

令和元年5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05462

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における機能性RNA分子経路の解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the microRNA-mediated RNA networks in castration resistant prostate cancer and development of innovative treatments

研究代表者

市川 智彦 (Ichikawa, Tomohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20241953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌臨床検体を用いたマイクロRNA発現プロファイルを独自に作成し、去勢抵抗性前立腺癌に関連する癌抑制型マイクロRNAの探索および機能解析を行なった。更に、癌抑制型マイクロRNAが制御する癌遺伝子の探索を行った。miR-452, miR-320a, miR-26a/b, miR-29a/b/c, miR-218, miR-145-3p, miR-150-5p/3p, miR-205-5p, miR-99a-3p, miR-455-5p/3p, miR-199a/b-3pが前立腺癌の癌抑制型マイクロRNAである事を証明し、それらが制御する遺伝子について明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌で発現異常を認めるマイクロRNAの機能性RNA分子ネットワークの解析を行うことにより、前立腺癌やCRPCの機能性RNA分子ネットワークの解析を進める事ができた。それらが制御する癌遺伝子は前立腺癌の予後を予測することが可能な分子マーカーであった。これにより、前立腺癌の診療、特に去勢抵抗性前立腺癌の診断や治療への道筋をつけることができた。今後の研究の展開により新規治療法を確立するための基盤を整えることができた。

研究成果の概要(英文)：We constructed the microRNA (miRNA) expression signature of castration-resistant prostate cancer (CRPC) using clinical specimens, and investigated the functional significance of tumor-suppressive miRNAs. We further investigated oncogenes regulated by the tumor-suppressive miRNAs. We have revealed that miR-452, miR-320a, miR-26a/b, miR-29a/b/c, miR-218, miR-145-3p, miR-150-5p/3p, miR-205-5p, miR-99a-3p, miR-455-5p/3p, and miR-199a/b-3p function as tumor suppressors in prostate cancer. We have also identified the genes regulated by those miRNAs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 癌抑制 転移抑制 去勢抵抗性 マイクロRNA 泌尿器癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の機序は、アンドロゲン受容体 (AR) の解析とともに明らかとなってきたが、依然 CRPC を克服するには至っていない。近年、19~21 塩基の低分子 RNA であるマイクロ RNA が癌の進展・転移・治療抵抗性獲得に関わっている事が報告されている。しかし、前立腺癌、特に CRPC におけるマイクロ RNA の関与は十分に研究されておらず不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) 本研究グループが作成した、「アンドロゲン依存性前立腺癌マイクロ RNA 発現プロファイル」および「CRPC マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づき、「癌抑制型マイクロ RNA」探索する。
- (2) 探索可能であったマイクロ RNA を起点として、CRPC で活性化している分子経路を同定する。
- (3) 更に、活性化経路を遮断する治療戦略を立案し、CRPC に対する革新的治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

CRPC で活性化している分子経路を同定し、その活性化経路を遮断する治療戦略を立案し、CRPC に対する革新的治療法の確立を目指す。そのために、以下の手順で研究を遂行して行く。

- (1) マイクロ RNA 発現プロファイルから、発現が抑制されているマイクロ RNA に着目し、癌細胞株 (PC3/PC3M/DU145) にマイクロ RNA を核酸導入し、癌細胞の増殖・遊走・浸潤・アポトーシス誘導を指標にした機能解析を継続し、「癌抑制型マイクロ RNA」候補を増やす。
- (2) 「癌抑制型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA 分子経路の探索から、CRPC で活性化している分子経路を見出す。
- (3) CRPC で活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro における検証を行う。
- (4) 前立腺癌細胞株 PC3 - GFP または PC3M を用いた転移モデルマウスの解析から、(3) で見出した治療戦略の検証を、in vivo で行う。

4. 研究成果

(1) miR-452 の解析：前立腺癌組織を用いたマイクロ RNA 発現プロファイルにおいて発現抑制されている miR-452 を同定し機能解析を行った。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞に核酸導入した結果、癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する事を見出した。この事から、miR-452 は癌抑制機能を有する事が判明した。また、臨床検体の解析で miR-452 の発現抑制が去勢抵抗性となるまでの期間を予測する因子となることを示した。(図1) miR-452 の標的分子として WWP1 遺伝子を同定した。この標的分子は癌細胞の浸潤・遊走を促進する癌遺伝子機能を有しており、臨床検体において発現が更新していることを示した。

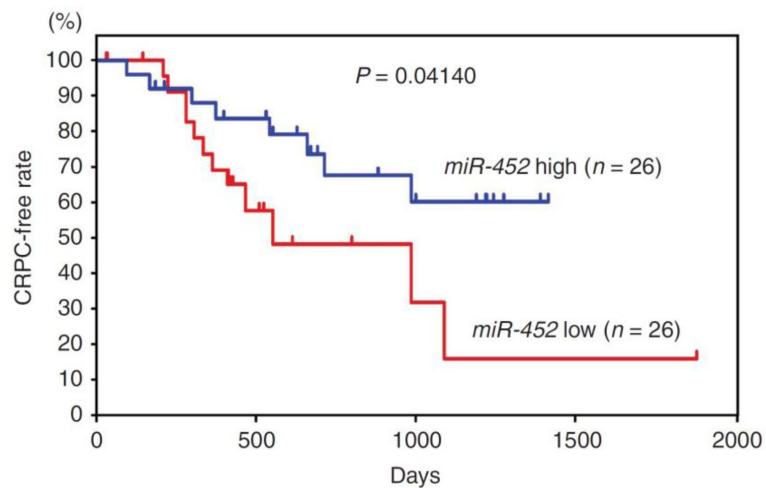


図1 miR-452 の発現と去勢抵抗性となるまでの期間

(2) miR-320a の解析：新規に作成した去勢抵抗性前立腺癌組織を用いたマイクロ RNA 発現プロファイルを解析し、発現抑制を認めた miR-320a について機能解析を行った。その結果、癌細胞の浸潤を抑制する癌抑制型マイクロ RNA である事を示した。miR-320a が制御する分子として、LAMP1 遺伝子を同定し、この分子が前立腺癌組織において過剰に発現していることを明らかにした。

(3) miR-26a/b, miR-29a/b/c, miR-218 の解析：前立腺癌組織において著明に発現抑制されている 6 つのマイクロ RNA (miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-218) についてさらに解析した。これらが共通して制御し前立腺癌の転移を促進する 35 の候補遺伝子を同定した。この中で LOXL2 遺伝子が前立腺癌で過剰発現している事や、発現を抑制することにより前立腺癌細胞の浸潤・遊走を抑制することを明らかにした。

(4) miR-145-3p の解析：microRNA では guide 鎖が遺伝子発現を制御し、相補的な配列である

(4) miR-145-3p の解析：microRNA では guide 鎖が遺伝子発現を制御し、相補的な配列である

passenger 鎖は関与しないとされていた。次世代シーケンサーを用いた解析を行い、passenger 鎖である miR-145-3p が去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) において発現が低下していることを初めて示した。miR-145-3p が標的とする 4 つの遺伝子を同定し、予後予測マーカーとしての可能性を明らかにした。(図 2)

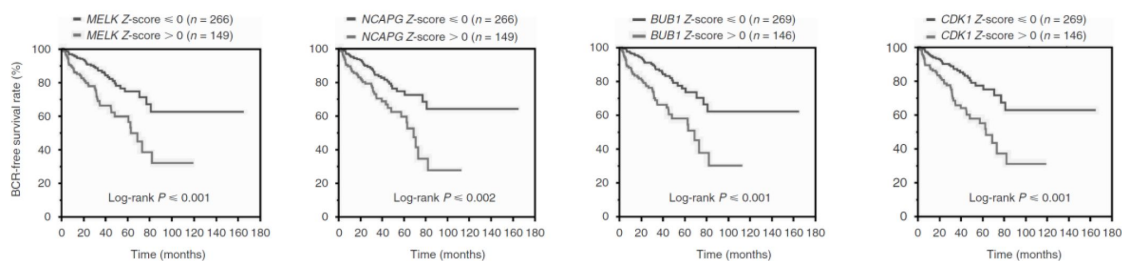


図 2 miR-145-3p が標的とする 4 つの遺伝子 (*MELK*, *NCAPG*, *BUB1*, *CDK1*) の発現と生化学的無再発生存期間

(5) miR-150-5p/3p の解析: ホルモン感受性前立腺癌 (HSPC) ならびに CRPC における miR-150-5p (guide 鎖) と miR-150-3p (passenger 鎖) について解析し、いずれもヒト前立腺癌細胞株の遊走能や浸潤能を抑制することを示した。標的遺伝子として *SPOCK1* を同定し、マイクロ RNA ネットワークに着目した新規治療開発の可能性について明らかにした。

(6) miR-205-5p の解析: 前立腺癌において miR-205-5p が制御する 37 個の候補遺伝子を同定した。The Cancer Genome Atlas database を用いて解析し、37 個のうち 7 個の遺伝子 (*HMGB3*, *SPARC*, *MKI67*, *CENPF*, *CDK1*, *RHOJ*, *POLR2D*) について、発現亢進が疾患特異的生存率の低下に関連していることを明らかにした。*HMGB3* 遺伝子についてさらに解析を進め、HSPC ならびに CRPC において発現が低下していることを明らかとした。これにより新たな治療標的を同定するための手法を確立した。

(7) miR-99a-3p の解析: Passenger 鎖である miR-99a-3p を発現させると、前立腺癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が有意に抑制された。また miR-99a-3p が標的とする分子として Non-SMC condensin I complex subunit G (*NCAPG*) を同定した。*NCAPG* は miR-99a-3p によって直接制御されており、CRPC の診断や治療標的に応用可能である事を明らかにした。

(8) miR-455-5p/3p の解析: miR-455-5p (passenger 鎖) ならびに miR-455-3p (guide 鎖) では、The Cancer Genome Atlas データベースを利用して、標的とする遺伝子の一つとして *PIR* (*pirin*) を同定した。*PIR* はホルモン感受性前立腺癌 (HSPC) ならびに CRPC の分子マーカーや治療標的になる可能性を示した。

(9) miR-199a/b-3p の解析: CRPC において、miR-199a/b-3p によって制御される癌遺伝子として non-SMC condensin I complex subunit H をコードする遺伝子を同定した。The Cancer Genome Atlas データベースを解析することにより、non-SMC condensin I complex subunit H の高発現は不良な無疾患生存率と有意に関連していることを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

Arai T, Kojima S, Yamada Y, Sugawara S, Kato M, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Micro-ribonucleic acid expression signature of metastatic castration-resistant prostate cancer: Regulation of *NCAPG* by antitumor miR-199a/b-3p. *Int J Urol*. 査読有. 2019 Apr;26(4):506-520. doi: 10.1111/iju.13911.

Arai T, Kojima S, Yamada Y, Sugawara S, Kato M, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. *Pirin*: a potential novel therapeutic target for castration-resistant prostate cancer regulated by miR-455-5p. *Mol Oncol*. 査読有. 2019 Feb;13(2):322-337. doi: 10.1002/1878-0261.12405.

Arai T, Okato A, Yamada Y, Sugawara S, Kurozumi A, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Regulation of *NCAPG* by miR-99a-3p (passenger strand) inhibits cancer cell

aggressiveness and is involved in CRPC. *Cancer Med.* 査読有. 2018 May;7(5):1988-2002. doi: 10.1002/cam4.1455.

Yamada Y, Nishikawa R, Kato M, Okato A, Arai T, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis. *J Hum Genet.* 査読有. 2018 Feb;63(2):195-205. doi: 10.1038/s10038-017-0371-1.

Goto Y, Kurozumi A, Arai T, Nohata N, Kojima S, Okato A, Kato M, Yamazaki K, Ishida Y, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Impact of novel miR-145-3p regulatory networks on survival in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer.* 査読有. 2017 Jul 25;117(3):409-420. doi: 10.1038/bjc.2017.191.

Okato A, Arai T, Kojima S, Koshizuka K, Osako Y, Idichi T, Kurozumi A, Goto Y, Kato M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Dual strands of pre-miR-150 (miR-150-5p and miR-150-3p) act as antitumor miRNAs targeting SPOCK1 in naïve and castration-resistant prostate cancer. *Int J Oncol.* 査読有. 2017 Jul;51(1):245-256. doi: 10.3892/ijo.2017.4008.

Kato M, Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Okato A, Nishikawa R, Fukumoto I, Koshizuka K, Ichikawa T, Seki N. Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer. *J Hum Genet.* 査読有. 2017 Jan;62(1):123-132. doi: 10.1038/jhg.2016.68.

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.* 査読有. 2016 Jul;49(1):111-22. doi: 10.3892/ijo.2016.3522.

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.* 査読有. 2016 May 10;114(10):1135-44. doi: 10.1038/bjc.2016.95.

〔学会発表〕(計 25 件)

Goto Y, Kojima S, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Sakamoto S, 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 (米国泌尿器科学会年次総会), 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/urology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：関 直彦
ローマ字氏名：(SEKI, Naohiko)
所属研究機関名：千葉大学
部局名：大学院医学研究院
職名：准教授
研究者番号(8桁): 50345013

研究分担者氏名：坂本 信一
ローマ字氏名：SAKAMOTO, Shinichi
所属研究機関名：千葉大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号(8桁): 70422235

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。