

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06439

研究課題名(和文) micro RNAに着目した犬前立腺癌の分子病態解明と新規治療法への展開

研究課題名(英文) Elucidating molecular pathogenesis of canine prostate cancer focused on micro RNA

研究代表者

小林 正典 (Kobayashi, Masanori)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80600428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では犬前立腺癌細胞株を使用して、癌組織で上方制御されるmicroRNAのinhibitorを用いて細胞増殖抑制効果の有無を調査した。結果として、mir-330 inhibitorが犬前立腺癌細胞の増殖を阻害した。さらに、mir-330の標的候補遺伝子で癌抑制遺伝子であるPTPN9のmRNA発現量は、mir-330 inhibitor添加後に有意に増加した。さらに、アポトーシス関連マーカーの mRNA 発現レベルもまたmir-330 阻害剤の添加後に増加した。以上の結果から、Mir-330 阻害剤は、PTPN9 発現の制御を通じて犬前立腺癌細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではmir-330が癌抑制遺伝子であるPTPN9の発現調節を通じて、犬前立腺癌の増殖に寄与することを示唆した。これらの知見は未だ著効を示す治療が確立されていない犬前立腺癌に対するmir-330またはPTPN9を標的とした新たな分子標的治療戦略の基盤をなすだけでなく、同様の制御機構をもつ癌治療に対しても有益な知見を提供しうるものであり社会的な意義があるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, three canine prostate cancer cell lines were used to examine the cell proliferation suppressive effect in vitro using inhibitors of mir-18a, 95, 221, and 330, which are upregulated in cancer tissues. The results showed that mir-330 inhibitor had a high ability to inhibit cell proliferation in all of the cell lines. In addition, in order to identify the genes targeted by mir-330, we focused on the tumor suppressor genes PTPN9 and SPRY2 and performed mRNA expression analysis. The mRNA expression level of PTPN9 was significantly increased in all cells compared to the control group. On the other hand, although the expression level of SPRY2 was increased in all cells, the change in expression was not significant. Furthermore, the mRNA expression levels of apoptosis-related markers increased after the addition of mir-330 inhibitor. Mir-330 inhibitor was suggested to induce apoptosis in canine prostate cancer cells through regulation of PTPN9 expression.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：犬 前立腺癌 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はヒトと犬で自然発症する悪性腫瘍であり、犬においては前立腺周囲組織への局所浸潤性が強く、早期に遠隔転移が起こる。犬の前立腺癌の治療には、外科的治療、放射線治療または化学療法などが実施されるが、総じて有効性に乏しい。そのため、有効性が高く、有害な副作用が少ない新規の全身治療法の開発が求められている。

MicroRNA (miRNA) は 18~25 塩基長からなる低分子の 1 本鎖 non-coding RNA であり、標的となる messenger RNA (mRNA) の安定性やタンパク質の翻訳を調節する領域を含む 3' 末端非翻訳領域 (3' -UTR) に結合し、標的 mRNA の切断や翻訳阻害を通じて、タンパク質合成を抑制することで、様々な細胞機能を制御していると考えられている。また、miRNA は mRNA の結合部位の配列と完全に相補的でなくとも作用が発現することが知られており、1 つの miRNA は数百もの mRNA を標的とし、前立腺癌を含むヒトの様々な癌腫において、腫瘍細胞の分化・増殖、生存、細胞周期、遊走、浸潤、転移、血管新生などの病態形成機構に関わる遺伝子の発現調節に関与している。

我々は以前、前立腺癌および非腫瘍性疾患に罹患した犬の前立腺組織中の miRNA について発現プロファイリングを実施し、犬前立腺癌組織において 5 種類の miRNA (mir-18a, mir-95, mir-221, mir-222 および mir-330) の上方制御と、14 種類の miRNA (mir-127a, mir-148a, mir-205, mir-299, mir-329b, mir-335, mir-376a, mir-376c, mir-379, mir-380, mir-381, mir-411, mir-487b および mir-495) の下方制御が起こっていることを明らかにした (Kobayashi et al. J Vet Med Sci 79, 719-725, 2017)。これらの miRNA は新たな治療標的となるポテンシャルを持つものと考えられるが、miRNA によって制御を受ける標的遺伝子や癌の進展に関わる機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、以前に我々が樹立に成功している犬前立腺癌細胞株 (CHP-1、CHP-2、および CHP-3) を用いて、犬前立腺癌組織中で発現変化が認められる miRNA、特に上方制御されている mir-18a, mir-95, mir-221 および mir-330 を対象として、犬前立腺癌細胞に対して miRNA を *in vitro* で人工的に発現制御させることで、これらの miRNA の標的遺伝子およびその機能を明らかにし、犬前立腺癌の発症や進展に関わる病態機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 犬前立腺癌細胞株に対する miRNA inhibitor のトランスフェクション

はじめに、犬前立腺癌細胞株への miRNA inhibitor のトランスフェクション条件 (細胞密度、トランスフェクション試薬および添加濃度) の至適化を目的として、犬細胞を用いた既報告を参考に、トランスフェクション試薬として Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)、ネガティブコントロールとして Negative control A (QIAGEN)、遺伝子導入後に細胞死を誘導するポジティブコントロールとして AllStars Hs Cell Death siRNA (QIAGEN) を用いて検討した。

2) 犬前立腺癌細胞株に対する各種 miRNA inhibitor の細胞生存性解析

miRNA inhibitor による犬前立腺癌細胞の生存性および増殖能に対する影響を評価するため、犬前立腺癌細胞株 (CHP-1、CHP-2 および CHP-3) に mir-18a, mir-95, mir-221 および mir-330 inhibitor を至適化したトランスフェクション条件にて遺伝子導入した。96-well plate に細胞播種して 24 時間後に、inhibitor を添加し、添加後 72 時間まで、37 °C、5%CO₂ 環境下で培養した。Inhibitor 添加直前 (0 時間)、添加後 24 時間、48 時間および 72 時間に、培地に WST-1 cell proliferation Kit (Takara) を添加し、マイクロプレートリーダーを用いて生細胞数を評価した。

3) miRNA の標的遺伝子の同定を目的とした遺伝子発現解析

最も細胞増殖抑制効果が認められた mir-330 が標的とする遺伝子を同定するため、公開データベースである TargetScan (<http://www.targetscan.org>) および miRBase (<http://www.mirbase.org>) を用いて、がん抑制遺伝子として知られる protein tyrosine phosphatase non-receptor type 9 (PTPN9) および Sprouty RTK Signaling Antagonist 2 (SPRY2) に着目し、mRNA 発現解析を行った。Negative control A または mir-330 inhibitor の添加 72 時間後に、0.1%トリプシン処理により細胞を剥離した後、遠心分離を行い細胞ペレットを回収した。RNA は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出され、miScript II RT Kit (QIAGEN) にて逆転写し cDNA を合成した。リアルタイム PCR は TB Green Premix Ex Taq II (Takara) および 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて実施した。PCR 条件を以下に示す：初期変性 (95 °C、30 秒)、40 サイクルの変性 (95 °C、5 秒)、アニーリング (30

秒) および伸長 (72、30 秒)。各プライマーペアの塩基配列およびアニーリング温度については、表 1 に示す。内在性コントロールである GAPDH の Ct 値と各遺伝子の Ct 値を比較し相対定量を行い、Negative control A または mir-330 inhibitor 添加時の発現量を比較した (Ct 法)。

4) アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現解析

Mir-330 Inhibitor 投与による細胞増殖抑制効果をもたらした機序を明らかにするため、アポトーシス関連遺伝子である、Bcl-2-associated X protein (BAX)、Caspase 3 (CASP3) および Caspase 9 (CASP9) について、Negative control A または mir-330 inhibitor 添加時の発現量を比較した。リアルタイム PCR は上記と同様の条件で実施した。各プライマーペアの塩基配列およびアニーリング温度については、表 1 に示す。

Gene	Primer Sequence (5' to 3')	アニーリング温度 (°C)
PTPN9	F: GCTATGGGGATGTACCCTGC R: AGCCATCCATGAACTGGCA	63
SPRY2	F: ATCCGTGTGCAGCCCAAATC R: TTGCACTTGCCACAGTCCTC	60
BAX	F: TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT R: TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA	64
CASP3	F: GGAGCAGTTTTGTTTGCCTGC R: AGTCTAGTTCTGTACCTCGGCAG	64
CASP9	F: CCTTCCCAGGCTTTGTTTCC R: GCGAAACAGCATTAGCGACCC	61
GAPDH	F: TCATCTCTGCTCCTTCTGCTGAT R: GGCTAGAGGAGCCAAGCAGTT	60-64

表 1. リアルタイム PCR に用いたプライマー

4. 研究成果

1) 犬前立腺癌細胞株に対する高効率なトランスフェクション条件

CHP-1 細胞では 3000 細胞/96-well、inhibitor 濃度が 150 nM、RNAiMAX が 0.3 μ l/well の条件下で、72 時間培養後に 38-68%の細胞死、CHP-2 細胞では 2500 細胞/96-well、inhibitor 濃度が 200 nM、RNAiMAX が 0.5 μ l/well の条件下で、72 時間培養後に 53-58%の細胞死、CHP-3 細胞では 1000 細胞/96-well、inhibitor 濃度が 50 nM、RNAiMAX が 0.2 μ l/well の条件下で、72 時間培養後に 66-79%の細胞死が誘導された。添加 inhibitor 濃度において、ネガティブコントロール miRNA に対する明らかな細胞毒性は認められなかった。

2) 犬前立腺癌細胞株に対する miRNA inhibitor の抗腫瘍効果

3 種の犬前立腺癌細胞株 (CHP-1、CHP-2 および CHP-3) に対して、上記のトランスフェクション条件にて、mir-18a、mir-95、mir-221 および mir-330 inhibitor を遺伝子導入した。Inhibitor 添加後の生存細胞数の推移を示した代表的なデータを図 1-A に示す。結果として、CHP-1 細胞では inhibitor 添加後 24 時間または 48 時間経過後から、全ての inhibitor で有意に生存細胞数が減少し、inhibitor 添加から 72 時間後の生存細胞数は、mir-18a および mir-221 で 12%、mir-330 で 15%、mir-95 で 19%の減少が認められた。CHP-2 細胞では mir-221 を除き、inhibitor 添加後 24 時間または 48 時間経過後から有意に生存細胞数が減少した。Inhibitor 添加後 72 時間の生存細胞数は、mir-18a で 14%、mir-330 で 20%、mir-95 で 22%の減少が認められたが、mir-221 は 9%の減少と他の inhibitor よりも細胞増殖抑制効果が弱かった。CHP-3 細胞では、mir-330 のみで inhibitor 添加後 24 時間から有意に生存細胞数が減少した。Inhibitor 添加後 72 時間の生存細胞数は、mir-330 で 29%減少したものの、mir-18a で 7%、mir-95 で 4%、mir-221 で 2%と、これらの inhibitor については細胞増殖抑制効果が限定的であった (図 1-B)。

3) PTPN9 および SPRY2 の mRNA 発現変化

TargetScan および miRDB によって予測された mir-330 の標的遺伝子のうち、がん抑制遺伝子である PTPN9 および SPRY2 に着目し、inhibitor または Control A (NC) を添加してから 72 時間の mRNA 発現量を比較した。PTPN9 は全ての犬前立腺癌細胞株

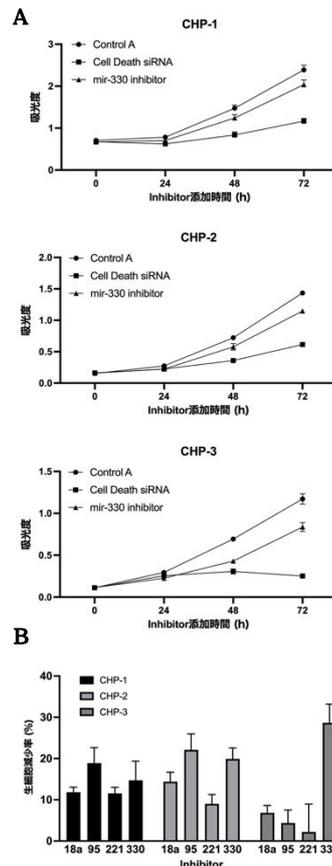


図 1. inhibitor 添加後の生存細胞数の推移 (A) および inhibitor 添加による犬前立腺癌細胞の生存細胞数減少率 (B)

で mRNA 発現量が有意に増加していた。Inhibitor 添加群の発現量は NC 比で、CHP-1 では 7.3 ± 1.2 倍 ($p < 0.01$)、CHP-2 では 2.1 ± 0.3 倍 ($p < 0.05$)、CHP-3 では 2.0 ± 0.3 倍 ($p < 0.05$) に増加した。SPRY2 は全ての犬前立腺癌細胞株において NC 比で、1.3~2.0 倍に増加していたものの、inhibitor 添加群と NC 添加群との間に有意差は認められなかった (図 2)。

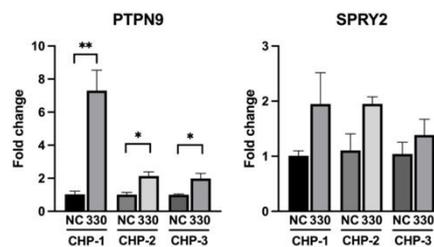


図 2. Control A (NC) または inhibitor 添加後の PTPN9 および SPRY2 の mRNA 発現量の変化

4) アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現変化

Mir-330 inhibitor 添加後の犬前立腺癌細胞の増殖抑制効果をもたらした機序を明らかにするため、アポトーシス関連マーカーである BAX、CASP3 および CASP9 の発現量を比較した。結果として、BAX は mir-330 inhibitor 添加群において、全ての犬前立腺癌細胞で NC 比 1.2~1.3 倍に mRNA の発現が増加しており、CHP-1 および CHP-3 で有意な増加を示した ($p < 0.05$)。CASP3 は mir-330 inhibitor 添加群において、全ての犬前立腺癌細胞で有意に発現増加していた。Inhibitor 添加群の発現量は NC 比で、CHP-1 では 1.69 ± 0.01 倍 ($p < 0.001$)、CHP-2 では 1.53 ± 0.05 倍 ($p < 0.001$)、CHP-3 では 1.82 ± 0.01 倍 ($p < 0.0001$) に mRNA 発現が増加した。CASP9 の mRNA 発現量は mir-330 inhibitor 添加群において、全ての犬前立腺癌細胞において NC 比 1.9~4.0 倍に増加傾向を示した (図 3)。

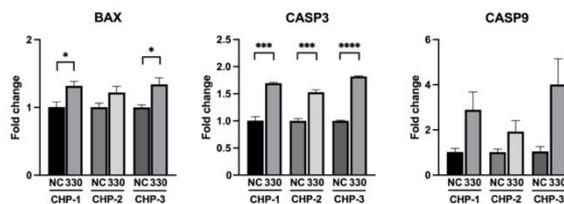


図 3. Control A (NC) または inhibitor 添加後の BAX、CASP3 および CASP9 の mRNA 発現量の変化

本研究では、犬前立腺癌組織中で発現増加を示した mir-18a、mir-95、mir-221 および mir-330 を対象として、inhibitor を用いた in vitro での細胞増殖抑制効果を検証した。全ての miRNA inhibitor において一定程度の細胞増殖抑制効果が認められたが、特に mir-330 は 3 種の犬前立腺癌細胞株において、高い細胞増殖抑制能を有していた。さらに、mir-330 inhibitor 添加後に PTPN9 の発現量が有意に増加していた。PTPN9 は、シグナル伝達経路の調節によってがん細胞の増殖、分化、遊走およびアポトーシスに関わることが、ヒトの乳がんや大腸がんなどで指摘されている [1, 2]。本研究においても、PTPN9 の発現上昇に起因してアポトーシス関連マーカーの mRNA 発現減少が認められており、犬前立腺癌の増殖に寄与していることが推察された。しかし、1 つの miRNA は平均 200 個の mRNA を標的とし、これらの発現を調節していると試算されており [3]、本研究で mRNA の発現上昇を示した PTPN9 以外にも、犬前立腺癌の増殖に関わる標的遺伝子が存在している可能性にも留意しなければならない。少なくとも本研究の知見は未だ著効を示す治療が確立されていない犬前立腺癌に対する mir-330 または PTPN9 を標的とした新たな治療戦略の基盤をなすものになると考えられる。

引用文献

1. Yuan T et al. Protein-tyrosine phosphatase PTPN9 negatively regulates ErbB2 and epidermal growth factor receptor signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem* 285, 14861-70, 2010.
2. Wang D et al. PTPN9 induces cell apoptosis by mitigating the activation of Stat3 and acts as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Cancer Manag Res* 11, 1309-1319, 2019.
3. Didiano, D. & Hobert, O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 13, 849-51, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagashima Tomokazu, Kobayashi Masanori, Kubo Yoshiaki, Nagaho Katsuya, Sugibayashi Kayoko, Saito Takahiro, Machida Yukino, Michishita Masaki	4. 巻 210
2. 論文標題 Prostatic stromal tumour of uncertain malignant potential in a dog	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 8~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcpa.2024.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------