様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ４ 月 ２５ 日現在

機関番号：３２６４３
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９２３５１

研究課題名（和文）前立腺癌再燃機構の解明に向けたマイクロＲＮＡネットワークの解析

研究課題名（英文）Analysis of gene regulation networks controlled by microRNA in castration resistant prostate cancer

研究代表者
小島　聡子（Kojima, Satoko）

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：１０３４５０１９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,100,000円、（間接経費）　1,230,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺癌は進行すると、内分泌療法抵抗性前立腺癌となる症例がある。遺伝子発現、特に、non-coding RNAであるmicroRNAの発現に注目し、正常前立腺組織と比較し発現解析を行い、以下を明らかとした。
a) miR-145　はFASN1を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する、b) miR-1, miR-133aはPNPを標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する、c) miR-222 and miR-31は癌のpathwayを標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関、d)miR-143/145はGOLM1を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Prostate cancer progress to castration resistant prostate cancer (CRPC) leading to the cancer death. Most of the patients who died with CRPC was initially revealed advanced disease with bone metastasis. We had analyzed the expression profiles of micro-RNAs in advanced prostate cancer. From 2011 to 2012, we confirmed the expression profile of microRNA of advanced prostate cancer. We had further analyzed the functions of down-regulated microRNAs in prostate cancer.
a) miR-145 target FASN1 and controls proliferation, invasion and migration functions of prostate cancer. b) miR a and miR-133a target PNP and controls proliferation, invasion and migration functions of prostate cancer. c) miR-222 and miR-31 involved cancer pathway (by KEGG pathway). d) miR-143/145 forms cluster and target GOLM1 which affect proliferation, invasion and migration functions of prostate cancer.

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：前立腺癌　マイクロRNA　標的遺伝子　発現プロファイル　ゲノム　増殖　浸潤

１．研究開始当初の背景
近年、癌の発生、進展の発現調節機構として non-coding RNA （microRNA：miR）が注目されている。miRNA の発現が癌において変化することにより、癌細胞の増殖やアポトーシス、浸潤、転移に影響することが知られている。癌細胞死に影響を与える miRNA として、miR-15a, miR-16 が報告された。その後、さまざまな miRNA が前立腺癌において重要な働きをしていることが示された。それらの報告は、前立腺癌細胞株を用いたものや、早期前立腺癌の摘出標本であり、比較の対象が一定でいなかったことが指摘できる。

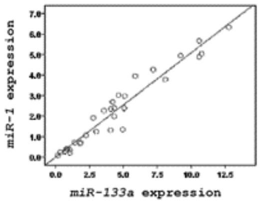
２．研究の目的
miRNA は癌組織において発現が低下する場合が多いことが知られている。miRNA の発現を網羅的に（マイクロアレイ解析などで）調べることで、癌と非癌組織を比較すれば、発癌に関する miRNA が予測できる。今回は我々の実際の進行性前立腺癌における miRNA の発現を解析することで、前立腺癌の進展に重要な役割をする miRNA のプロファイルを行い、その機能解析を行った。

３．研究の方法
（１）網羅的な miRNA の発現解析を、進行前立腺癌 5 例､正常前立腺癌 5 例について miRNA 発現を、マイクロアレイを用いて発現解析を行った。
（２）発現の低下している miRNA をその程度の強いものから順次、機能解析を行った。
（３）機能のある miRNA の標的遺伝子を In silico の手法を用いて以下のように標的遺伝子を同定した。まず、目的とする miRNA の結合部位をもつ標的遺伝子を TargetScan にてリストアップをした。次に、前立腺癌で発現の低下するリストを GEO data から検索し、Gene sprong のソフトウェアを用いて heat map diagram を構築し、最も発現の亢進する target gene を選択した。
その標的遺伝子と miRNA が実際に結合するかどうか、Luciferase assay を用いて結合の有無を評価した。最後に、ヒト前立腺組織を免疫染色することで、その標的遺伝子の蛋白の発現が実際ヒト前立腺癌で高発現しているかを検証した。

４．研究成果
(1) 前立腺癌 miRNA 発現プロファイルの完成
その網羅的探索により、miR-31,miR-205, miR-1,miR-187, miR-224, miR-222 などのマイクロ RNA の発現が前立腺癌において有意に低下することが示された。クラスターとして機能することでしられる miR-133a/1 や、miR-143/145 についても発現が前立腺癌で低下していることが示された。また、発現が亢進する miRNA も同定され、前立腺癌における miRNA のプロファイルが完成された。

(2) 前立腺癌細胞株を用いた miRNA の機能解析
miR-1 と miR-133a のクラスターがともに前立腺癌で発現が低下しており、その低下には相関が見られた (Figure 1)。

Figure 1. Correlation of expression of miR-133a and miR-1 in PCa



前立腺癌において、がん抑制遺伝子として機能していることを明らかにした。
ホルモン不応性の前立腺癌細胞株 PC3 と DU145 を用いて発現プロファイルで、低下の率が最も高かった miR-187, miR-205, miR-31, miR-222 を遺伝子導入し、前立腺癌細胞の増殖能が著明に低下することを示した。
同様に、クラスターを形成する miR-143/145 も前立腺癌において発現が低下しており (Figure 2)、miR-143/145 を前立腺癌に遺伝子導入を行うと、増殖能、浸潤能、転移能が著明に抑制された (Figure 3)。

Figure 2. Expression levels miR-143/145 in PCa

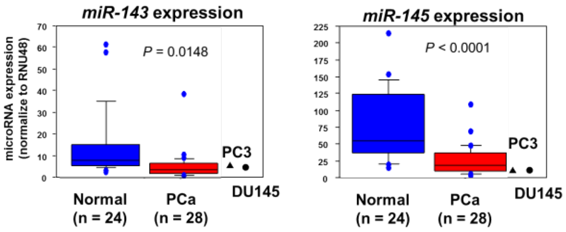
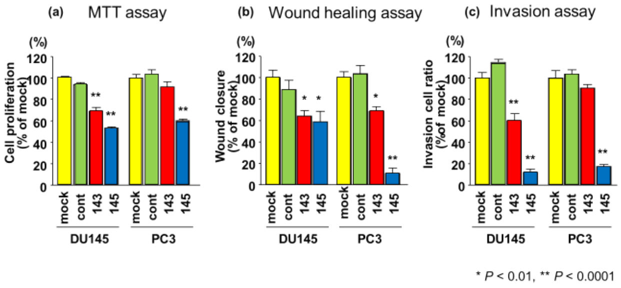
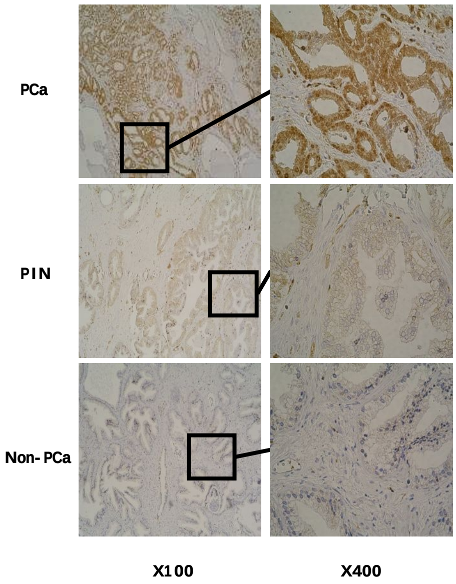


Figure 3. Tumor suppressive function of miR-143/145 in PCa cells



(3) miRNA の標的遺伝子の同定
以上方法に記載した手法により
① miR-145 は FASN1 を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する
② miR-1, miR-133a は PNP を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する (Figure 4)

Figure 4. Expression of PNP in PCa



③ miR-222 and miR-31 は癌の pathway を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する
④ miR-143/145 は GOLM1 を標的とし、前立腺癌の増殖、浸潤に関与する (Figure 5,6)

以上のことを明らかとした。

Figure 5. GPLM1 expression is repressed by miR-143/145.

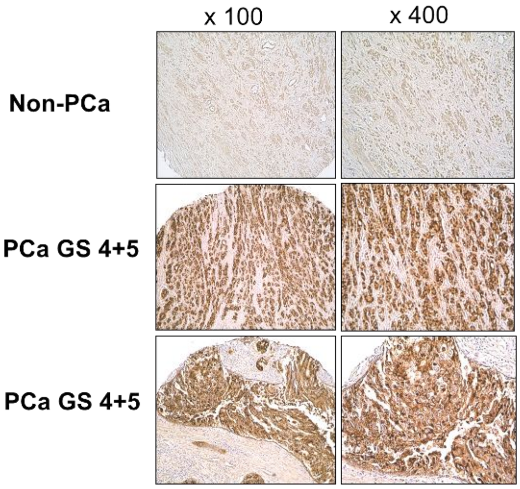
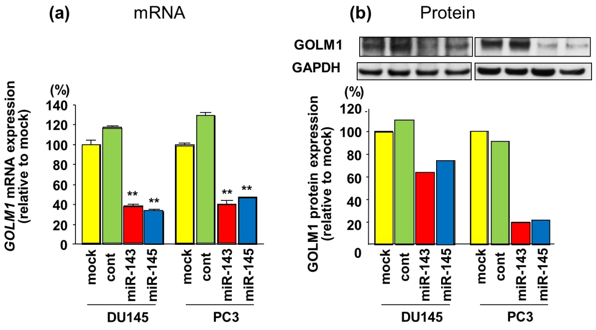


Figure 6. IHC of GOLM1. High expression of GOLM1 protein in progressed PCa.



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　7　件）

1) Satoko Kojima, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Toshihiko Itesako, Takeshi Chiyomaru, Takashi Kinoshita, Miki Fuse, Rika Nishikawa, Yusuke Goto, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa and Naohiko Seki. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer. J Hum Genet. Feb;59(2):78-87, 2014 doi: 10.1038/jhg.査読あり
2) Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Toshihiko Itesako, Satoko Kojima, Takashi Kinoshita, Shuichi Tatarano, Takeshi Chiyomaru, Masayuki Nakagawa and Naohiko Seki. Tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster targets hexokinase-2 in renal cell carcinoma. Cancer Sci. Dec;104(12):1567-74. 2013 doi: 10.1111/cas.12280. 査読あり
3) Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Toshihiko Itesako, Shuichi Tatarano, Takashi Kinoshita, Miki Fuse, Satoko Kojima, Masayuki Nakagawa and Naohiko Seki. Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. J Hum Genet. 2013 Aug;58(8):508-16. doi: 10.1038/jhg.2013.31. 査読あり
4) Miki Fuse, Satoko Kojima, Hideaki Enokida, Takeshi Chiyomaru, Hiroshi Yoshino, Nijiro Nohata, Takashi Kinoshita, Shinich Sakamoto, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa, Tomohiko Ichikawa, Naohiko Seki. Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer. J Hum Genet. 57(11):691-699, (2012) doi: 10.1038/jhg.2012.95. 査読あり
5) Satoko Kojima, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hirofumi, Yoshino, Hideki Enokida, Nijiro Nohata, Miki Fuse, Tomohiko Ichikawa, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa and Naohiko Seki. Tumor suppressors *miR-1* and *miR-133a* target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase *(PNP)* in

prostate cancer. Brit. J. Can. 106, 405-413, (2012). doi: 10.1038/bjc.2011.462. 査読あり

6) Yasutoshi Yamada, Hideki Enokida, Satoko Kojima, Kazumori Kawakami, Takeshi Chiyomaru, Shuichi Tatarano, Hirofumi Yoshino, Kazuya Kawahara, Kenryu Nishiyama, Naohiko Seki and Masayuki Nakagawa. Mir-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. Cancer Sci 102(3):522-529, (2011). doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01816.x. 査読あり

7) Miki Fuse, Nijiro Nohata, Satoko Kojima, Shinichi Sakamoto, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa , Yukio Naya, Tomohiko Ichikawa and Naohiko Seki. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. Int. J. Oncol. 38:1093-1101, (2011) 10.3892/ijo.2011.919. 査読あり

〔学会発表〕（計　6　件）

1) 小島聡子、千代丸剛、川上一盛、榎田英樹、野畑二次郎、布施美樹、吉野裕史、稲原昌彦、中川昌之、納谷幸男、関直彦：前立腺癌における miR-1 および miR-133a の機能解析と標的遺伝子 PNP の同定　第 70 回日本癌学会学術集会 2011. 10. 3－5　京都　P-2101

2) Satoko Kojima, Takeshi Chiyomaru, Hideki Enokida, Kazumori Kawakami, Hirofumi Yoshino, Nijiro Nohata, Miki Fuse, Tomohiko Ichikawa, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa, and Naohiko Seki. Tumor suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. 27th EAU 2012.2.24-28 Paris. abstract No 842

3) Satoko Kojima, Takeshi Chiyomaru, Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Nijiro Nohata, Miki Fuse, Tomohiko Ichikawa, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa, and Naohiko Seki. Identification of pureine nucleoside phosphorylase (PNP) as a novel target of tumor suppressors miR-1 and MiR-133a in prostate cancer. 第 103 回 AUA annual meeting May 19-23, 2012 Atlanta, GA USA Abstract No 487

4) 小島聡子、布施美樹、千代丸剛、野畑二次郎、木下崇、吉野裕史、榎田英樹、中川昌之、市川智彦、納谷幸男、関直彦 ：前立腺癌における micro-RNA 発現プロファイルと遺伝子制御の探索. 第 71 回日本癌学会学術総会（札幌）2012.9.21

5) Satoko Kojima, Hideki Enokida, Hirohumi Yoshino, Takeshi Chiyomaru, Takashi Kinoshita, Miki Fuse, Yukio Naya, Masayuki Nakagawa, Naohiko Seki: Expression signature of tumor-suppressive miRNA and control of cancer associated molecular pathways in prostate cancer. 第 104 回 AUA Annual Meeting 2013 (San Diego) 2013.5.4-8

6) Satoko Kojima, Hiroshi, Masuda, Kazuhiro Araki, Masahiko Inahara, Masahiso Sugiura, Kyokusin Hou, Naohide Sato, Yukio Naya. PSA/T ratio is a prognostic factor to predict PSA recurrence in prostate cancer treated with intermittent androgen suppression. SIU (33rd congress of the société international d'urology) 2013 (Vancouver) 2013.9.8-12 UP-254

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織
(1)研究代表者
小島　聡子（KOJIMA SATOKO）
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：10345019

(2)研究分担者
関　直彦（SEKI NAOHIKO）
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50345013

(3)連携研究者
（　　　　　　）
研究者番号