

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20070

研究課題名(和文) 前立腺癌転移抑制型マイクロRNAが制御する細胞外マトリックス分子伝達機構の解明

研究課題名(英文) Tumor-suppressive microRNAs regulate ECM pathways in prostate cancer

研究代表者

西川 里佳 (Nishikawa, Rika)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：60746783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌のマイクロRNA発現プロファイル、および機能解析から、miR-29a/b/cが、癌細胞の遊走や浸潤を制御している事を見出した。更に、これらマイクロRNAが制御する転移促進遺伝子を探索した結果、Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2)を見出した。LOXL2は、コラーゲンの生合成に関与する遺伝子であり、細胞外マトリックスの肥厚化に関与している。細胞外マトリックスの異常は、癌の転移に関与している事が報告されている。LOXL2の発現を免疫染色法で調べた結果、前立腺癌細胞で高発現している事を認めた。癌細胞でLOXL2をノックダウンすると、前立腺癌細胞の遊走や浸潤が顕著に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Based on the miRNA expression signature of prostate cancer (PCa) showed that members of the microRNA-29 family (miR-29a/b/c) were reduced in PCa tissues, suggesting that they functioned as antitumor miRNAs. Ectopic expression of all member of miR-29 inhibited cancer cell migration and invasion. Genome-wide gene expression analysis and luciferase reporter assay demonstrated that lysyl oxidase like 2 (LOXL2) was directly regulated by antitumor miR-29a/b/c in PCa cells. Overexpressed LOXL2 was detected in PCa clinical specimens, and silencing of LOXL2 inhibited cancer cell migration and invasion in PCa cells. Basically, the function of the LOXL2 is covalent crosslinking of collagen and/or elastin in the ECM. Recent studies showed that aberrant expression of ECM proteins has been contributed to cancer cell metastasis. The identification of novel molecular pathways and targets regulated by the miR-29-LOXL2 axis may lead to a better understanding of PCa development and metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マイクロRNA 前立腺癌 miR-29a/b/c 細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

初期の前立腺癌は、通常、ホルモン感受性癌であるため、アンドロゲン遮断療法により治療効果が望める。しかしながら、多くの前立腺癌は、治療開始後約2年で去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となり、治療抵抗性になる事が知られている。去勢抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法は乏しく、やがて骨・リンパ節等に転移をきたし患者を死に至らしめる。去勢抵抗性に至った進行症例の前立腺癌に対して、遠隔転移の制御は臨床重要である。しかし、現在でも、遠隔転移をきたした症例に対する有効な治療法は無く、新規治療法の開発が望まれる。去勢抵抗性に至る前立腺癌の分子メカニズムや、遠隔転移に関与する分子メカニズムは、未だ十分に解明されていない。

ヒトゲノム解析研究の結果、ヒトゲノム中には蛋白をコードしないRNA分子が多数存在し、実際に転写されている事が判明した。その中で、僅か19塩基~22塩基の1本鎖RNA分子は、マイクロRNAと呼ばれる。1種類のマイクロRNAは、配列依存的に数百~数千種の機能性RNA(蛋白コード、非コード遺伝子)の発現を制御している事から、細胞内ではマイクロRNA-機能性RNAの極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。マイクロRNAの発現異常は、機能性RNAネットワークの破綻をきたし、ヒト疾患の原因となる事が報告されている。癌の研究においても、マイクロRNAの発現異常が、癌細胞の発生、進行、転移に重要な役割を担っている事が相次いで報告されている。前立腺癌においても、マイクロRNA研究は世界規模で精力的に行われており、癌促進型、癌抑制型のマイクロRNAが探索されている。このような背景の中、我々も、ホルモン感受性癌前立腺癌臨床検体を用いて、ホルモン感受性前立腺癌・マイクロRNA発現プロファイルを作製した。プロファイルに基づき、前立腺癌組織で発現が抑制されている

マイクロRNAに着目し、「前立腺癌・癌抑制型マイクロRNA」の探索を行った。その結果、miR-145は、前立腺癌組織で発現が抑制されており、miR-145を前立腺癌細胞に核酸導入する事により、癌細胞の遊走能・浸潤能を抑制した。この事から、miR-145は、前立腺癌・癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。更に、ゲノム科学的手法を用いて、miR-145が制御する前立腺癌機能性RNAを探索する事が可能であった。

以上から、去勢抵抗性前立腺癌において発現変動するマイクロRNAを起点として、去勢抵抗性前立腺癌の遠隔転移に関与する分子メカニズムの探索が可能である事が示唆された。

## 2. 研究の目的

現在、治療法が限定される去勢抵抗性前立腺癌・遠隔転移に対して、新規治療法の開発へ向けた基礎的知見を得る事を目的とした。去勢抵抗性前立腺癌・癌抑制型マイクロRNAを起点とした、機能性RNAネットワーク解析を施行し、去勢抵抗性前立腺癌遠隔転移に関わる分子を探索する。

## 3. 研究の方法

研究は以下の手順で進める事とする。

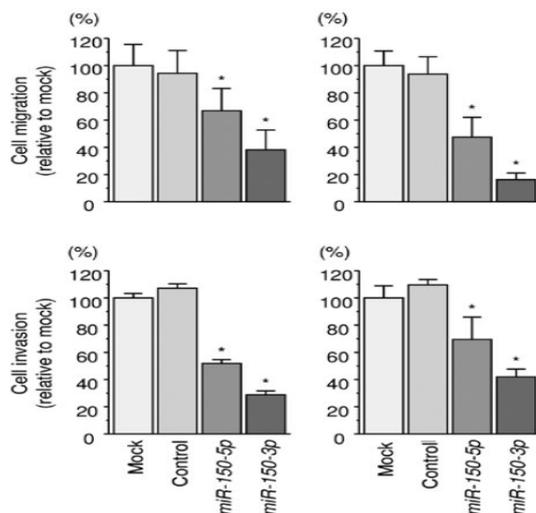
- (1) 去勢抵抗性前立腺癌・マイクロRNA発現プロファイルを作製し、癌組織で発現抑制されているマイクロRNAを見出す。
- (2) 癌組織で発現抑制が認められたマイクロRNAの機能解析から、去勢抵抗性前立腺癌・転移に関わるマイクロRNAを探索する。
- (3) ゲノム科学的手法(マイクロアレイ解析、データベース解析)から、マイクロRNAが制御する機能性RNAネットワーク解析を行い、去勢抵抗性前立腺癌・転移に関わる分子を探索する。
- (4) マイクロRNAの標的分子の機能解析を施行し、去勢抵抗性前立腺癌・転移への関与を証明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 去勢抵抗性前立腺癌・マイクロ RNA 発現プロファイルの作製

ホルモン遮断療法に対して、治療抵抗性を獲得した去勢抵抗性前立腺癌組織を用いて、RNA-sequence により、マイクロ RNA 発現プロファイルを作製した。去勢抵抗性前立腺癌組織において、発現が抑制されているマイクロ RNA に着目し、機能解析を施行した。結果、miR-145-5p、miR-145-3p、miR-150-5p、miR-150-3p が癌抑制機能を有する事を認めた。マイクロ RNA の生合成においては、passenger strand は、機能しない事が一般的であるが、本結果は、マイクロ RNA の guide strand および、passenger strand が、共に、癌抑制型マイクロ RNA として機能している事を明らかにした。

マイクロ RNA、miR-150-5p (guide strand) および miR-150-3p (passenger strand) を、前立腺癌細胞株 (PC3、PC3M) へ核酸導入し、癌細胞の遊走能と浸潤能を検討した。miR-150-5p、miR-150-3p は、前立腺癌細胞の遊走能と浸潤能を顕著に抑制する事を認めた (図 1)。



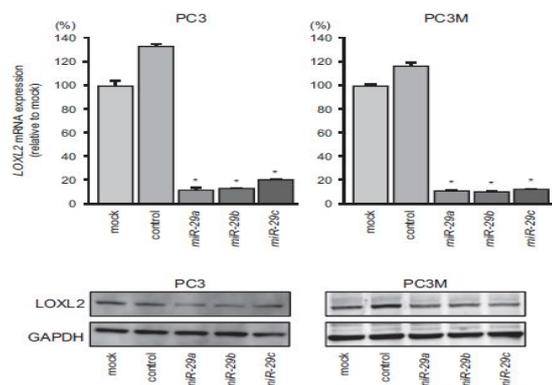
(図 1) 前立腺癌細胞株に核酸導入後 48 時間の癌細胞の遊走能 (上段)・浸潤能 (下段) の変化。遊走能・浸潤能ともに抑制された。

##### (2) 前立腺癌細胞の遊走能・浸潤能を抑制する「転移抑制型マイクロ RNA」の探索と「転移抑制型マイクロ RNA」が制御する標的分子の探索

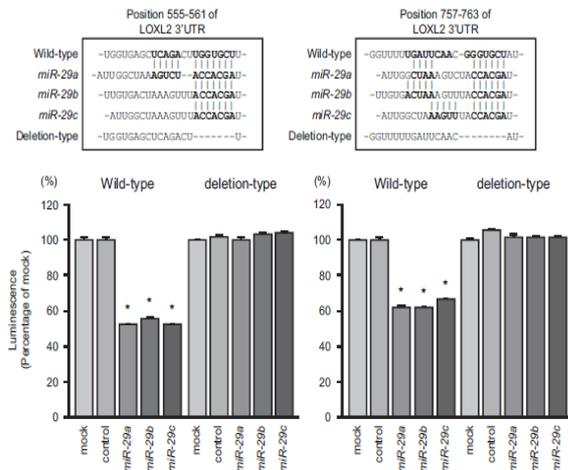
去勢抵抗性前立腺癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA に着目し、機能解析を施行した。癌細胞の遊走能・浸潤能を抑制するマイクロ RNA を探索した結果、miR-29-family (miR-29a、miR-29b、miR-29c) が、前立腺癌細胞の遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事を見出した。次に、miR-29-family が制御する癌促進型遺伝子を、ゲノム科学的手法を用いて探索した。その結果、Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) を見出した。LOXL2 は、コラーゲンの生合成に関与する遺伝子であり、細胞外マトリックスの肥厚化に関与している。細胞外マトリックスの異常発現は、癌の転移に関与している事が報告されている。

miR-29-family (miR-29a、miR-29b、miR-29c) を、前立腺癌細胞株 (PC3、PC3M) に核酸導入すると、mRNA および蛋白レベルで、LOXL2 の発現抑制を認めた (図 2)。

更に、Luciferase reporter assay により、miR-29-family が、LOXL2 の 3'UTR に直接結合する事を証明した (図 3)。これらより、転移抑制型マイクロ RNA である miR-29-family は、LOXL2 を直接制御している事が明らかとなった。



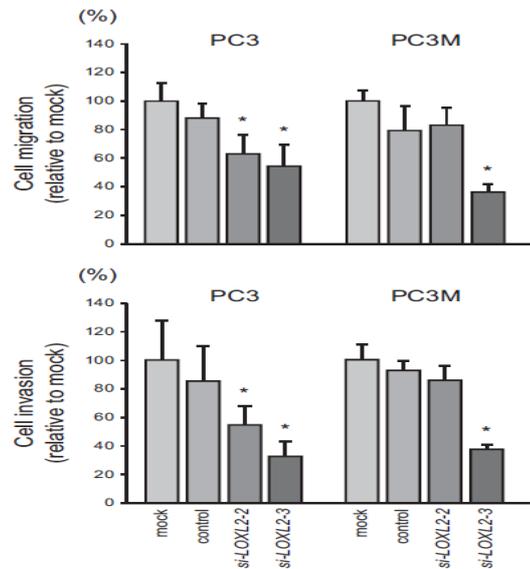
(図 2) 前立腺癌細胞株に miR-29s を核酸導入することにより LOXL2 の発現が抑制された。



(図 3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ。LOXL2 遺伝子の 3' UTR に miR-29s が直接結合することが確認された。

### (3) 前立腺癌における Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) の機能解析

転移抑制型マイクロ RNA である miR-29-family が制御する LOXL2 が、前立腺癌細胞で、癌促進機能を有するか、siRNA を用いて機能解析を施行した。その結果、前立腺癌細胞株 (PC3、PC3M) において、LOXL2 をノックダウンすると、癌細胞の遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事を認めた(図 4)。前立腺癌臨床検体における LOXL2 の発現を、免疫組織染色で検討した。その結果、LOXL2 は、正常前立腺では発現が殆どないが、Prostatic intraepithelial neoplasia を経て癌に移行するに従い、その発現が強くなる事を確認した。これらの事から、LOXL2 は、前立腺癌において、転移に関わる癌促進型遺伝子として機能している事が明らかとなった。



(図 4) siRNA を用いて LOXL2 をノックダウンすると、前立腺癌細胞株の遊走能・浸潤能が抑制された。

### (4) 考察

去勢抵抗性前立腺癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、複数の癌抑制型マイクロ RNA を探索する事が可能であった。このプロファイルには、前立腺癌で機能解析が行われていないマイクロ RNA が多数含まれており、今後の解析の対象となる。本プロファイルに基づき、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA、miR-29-family (miR-29a, miR-29b, miR-29c) に着目し、その機能解析と、マイクロ RNA が制御する癌促進型遺伝子の探索を行った。その結果、Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) が、前立腺癌の転移促進遺伝子である事を見出した。LOXL2 は、前立腺癌で高発現しており、治療の標的分子である事が示唆された。癌抑制型マイクロ RNA を起点とした、前立腺癌の分子ネットワークの探索により、本疾患の分子メカニズムが明らかになり、治療標的分子の探索に貢献する事が示された。

## 5. 主な論文発表など

[雑誌論文]

Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer.

Kato M, Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Okato A, Nishikawa R, Fukumoto I, Koshizuka K, Ichikawa T, Seki N.

J Hum Genet. (2017) 62:123-132. (査読有)

Regulation of the collagen cross-linking enzymes LOXL2 and PLOD2 by tumor-suppressive microRNA-26a/b in renal cell carcinoma.

Kurozumi A, Kato M, Goto Y, Matsushita R, Nishikawa R, Okato A, Fukumoto I, Ichikawa T, Seki N.

Int J Oncol. (2016) 48: 1837-46. (査読有)

Tumor-suppressive microRNA-29 family inhibits cancer cell migration and invasion directly targeting LOXL2 in lung squamous cell carcinoma.

Mizuno K, Seki N, Mataka H, Matsushita R, Kamikawaji K, Kumamoto T, Takagi K, Goto Y, Nishikawa R, Kato M, Enokida H, Nakagawa M, Inoue H.

Int J Oncol. (2016) 48:450-60. (査読有)

Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer.

Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Fukumoto I, Kato M, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N.

Cancer Sci. (2016) 107:84-94. (査読有)

Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma.

Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Kato M, Kurozumi A, Nishikawa R, Goto Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

J Hum Genet. (2016) 61:109-18. (査読有)

MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker.

Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, Matsushita R, Yamazaki K, Ishida Y, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

Br J Cancer. (2015) 113:1055-65. (査読有)

Tumour-suppressive microRNA-29s directly regulate LOXL2 expression and inhibit cancer cell migration and invasion in renal cell carcinoma.

Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Ishihara T, Matsushita R, Goto Y, Fukumoto I, Nakagawa M, Seki N.

FEBS Lett. (2015) 589:2136-45. (査読有)

MicroRNA-26a/b directly regulate La-related protein 1 and inhibit cancer cell invasion in prostate cancer.

Kato M, Goto Y, Matsushita R, Kurozumi A, Fukumoto I, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N.

Int J Oncol. (2015) 47:710-8. (査読有)

MicroRNA-205 inhibits cancer cell migration and invasion via modulation of centromere protein F regulating pathways in prostate cancer.

Nishikawa R, Goto Y, Kurozumi A, Matsushita R, Enokida H, Kojima S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N.

Int J Urol. (2015) 22:867-77. (査読有)

Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer.

Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Goto Y, Nishikawa R, Mataka H, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Br J Cancer. (2015) 113:282-9. (査読有)

The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyomaru T, Goto Y, Fukumoto I, Usui H, Mitsuhashi A, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N.

Int J Oncol. (2015) 47:325-34. (査読有)

[学会発表]

AACR Annual Meeting 2016 (April 16-20, 2016, New Orleans, Louisiana, USA)  
Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly regulate metastasis-promoting LOXL2 in prostate cancer  
Mayuko Kato, Akira Kurozumi, Yusuke Goto, Ryosuke Matsushita, Ichiro Fukumoto, Atsushi Okato, Rika Nishikawa, Shinichi Sakamoto,

Tomohiko Ichikawa, Naohiko Seki

第 75 回日本癌学会学術集会

(2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

Regulation of metastatic-promoting LOXL2 gene expression by tumor-suppressor miRNAs in prostate cancer.

加藤繭子、黒住顕、五島悠介、松下良介、岡東篤、西川里佳、福本一郎、塚越慶一、市川智彦、関直彦

第 75 回日本癌学会学術集会

(2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer.

黒住顕、五島悠介、松下良介、福本一郎、加藤繭子、西川里佳、坂本信一、榎田英樹、中川昌之、市川智彦、関直彦

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西川 里佳 (NISHIKAWA RIKA)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号 : 60746783