

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 20 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：15K20071

研究課題名(和文) 機能性RNA活性化シグナル遮断による去勢抵抗性前立腺癌新規治療法の探索

研究課題名(英文) Identification of novel CRPC therapeutics by inhibition of activated functional RNA signaling

研究代表者

五島 悠介 (GOTO, Yusuke)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00710576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：治療抵抗性を呈した前立腺癌で活性化している分子経路の探索を行う為、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)転移巣、正常前立腺、未治療前立腺癌からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を施行した。バイオインフォマティクス解析により遺伝子発現を比較し、CRPCにおいて特異的に発現変動するマイクロRNAの探索を行った。その結果、miR-221/222がCRPCにおいて有意に発現低下していることがわかった。さらに、ゲノム科学的手法により、マイクロRNAが制御する、CRPCにおける新規癌遺伝子の探索を行った。その結果、miR-221/222が直接制御する遺伝子としてEcm29を見出した。

研究成果の概要(英文)：Understanding the molecular mechanisms of the androgen-independent and metastatic signaling pathways underlying castration-resistant prostate cancer (CRPC) using current genomic approaches would help to improve therapies for and prevention of the disease. We sequenced small RNA libraries isolated from normal prostate tissue, prostate cancer (PCa) tissue and CRPC tissue. 267 miRNAs were significantly downregulated in CRPC compared with normal prostate specimen. miR-221/222 cluster was significantly downregulated in CRPC specimen. Gene expression data and in silico analysis demonstrated miR-221/222 regulated Ecm29 gene, which was highly expressed in CRPC specimen.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 マイクロRNA 去勢抵抗性前立腺癌

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米で罹患率 1 位、死亡率 2 位の癌であり、近年、本邦においても急激に罹患率、死亡率ともに上昇している癌である。いずれ国内の前立腺癌患者数は、全癌種のうち肺癌に次いで罹患率 1 位になる事が予測されている。前立腺癌は男性ホルモン依存性に増殖することから、当初はホルモン療法により治療効果が望める。しかしながら、徐々に治療に対する耐性機構を獲得し、血清低テストステロン値でも進展可能な去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となることが知られている。

近年、CRPC に対する新規治療薬が次々と開発されているが、予後延長効果は限定的である。この現状に対して、世界中で前立腺癌のホルモン非依存的な増殖の分子メカニズムの解明を試みているが、未だその分子機構は不明である。

ヒトゲノム解析研究の成果として、ゲノム中には蛋白をコードしないノンコーディング RNA が多数存在する事が判明した。その中で、わずか 19 塩基 ~ 22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子はマイクロ RNA と呼ばれる。マイクロ RNA は配列依存的にタンパクコード遺伝子の 3'UTR に結合し、その遺伝子の発現を制御すると考えられている。癌を含む様々な疾患で、マイクロ RNA の異常発現がタンパクコード遺伝子の発現異常にもたらし、疾患を惹起すると考えられている。1つのマイクロ RNA が数千種の蛋白コード遺伝子を制御し、また、逆にタンパクコード遺伝子の半数以上がマイクロ RNA の制御を受けているとの報告もある。この事は、基点となるマイクロ RNA を見出し、その制御する遺伝子群を網羅的に解析する事で、新たな分子ネットワークが見出せる可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では、様々な治療に抵抗性を示した CRPC 検体について、網羅的マイクロ RNA 発現解析を行ない、その結果を基に制御機構を解析することで、新たな CRPC 進展機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いた CRPC で特異的に発現変動する新たなマイクロ RNA の探索

様々な治療に抵抗性を示した CRPC 剖検検体 3 症例 4 検体について、RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的 RNA 解析を行なった。さらに、同時に、経直腸前立腺針生検で得た正常前立腺組織ならびに未治療前立腺癌組織についても、5 検体ずつ、RNA を抽出した。これら計 14 検体について、低分子の RNA 分画から cDNA ライブラリーを作成後、次世代シーケンサーを用いた解析を施行した。これら 3 グループ、14 検体のデータを比較し、治療抵抗性 CRPC において有意に発現が変動するマイクロ RNA を抽出し、解

析の候補とした。

(2) CRPC 増殖・進展に関わる新規マイクロ RNA ネットワークの解明

治療抵抗性 CRPC において特異的に発現変動するマイクロ RNA を探索した。特に、CRPC において発現低下するマイクロ RNA を抽出し、独自に「去勢抵抗性前立腺癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。特に CRPC で発現低下するマイクロ RNA に注目した。これらマイクロ RNA は CRPC における癌抑制型マイクロ RNA の候補であると考えられた。候補となったマイクロ RNA については非癌前立腺組織、前立腺癌組織、CRPC 組織で発現レベルの確認を行った。さらに、マイクロ RNA をそれぞれ前立腺癌細胞に核酸導入し、それぞれのマイクロ RNA について機能解析を行なった。

(3) CRPC の増殖・進展シグナル伝達系の探索

次に、マイクロ RNA が制御する分子探索を行った。公共のデータベースであるターゲットスキャンを用いてマイクロ RNA が配列依存的に制御する遺伝子を探索した。さらに、GEO (Gene Expression Omnibus) データベースと、実際に前立腺癌細胞株にマイクロ RNA を核酸導入後にマイクロアレイ解析を行ない、これらを組み合わせ、CRPC において発現亢進する分子群を探索した。また、治療抵抗性 CRPC における遺伝子群の発現を確認するため、免疫染色を施行した。最後に、si-RNA を用いてこれら遺伝子をノックダウンし、前立腺癌細胞における効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) CRPC・マイクロ RNA 発現プロファイルの作成

miRNA	Log FC	P Value
hsa-miR-205-3p	-8.408	2.80E-10
hsa-miR-390-3p	-6.626	1.21E-09
hsa-miR-6510-3p	-6.536	1.05E-12
hsa-miR-31-5p	-6.354	2.21E-27
hsa-miR-3943	-4.655	8.14E-06
hsa-miR-145-5p	-4.645	7.07E-35
hsa-miR-1247-5p	-4.546	3.97E-10
hsa-miR-204-5p	-4.54	1.96E-10
hsa-miR-222-3p	-4.495	1.88E-20
hsa-miR-184	-4.483	1.97E-06
hsa-miR-31-3p	-4.305	5.90E-05
hsa-miR-187-3p	-4.257	3.38E-10
hsa-miR-221-3p	-4.22	5.40E-29
hsa-miR-143-5p	-4.198	7.66E-21
hsa-miR-133c-5p	-4.17	2.01E-06
hsa-let-7c-3p	-4.152	1.33E-06
hsa-miR-205-3p	-4.128	0.000661
hsa-miR-133a-3p	-4.055	9.73E-05
hsa-miR-145-3p	-3.93	1.31E-21
hsa-miR-100-3p	-3.859	2.08E-07
hsa-miR-222-5p	-3.853	0.0026538
hsa-miR-221-5p	-3.769	1.18E-14
hsa-miR-1290-5p	-3.686	0.0021627
hsa-miR-873-5p	-3.599	3.63E-06
hsa-miR-150-5p	-3.454	9.52E-13
hsa-miR-393-5p	-3.244	0.0126085
hsa-miR-125b-5p	-3.234	7.45E-13
hsa-miR-510a-3p	-3.229	0.0072164
hsa-miR-211-5p	-3.205	0.013935

CRPC4 検体、未治療前立腺癌組織 5 検体、正常前立腺組織 5 検体に対してシーケンズ解析を行なうと、16,085,486 から 22,552,510 個の小 RNA 分子が得られた。

CRPC と非癌前立腺組織を比較すると、CRPC において、267 個のマイクロ RNA が有意に発現低下していた。これらマイクロ RNA のうち、特に CRPC で発現の低下が大きかったものを上図に示す。これらは CRPC において発現低下していたものである。癌において発現が低下するマイクロ RNA は、癌遺伝子を標的として働いている可能性が高いと考えられている。よって、このリストに挙げたマイクロ RNA が、CRPC における癌抑制型マイクロ RNA である可能性が高いと考えた。

これらマイクロ RNA のヒト染色体上の位置を調べると、染色体上の同じ領域に存在するマイクロ RNA (クラスターマイクロ RNA) が複数見出された。さらに、これらクラスターマイクロ RNA のパッセンジャー鎖とガイド鎖の両方が同時に含まれていることが分かった。これまでの報告では、このガイド鎖が標的分子の 3' 非翻訳領域に結合し、その標的分子を制御すると言われ、逆にパッセンジャー鎖は分解され機能しないと考えられていた。しかしながら、本プロファイルにはパッセンジャー鎖も含まれるため、機能未知のパッセンジャー鎖についても機能解析ならびに標的分子探索を継続することとした。

#### (2) CRPC 増殖・進展に関わる新規マイクロ RNA ネットワークの解明

前立腺癌細胞株 PC3, DU145 に miR-221-3p/5p ならびに miR-222-3p/5p を核酸導入すると、その増殖、遊走、浸潤のいずれかを抑制し、これらマイクロ RNA は前立腺癌において癌抑制型マイクロ RNA として機能していることが分かった。次に、miR-221-3p/5p ならびに miR-222-3p/5p の発現を RT-PCR で臨床検体を用いて確認すると、非癌組織に比べて、前立腺癌において発現が低下し、CRPC においてはさらに発現が低下することが分かった。

#### (3) CRPC の増殖・進展シグナル伝達系の探索

治療抵抗性前立腺癌において発現低下し、癌抑制型マイクロ RNA として機能しているマイクロ RNA は、癌遺伝子を標的とする可能性が高い。そこで、まず、データベースを用いた解析により、マイクロ RNA の配列を基に、標的とする遺伝子群を探索、次に、前立腺癌細胞株に癌抑制型マイクロ RNA を実際に核酸導入した状態で網羅的に遺伝子解析を行ない、発現低下した遺伝子群を抽出、さらに、前立腺癌臨床検体で発現亢進する遺伝子を抽出した。

これら前立腺癌における癌遺伝子の候補について、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、直接、癌抑制型マイクロ RNA が標的分子を制御することを証明し、マイクロ RNA の核酸導入後に標的分子を測定、標的分子の発現が低下することを確認した。さらに、si-RNA を用いたノックダウン解析、insilico 解析や、臨床検体における発現確認を行うことで、前立腺癌における癌遺伝子としての機能を確認し、前立腺癌進展の新規メカニズム解明を試みた。解析の結果、癌細胞の浸潤・遊走を抑制する microRNA-221/222 は、これまで癌における機能不明であった Ecm29 を直接制御し、治療抵抗性前立腺癌臨床検体では Ecm29 高発現を認める検体が複数認められた。さらに、si-RNA を用いて Ecm29 をノックダウンすると、癌細胞の遊走と浸潤を有意に抑制した。この結果から、前立腺癌において、

miR-221/222 の発現低下と Ecm29 の発現亢進は、癌細胞の遊走、浸潤の亢進に寄与している可能性が示唆された。

#### 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)

1. Kojima S, Goto Y, Naya Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. *J Hum Genet.* 62: 25-31, 2017. doi: 10.1038/jhg.2016.69 (査読有)

2. Goto Y, Kojima S, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Matsushita R, Ichikawa T, Seki N. Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. *Br J Cancer.* 114: 1135-1144, 2016. doi:10.1038/bjc.2016.95 (査読有)

3. Okato A, Goto Y, Kurozumi A, Kato M, Kojima S, Matsushita R, Yonemori M, Miyamoto K, Ichikawa T, Seki N. Direct regulation of LAMP1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer. *Int J Oncol.* 49: 111-122, 2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3522. (査読有)

4. Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Fukumoto I, Kato M, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer. *Cancer Sci.* 107:84-94, 2016. doi: 10.1111/cas.12842. (査読有)

5. 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. 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.* 113: 1055-1065, 2015. doi: 10.1038/bjc.2015.300. (査読有)

6. Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol.* 22: 242-252, 2015. doi: 10.1111/iju.12700. (査読有)

7. Kato M, Goto Y, Matsushita R, Kurozumi

A, Fukumoto I, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA-26a/b directly regulate La-related protein 1 and inhibit cancer cell invasion in prostate cancer. *Int J Oncol.* 47: 710-718, 2015. doi: 10.3892/ijo.2015.3043. (査読有)

8. Nishikawa R, Goto Y, Kurozumi A, Matsushita R, Enokida H, Kojima S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA-205 inhibits cancer cell migration and invasion via modulation of CENPF regulating pathways in prostate cancer. *Int J Urol.* 22: 867-877, 2015. doi: 10.1111/iju.12829 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

1. Goto Y, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Kojima S, Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Regulation of UHRF1-mediated pathways by tumor-suppressive microRNA-101 in molecular targeted therapy resistant renal cell carcinoma. AUA annual meeting 2016. MP92-10 (moderated poster) 05/10/2016, San Diego, USA

2. Goto Y, Kojima S, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Naya Y, Enokida H, Matsushita R, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Identification of dual tumor-suppressors (miR-222-5p/miR-222-3p) based on microRNA expression signature by deep sequencing of CRPC. AUA annual meeting 2016. MP66-18 (moderated poster) 05/09/2016, San Diego, USA.

3. 五島悠介、小島聡子、松下良介、黒住顕、加藤繭子、西川里佳、坂本信一、榎田英樹、中川昌之、納谷幸男、市川智彦、関直彦. 全ゲノム CRPC 機能性 RNA 発現解析に基づく CRPC 活性化分子経路の探索. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 2016 年 4 月 25 日. 仙台国際センター (宮城県仙台市).

4. Goto Y, Kurozumi A, Nishikawa R, Kato M, Sakamoto S, Kojima S, Naya Y, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Targeting multiple functions of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) signaling by miR-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. AUA annual meeting 2015. MP46-17 (moderated poster) 05/17/2015 New Orleans, USA.

〔その他〕

ホームページ等

<http://genomejet.jp/>

千葉大学大学院医学研究院『先端研究部門  
先端がん治療学研究講座 機能ゲノム学』ホ  
ームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五島 悠介 (GOTO, Yusuke)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00710576