. The107th American Urological Association Annual Meeting. Atlanta. 2012. 5. 21
9. Yasumizu Y., Miyajima A., Kosaka T., Shirotake S., Kikuchi E., Oya M. P13K/AKT dual inhibitor restores docetaxel sensitivity in castration resistant prostate cancer. The107th American Urological Association Annual

Meeting. Atlanta. 2012. 5. 21

10. 安水洋太、宮嶋哲、小坂威雄、城武卓、菊地栄次、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌に対する PI3K・mTORC1/2 阻害剤とドセタキセル併用効果についての検討：第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会：北海道：2012、2、11
11. 小坂威雄、宮嶋哲、菊地栄次、城武卓、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌における進展のプロセスと、微小環境に着目した包括的治療戦略：第 27 回前立腺シンポジウム：東京：2011、12、10
12. 小坂威雄、宮嶋哲、菊地栄次、城武卓、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌において、PI3K/Akt シグナル経路は進展に伴い更に活性化される：日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会：東京、2011、6、24
13. 城武卓、宮嶋哲、小坂威雄、菊地栄次、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌における angiotensin II type 1 receptor を介した CCL2 の発現制御の検討：日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会：東京、2011、6、24
14. 小坂威雄、宮嶋哲、城武卓、前田高宏、菊地栄次、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）はその進展過程において、どのようにその難治性の形質を獲得するのか？：第 99 回日本泌尿器科学会総会：名古屋、2011、4、24
15. 長谷川政徳、宮嶋哲、小坂威雄、安水洋太、井手広樹、菊地栄次、大家基嗣：去勢抵抗性前立腺癌における 5-FU 系経口抗癌剤 S-1 の抗腫瘍効果と低用量ドセタキセル併用による増強効果の機構解明：第 99 回日本泌尿器科学会総会：名古屋、2011、4、24
16. 城武卓、宮嶋哲、小坂威雄、田中伸之、

菊地栄次、大家基嗣：前立腺癌におけるレニン-アンジオテンシン系を介した MCP - 1 の発現制御についての検討：第 11 回関東ホルモンと癌研究会：東京、2011、1、29

〔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〕

ホームページ

<http://www.keio-urology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：32612601

(2) 研究分担者

大家 基嗣(OYA MOTOTSUGU)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00213885

菊地 栄次 (KIKUCHI EIJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10286552

(3) 連携研究者

なし