

## 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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659288

研究課題名（和文）尿中分泌 miRNA を用いた新規前立腺癌バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration for a new biomarker of prostate cancer using microRNA secreted in urine samples

研究代表者

小川 修 (Osamu Ogawa)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260611

研究成果の概要（和文）：本研究では、前立腺癌細胞から尿中に microRNA が分泌され、尿中から前立腺癌特異的な miRNA を安定して抽出でき、それらはマーカーとして有用であるという仮説を立てて、その検討を行った。全尿中 miRNA array では有意な候補は見つからなかった。細胞株培養上清中の miRNA の発現は、細胞株での発現を反映しうることはわかったが、既知の miRNA を用いた実験では細胞株、培養上清と尿検体での発現は一致しなかった。引き続き、尿検体での miRNA 発現の評価方法の確立と前立腺癌関連 miRNA の探索を行っていく。

研究成果の概要（英文）：In this research, we hypothesized that microRNAs were secreted in urine from prostate cancer cells, and that the microRNAs, which are specific for prostate cancer, could be stably extracted from urine samples, and could be useful for new biomarkers. We performed microRNA array using whole urine samples, but none was significantly different in expression. We found that the microRNA expression in culture medium could reflect its expression in cell lines. But the expressions of some microRNAs, which have already been known to be associated with prostate cancer, were different in culture medium, cell lines, and urine samples. We are trying to establish the proper method, by which we can precisely estimate the expression of microRNAs in urine samples, and we are planning to explore new microRNAs associated with prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロ RNA、前立腺癌、去勢抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA は、その発現がヒトの様々な疾患の発症に関与することが分かってきており、急速にその研究が進んでいる。miRNA はあら

たな遺伝子発現調節分子として、癌研究領域では、発癌、増殖、浸潤、転移などのさまざまな過程でその関与が注目されている。前立腺癌における miRNA の発現異常の研究に関

する報告は急速に増えてきており、その発現異常をターゲットにした診断や治療の開発が期待されている。

#### ① 研究の学術的背景

PSA は前立腺癌において最も有用な腫瘍マーカーであるが、前立腺肥大症や前立腺炎などの良性疾患の影響も受けるため特異度に欠点があり、PSA が 3–10ng/ml と高値であっても前立腺生検において 60–75% は悪性所見を認めない。そのため、診断の精度をさらに向上させるためには、より特異度の高い検査法の開発が重要となっている。

近年、microRNA は発生、発癌、細胞死、分化において重要な役割を果たして、癌組織において特異的な発現パターンをとる事が分かってきている (Rosenfeld et al. Nature Biotech)。さらに血清中でも安定して存在し (Mitchell et al. PNAS 2008) 尿中にも存在することが示されている (Gilad et al. PLoS One 2008)。また、癌細胞が分泌する exosome 内に microRNA が含まれている (Skog et al. Nature Cell Biology 2008) ことから我々は、以下の仮説をたてた。

前立腺癌細胞から尿中に microRNA が分泌され、尿中から前立腺癌特異的な miRNA を安定して抽出でき、それらはマーカーとして有用である

#### ② 研究期間内に明らかにすること

1. 遠心分離後の尿上清中から microRNA を安定して抽出する方法を確立する。

2. 様々な前立腺癌培養細胞株を用いてその培養上清に含まれる miRNA の発現を網羅的に解析する。

3. 前立腺癌に特異的な尿中 microRNA の発現パターンを解明する。

4. ホルモン治療 naive な前立腺癌患者と去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中 miRNA の発現パターンを比較検討する。

#### ③ 当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

膀胱癌においては、尿中に脱落した腫瘍細胞から抽出した microRNA を用いた膀胱癌の診断的腫瘍マーカーとしての報告はあるが (Hanke et al. Urol Oncol 2009)、前立腺癌において尿中 microRNA の腫瘍マーカーとしての報告はまだない。

今回、前立腺癌特異的な尿中 microRNA を同定できれば、前立腺生検において不要な検査を減らすことができる。特に、初回生検で前立腺癌が陰性であった後も PSA 高値が続く患者に対して、再生検を必要とするかの判断において非常に有用であると考えられる。ま

た、去勢抵抗性にかかわる microRNA を診断時に検出できれば、予後不良群を早期に判別できる可能性があり、治療法選択において非常に有用である。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は細胞成分を除去した尿中に miRNA を検出し、前立腺癌のバイオマーカーとしての可能性を探索することである。

#### 3. 研究の方法

京都大学病院泌尿器科では年間約 200 件の前立腺生検を施行している。また前立腺癌に対する手術療法 (前立腺全摘術) は年間 70 件施行している。また当院では放射線治療施行患者を含めると去勢抵抗性前立腺癌患者は 20~30 名程度存在する。したがって本研究で必要な十分量の検体数の尿はすでに尿検体を採取保存中である。

本研究では前立腺細胞株 (正常、癌) の培養上清中の miRNA を解析することと、患者の細胞成分除去後尿中 miRNA の抽出と解析を行うことを並行して行っていく。双方とも miRNA array を使用した網羅的解析から RT-PCR での validation を進めつつターゲット miRNA を絞り込む。最終的にはその生物学的意義の探索を分子生物学的手法にて解明する。

#### 4. 研究成果

##### ①全尿中 miRNA array

前立腺癌における miRNA の発現異常の研究に関する報告は急速に増えてきており、その発現異常をターゲットにした診断や治療の開発が期待されている。採取した全尿を遠心して得られたペレットから抽出した miRNA に関する尿路性器癌に関する診断マーカーの報告はあるが、尿上清中特異的な miRNA の報告は確固たるものがなく、本研究ではまず全尿 (上清およびペレット) から miRNA を採取して、その解析をすすめた。

前立腺癌患者 10 名および前立腺肥大症 7 名の全尿中の miRNA を抽出し、miRNA array (東レ Human miRNA Oligo chip) を用いた網羅的発現解析を施行した。癌患者と肥大症患者の全尿から得られた miRNA で、二群間で明らかに発現の異なるものはなかった。

この原因として、検体数が限られていたこと、検体処理の方法などが考えられた。

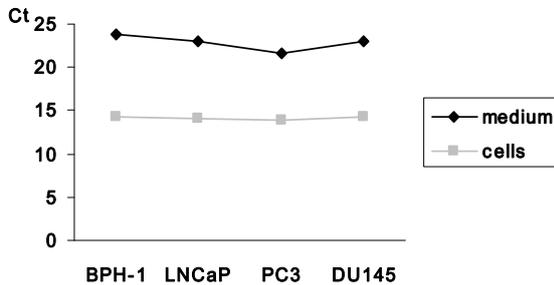
##### ②細胞株と培養上清中の miRNA

次によく使用される前立腺癌細胞株 LNCaP、PC3、DU145 および前立腺肥大症の細胞株 BPH-1 を培養し、それらの細胞中と培養上清中に miRNA が検出され、その傾向が一致するかを確認し、これらの細胞株が当研究に使用しうるかを検討した。

一般的に内因性コントロールとしてよく使用される RNU6b の発現をこれらの細胞株と培養上清とで比較したものが図 1 である。この結果より、RNU6b が細胞株と培養上清の両方

で検出され、また株によらずほぼ一定レベルで検出されることがわかった。

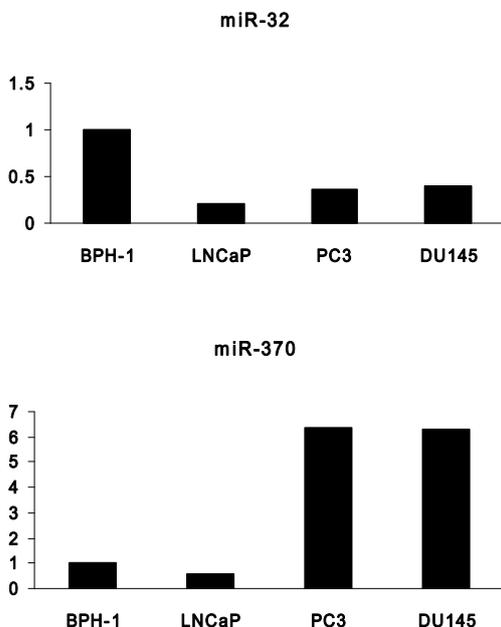
図 1



### ③既知の miRNA の発現の確認

Ambs らは、miR-32, miR-370 などが前立腺癌の発癌等に関わっていると報告している (Ambs S et.al. Can Res 2008)。我々は先ほどの BPH-1, LNCaP, PC3, DU145 でこれらの miRNA の発現を確認した (図 2)。miR-32 については癌細胞株のほうで発現が落ちており、miR-370 は PC3, DU145 において強く発現していた。miR-32 の結果は Ambs らの結果とは同じではなかったが、miR-370 は同様の傾向が見られた。

図 2

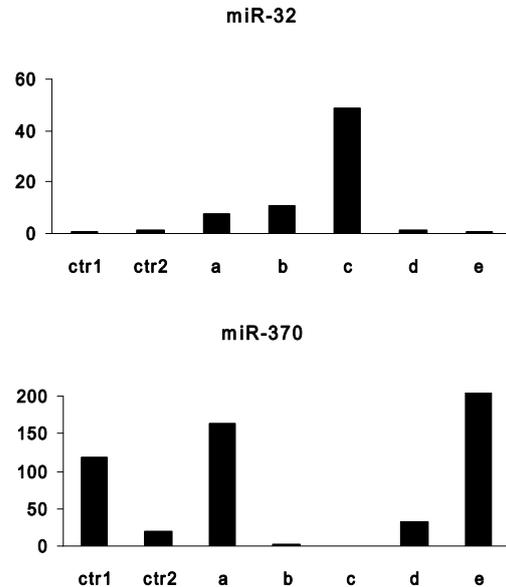


### ④尿上清中 miRNA の検出

上記の miRNA について、健常ボランティアの尿をコントロールとし、前立腺癌と診断され

た患者の尿の上清を用いて発現を確認した (図 3)。その際まず尿の保存状況 (室温での保存時間) によって採取できる miRNA の量に関しては、数時間程度なら変化しないことを確認し、次に尿上清中 miRNA 採取時に細胞成分除去するためにさまざまなフィルターを用いて miRNA の抽出を試みた。

図 3



これらの結果は細胞株で得られた結果とは異なる結果となっており、これらの miRNA は残念ながら今回の解析では有意とは判断できなかった。

### 結語

細胞株と培養上清を用いて RNU6b の発現を見ることで我々は培養上清中の miRNA が細胞株での発現を反映しようと考えたが、培養上清と尿検体とは成分が異なっている。我々は様々なフィルターを用いて miRNA を抽出したが、フィルターによって検出できる miRNA の量がかなり違っていたため、尿中の miRNA の発現を正確に反映しようする方法を確立する必要がある。また尿検体は採取されるタイミングによって、尿の濃度等が異なっており、尿検体中の miRNA の発現の程度をどのようにして normalize するかという問題が残された。先述の膀胱癌においては尿中に脱落した腫瘍細胞が含まれているが、前立腺癌においてそのようなことは稀であり、細胞成分を除去した尿中には分泌された miRNA のみが含まれていると考えられる。したがって癌患者と非癌患者、あるいは進行癌患者と早期癌患者の尿検体において、有意に発現の異なる miRNA

が見つかれば新規のバイオマーカーとなりうると思われたが、今回はその段階には至れなかった。引き続き尿検体の処理方法を検討しつつ、前立腺癌関連のmiRNAについて探索を行っていくのが今後の課題である。

#### 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 8 件) すべて査読あり

1) Takahiro Inoue, Osamu Ogawa "Role of Signaling Transduction Pathways in Development of Castration-Resistant Prostate Cancer," *Prostate Cancer*, vol. 2011, Article ID 647987, 7 pages, doi:10.1155/2011/647987. 2011.

2) Mizowaki T, Takayama K, Norihisa Y, Ogura M, Kamba T, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O, Hiraoka M. Long-term outcomes of three-dimensional conformal radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for Japanese patients with T1c-T2N0M0 prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. Oct 5. [Epub ahead of print] 2011

doi: 10.1007/s10147-011-0326-z

3) Xing ND, Ding ST, Saito R, Nishizawa K, Kobayashi T, Inoue T, Oishi S, Fujii N, Lv JJ, Ogawa O, Nishiyama H. A potent chemotherapeutic strategy in prostate cancer: S-(methoxytrityl)-l-cysteine, a novel Eg5 inhibitor. *Asian J Androl*. 13:236-41, 2011 doi: 10.1038/aja.2010.171

4) Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Doi K, Terada N, Kobayashi T, Toda Y, Yamasaki T, Inoue TA, Kajita Y, Maeno A, Kamba T, Mikami Y, Kamoto T, Yamada T, Kanno T, Yoshikawa K, Ogawa O, Minato N, Nakamura E. SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Sci*. 102:828-36, 2011 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01876.x

5) Kobayashi T, Inoue T, Shimizu Y, Terada N, Maeno A, Kajita Y, Yamasaki T, Kamba T, Toda Y, Mikami Y, Yamada T, Kamoto T, Ogawa O, Nakamura E. (2010) Activation of Rac1 Is Closely Related to Androgen-Independent Cell Proliferation of Prostate Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo. *Mol Endocrinol* 24 722-34, 2010 doi: 10.1210/me.2009-0326

6) Terada N, Shimizu Y, Kamba T, Inoue T, Maeno A, Kobayashi T, Nakamura E, Kamoto T, Kanaji T, Maruyama T, Mikami Y, Toda Y, Matsuoka T, Okuno Y, Tsujimoto G,

Narumiya S, Ogawa O. Identification of EP4 as a Potential Target for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer Using a Novel Xenograft Model. *Cancer Res* 70: 1606-15, 2010

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2984

7) Takashi Kobayashi, Yosuke Shimizu, Naoki Terada, Toshinari Yamasaki, Eijiro Nakamura, Yoshinobu Toda, Hiroyuki Nishiyama, Toshiyuki Kamoto, Osamu Ogawa and Takahiro Inoue Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. *Prostate* 70:866-874 2010

doi: 10.1002/pros.21120

[学会発表] (計 4 件)

1) RalGAPによる腫瘍浸潤転移抑制機能の新規同定  
斎藤亮一 日本泌尿器科学会総会 2011年4月22日 名古屋

2) Exploration and novel identification of microRNAs associated with bladder cancer by miRNA chip array profiling  
中嶋正和 日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

3) Focal adhesion kinase activity correlates with biochemical recurrence after radical prostatectomy  
井上貴博 日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

4) miR-582-5p and miR-96 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells  
前野 淳 日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 修 (Osamu Ogawa)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90260611

(2) 研究分担者

吉村 耕治 (Koji Yoshimura)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 40397542

神波 大己 (Tomomi Kanba)  
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 20402836

井上 貴博 (Takahiro Inoue)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号 : 80511881