

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462430

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における機能性RNAのネットワーク解析および標的分子経路の探索

研究課題名(英文) Analysis of functional RNA networks and investigation of their target genes in castration-resistant prostate cancer (CRPC).

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：miR-452は、CRPCで低下しており、miR-452を遺伝子導入することで、PC3、DU145とともに転移、浸潤能が低下することが示され癌抑制遺伝子と考えられた。その標的遺伝子の一つとしてE3 ubiquitin ligase-1 (WWP1)があげられた。WWP1の発現を抑制すると、前立腺癌細胞の浸潤、転移能が低下したことからWWP1はがん遺伝子であることが示された。さらに、miR-452発現が低い前立腺癌では、進行前立腺癌のCRPCになるまでの期間が有意に短いことが示された。miR-452の発現は前立腺癌の予後因子であり、WWP1の発現抑制がCRPCの治療の可能性として考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of miR-452 was decreased in castration-resistant prostate cancer (CRPC), and the transfection of miR-452 induced repression of cell migration and invasion in PC3 and Du145 cells. One of the target genes is E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1). Knock-down of expression levels of WWP1 induced repression of cell migration and invasion in PC3 and Du145 cells, indicated WWP1 is an oncogene. CRPC patients with lower levels of miR-452 showed short duration of time to CRPC after androgen depletion therapy. miR-452 is a prognostic factor of progressed prostate cancer and targeting WWP1 expression might be a possible treatment for CRPC.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 マイクロRNA 発現プロファイル 去勢抵抗性 遺伝子解析 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌は通常ホルモン感受性癌であるが、去勢後約 1~2 年で去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となり治療に抵抗性になることが知られている。2014 年以降 CRPC の治療として、アンドロゲンの合成阻害薬、第 2 世代の抗アンドロゲン薬などの新規開発薬が使用可能となったが、癌細胞がアンドロゲン感受性を完全に失った場合、その代替となる新規の治療法は現在ドセタキセルなどの抗癌剤による治療に限定される。前立腺癌細胞がどのような分子ネットワークを駆使して、増殖・転移を起こすのか明らかになっておらず、その解明のために、CRPC の臨床検体を用いた解析が必要である。

(2) 現在使われている、アンドロゲンレセプター (AR) を介した経路の阻害薬に対して抵抗性を獲得した CRPC 患者の臨床検体へのアクセスは大変難しいが、CRPC となりなくなった患者様の剖検検体におけるマイクロ RNA 発現プロファイルを基に、最新のゲノム科学を応用した解析を施行し、CRPC で活性化している分子ネットワークを明らかにする事が今後の治療において重要である。

(3) 近年、機能性 RNA 分子の中で、マイクロ RNA とよばれる 19-23 塩基の小さな RNA が発生・分化などの過程に多大な影響を及ぼす事が報告され注目されている。前立腺癌においても、癌抑制遺伝子として機能するマイクロ RNA が癌の進行において重要な役割を果たしていることがわかってきた。

2. 研究の目的

CRPC におけるマイクロ RNA のプロファイルを明らかにし、Target scan、GEO database など in silico の手法を用いて、マイクロ RNA が制御する蛋白コード遺伝子のネットワークを機能別に解析する。

3. 研究の方法

- (1) CRPC 臨床検体のマイクロ RNA の発現プロファイルを作成し、CRPC で特異的に発現変動するマイクロ RNA を選択し、選択したマイクロ RNA の機能解析を行う。
- (2) CRPC で特異的に活性化されている分子経路を明らかにし、それを遮断する分子標的薬、低分子化合物等を探索し、その経路を遮断することの有効性について前立腺癌細胞株を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) CRPC 患者の剖検検体より得られた RNA をマイクロ RNA 用のマイクロアレイにかけ、発現プロファイルを同定した (table 1) . miR-221/222, miR-23b/27b/24, miR-224, miR-29s, miR-218, miR-145/143, miR-205, miR-29s, miR-452, miR-106a/20 が CRPC において明らかに発現が抑制されていることがわかった。

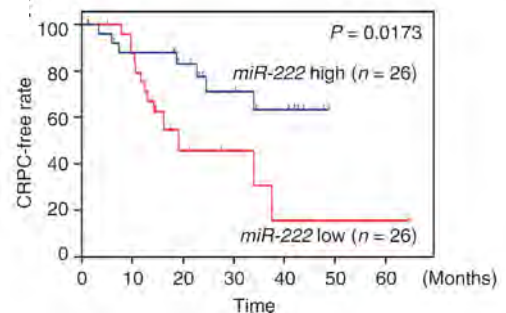
Table 1. Downregulated miRNAs in CRPC

miRNA	Log2 ratio (CRPC/non-PCa)
hsa-miR-205	-11.34
hsa-miR-378	-11.15
hsa-miR-222	-8.40
hsa-miR-143	-8.34
hsa-miR-133a	-7.70
hsa-miR-23b	-6.50
hsa-miR-345	-6.45
hsa-miR-150	-6.25
hsa-miR-139-5p	-6.22
hsa-miR-221	-6.21
hsa-miR-484	-5.68
hsa-miR-29c	-5.55
hsa-miR-28-3p	-5.44
hsa-miR-27b	-5.28
hsa-miR-320	-5.26
hsa-miR-30a*	-5.21

(2) miR-221 は miR-222 とともにクラスターを形成し、進行性前立腺癌、CRPC とともに発現が低下していた。

前立腺癌患者におけるホルモン療法下での再燃までの期間を Kaplan-Meier 法で検討したところ、図 1 のように miR-222 の発現が低い患者では、早期に再燃することが示された。このことは、miR-222 が癌抑制遺伝子として機能していることを示すものである。標的遺伝子を解析したところ、Ecm29 が強い相関を持っており、miR-221/222 の標的遺伝子と考えられた。Ecm29 の発現を抑える治療方法が確立すれば、前立腺癌の進展を抑制できる可能性がある。(1)

図 1

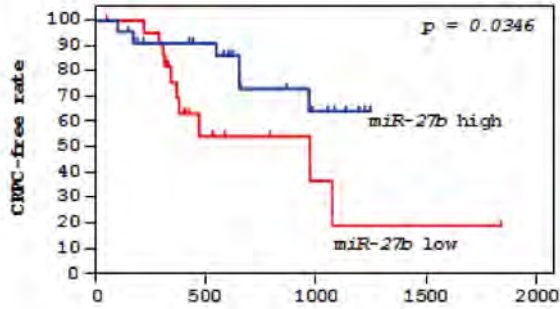


(3) miR-23b/27b/24はクラスターを形成しており、前立腺癌においてその発現は低下している。再燃までの期間を予測する因子として臨床因子を比較したところ、miR-27の発現レベルが予後因子になることが示された (Table 2)。miR-27bの発現を2群に分けると、その発現レベルが低い患者において、早期に再燃することが示された (図2)。以上から miR-23b/27b/24クラスターのなかで、miR-27 が最も強力な前立腺癌再燃の予後因子であることが示された。その標的遺伝子はGOLM1が候補としてあげられた。(2)

Table 2: Cox proportional analysis for the prediction of CRPC progression-free survival

Covariant	HR	95% CI	P-value
miR-27b	0.255	0.069-0.944	0.0407
Gleason score	3.003	0.747-5.374	0.1674
T stage	2.111	0.490-9.098	0.3162
cN stage	2.28	0.372-13.975	0.3729
cM stage	1.021	0.203-5.124	0.9799
PSA	1.001	1.000-1.001	0.0719
Age	1.045	0.949-1.150	0.3673

図 2



(4) miR-224 と miR-452 はクラスターを形成しており (図 3)、その発現は前立腺癌患者の組織内で相関しており、また前立腺癌細胞株においても発現が低下していた。ともに前立腺癌にて抑制されている癌抑制遺伝子として働くと考えられた。それぞれの発現を 2 群にわけ、再燃前の期間を Kaplan-Meier 法にて検討すると、miR-452 の発現の低値の群で、有意に予後が悪いことが示された (図 4)。前立腺癌細胞株 PC3 と DU145 に miR-452 を導入すると、細胞増殖、転移、浸潤能が抑制された。その標的遺伝子をデータベースを用いて解析すると、WWP1 遺伝子が候補としてあげられた。

図 3

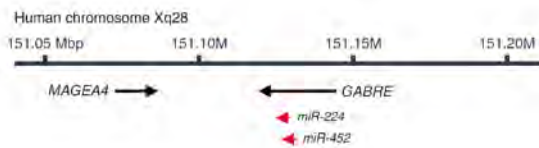
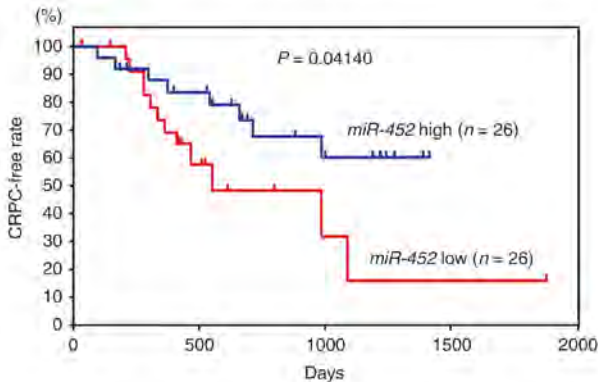
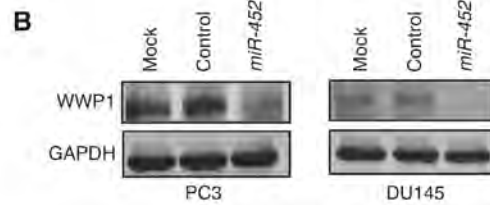


図 4



前立腺癌細胞株 PC3, DU145 に miR-452 を遺伝子導入すると、WWP1 の発現が著明に低下することから、miR-452 は WWP1 を制御していることが示された (図 5)

図 5



WWP1 の発現は、前立腺癌組織において強発現しており、正常前立腺癌ではほとんど発現していなかった (図 6)。今後は WWP1 の発現を抑制することが治療法のひとつの候補として挙げられる。(3)

図 6

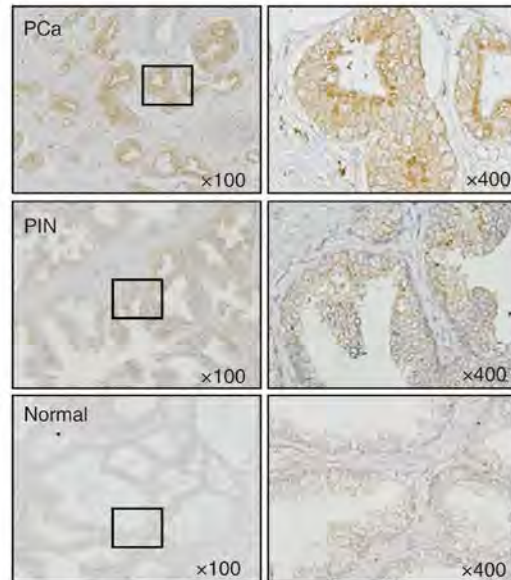
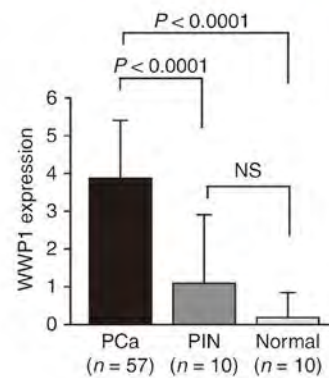


図 7



引用文献

(1) Y. Goto, S. Kojima, R. Nishikawa, et al., MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. Br J Cancer, 2015. 113(7):

p. 1055-65.

(2) Y. Goto, S. Kojima, R. Nishikawa, et al., The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*, 2014. **5**(17): p. 7748-59

(3) Y. Goto, S. Kojima, A. Kurozumi, et al., Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. *Br J Cancer*, 2016. **114**(10): p. 1135-44.

#### 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 16 件)

- ① S. Kojima, Y. Goto, and Y. Naya, The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. *J Hum Genet*, 2017. **62**(1): p. 25-31. DOI:10.1038/jhg.2016.69 査読有り
- ② Y. Goto, S. Kojima, A. Kurozumi, et al., Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. *Br J Cancer*, 2016. **114**(10): p. 1135-44. DOI:10.1038/bjc.2016.95 査読有り
- ③ Y. Goto, S. Kojima, R. Nishikawa, et al., MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer*, 2015. **113**(7): p. 1055-65. DOI:10.1038/bjc.2015.300 査読有り
- ④ R. Nishikawa, Y. Goto, S. Kojima, et al., Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. *Int J Oncol*, 2014. **45**(1): p. 401-10. DOI:10.3892/ijo.2014.2437 査読有り
- ⑤ S. Kojima, H. Enokida, H. Yoshino, et al., The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer. *J Hum Genet*, 2014. **59**(2): p. 78-87. DOI:10.1038/jhg.2013.121 査読有り
- ⑥ Y. Goto, R. Nishikawa, S. Kojima, et al., Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer. *FEBS Lett*, 2014. **588**(10): p. 1973-82. DOI:10.1016/j.febslet.2014.04.020 査読有り

- ⑦ Y. Goto, S. Kojima, R. Nishikawa, et al., The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*, 2014. **5**(17): p. 7748-59 DOI:10.18632/oncotarget.2294 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

- ① 小島聡子、納谷幸男 アビラテロン・エンザルタミドの最適な患者像は? S2-1 第 81 回 日本泌尿器科学会総会東部総会 2016 年 10 月 7 日~11 日 リンクステーション青森 (青森)
- ② Yusuke Goto, Satoko Kojima, Akira Kurozumi, Mayuko Kato, Atsushi Okato, Yukio Naya, Hideki Enokida, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Tomohiko Ichikawa, Naohiko Seki. Identification of dual tumorsuppressors (miR-225p/miR-223p) based on microRNA expression signature by deep sequencing of CRPC. Abstract: MP6618, AUA 2016, May 6-10, San Diego. (USA)
- ③ 小島聡子、藤本歩、金坂学斗、芳生旭辰、巢山貴仁、荒木千裕、増田広、納谷幸男 転移性前立腺癌 high volume disease における ALP および ALP flare up の予後因子としての意義 第 104 回日本泌尿器科学会総会 2016 年 4 月 23 日~25 日 仙台国際センター (仙台)
- ④ 五島悠介、小島聡子、西川里佳、松下良介、福本一郎、坂本信一、榎田英樹、中川昌之、納谷幸男、市川智彦、関直彦 去勢抵抗性前立腺癌マイクロ RNA 発現プロファイルに基づいた癌抑制型 miR-22/222 クラスターの機能解析 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日~10 月 10 日 名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑤ 五島悠介、小島聡子、市川智彦、関直彦 CRPC 臨床検体を用いた機能性 RNA 発見解析に基づく CRPC 治療標的活性化経路の探索 第 31 回前立腺シンポジウム 2015 年 12 月 12 日~12 月 13 日 品川コンファレンスセンター (品川)
- ⑥ 小島聡子、五島悠介、西川里佳、黒住顕、千代丸剛、榎田英樹、中川昌之、市川智彦、山崎一人、石田康生、関直彦、納谷幸男 去勢抵抗性前立腺癌マイクロ RNA 発現プロファイルに基づく新規分子ネットワークの解析. 第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 18 日~21 日 ホテル金沢 (金沢)
- ⑦ 小島聡子 去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対する新規治療薬の可能性 アストラゼネ

カ 第102回千葉泌尿器科集談会 ミラマ  
ーレホテル (千葉) 2014. 11. 29

[図書] (計 3件)

- ① 小島聡子 連載 専門医試験に役立つ前立腺知識：去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の診断と治療、Prostate Journal 医学図書出版 p 273-280, Vol3, No. 2, 2016 10月1日発刊 ISSN 2188-4978, ISBN 978-4-86517-182-2 2016年10月号 (Vol. 3 No. 2)
- ② 小島聡子、関直彦 新前立腺癌学 -最新の基礎研究と診断・治療- VI. 臨床応用を目指した基礎研究：バイオマーカーの開発：microRNA, 日本臨牀 74巻増刊号3、page 201-204, 2016年5月20日発行
- ③ 小島聡子 抗アンドロゲン療法と AWS 臨床泌尿器科 第69巻、第5号 page 340-346, 2015年4月20日発行

[その他]

ホームページ等

<http://genomejet.jp/>

## 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