

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20125

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経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of extracellular matrix molecular pathway regulated by metastasis-suppressing microRNAs in prostate cancer.

研究代表者

加藤 繭子 (KATO, MAYUKO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80733857

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)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)を用いて作成したマイクロRNA発現プロファイルにおいて、miR-205-5pは正常前立腺組織と比較し、CRPC臨床検体において発現が抑制されており、癌抑制型マイクロRNAとして機能していた。miR-205-5pを制御する遺伝子としてHMGB3に着目した。前立腺癌細胞株において、HMGB3はmiR-205-5pによって直接制御されており、CRPC臨床検体において発現は上昇していた。

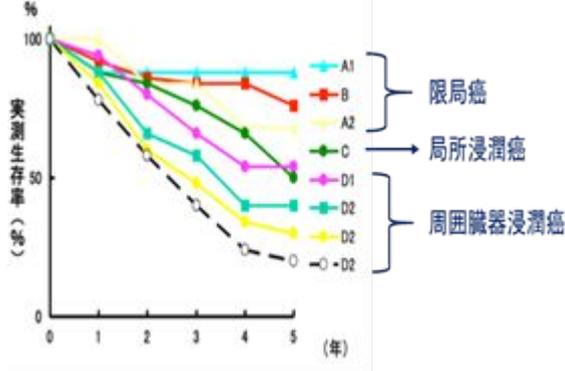
研究成果の概要(英文)：microRNA(miRNA) expression profile in castration-resistant prostate cancer (CRPC) revealed that miR-205-5p was reduced in CRPC tissues and that it acted as an antitumor miRNA. We focused on HMGB3 as a putative target of miR-205-5p regulation. HMGB3 was directly regulated by miR-205-5p in PCa cells and HMGB3 was overexpressed in CRPC clinical specimens.

研究分野：前立腺癌

キーワード：マイクロRNA 前立腺癌 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や高齢化に伴い我が国でも前立腺癌患者が急速に増加し、毎年1万人以上が前立腺癌で死亡している。



当初ホルモン遮断療法に感受性を持っていた前立腺癌は、やがて治療抵抗性を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へと変化する。CRPC 細胞はリンパ節や骨などの臓器に遠隔転移を来し、治療に難渋する。テストステロンの合成阻害薬、アンドロゲン受容体の阻害薬などの新規開発薬が使用可能となったが、CRPC に至った患者の予後は不良である。CRPC に至った前立腺癌細胞が、どのような分子経路を活性化して、増殖・転移を起こすのか明らかになっていない。CRPC 特異的な分子経路が明らかになれば、この経路を遮断する治療戦略が得られると考える。アンドロゲン非依存性に遠隔転移を来す癌細胞に対し、治療抵抗性や遠隔転移の分子メカニズムを解明することは、CRPC に対する治療法開発において画期的な進歩をもたらす。

2. 研究の目的

これまでに、前立腺癌臨床検体から、次世代シーケンサーを用いて、機能性 RNA (マイクロ RNA、タンパクコード遺伝子、タンパク非コード遺伝子) 発現プロファイルを作成した。19 塩基 ~ 22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子であるマイクロ RNA は、配列依存的に、数百 ~ 数千種の蛋白コード遺伝子の発現を制御する事が報告されている。1 種類のマイクロ RNA は、複数の遺伝子を制御する。また、1 種類の遺伝子は、複数のマイクロ RNA の制御を受ける。つまり、マイクロ RNA と癌関連遺伝子は相互に制御されており、非常に複雑な分子ネットワークを形成していると考えられる。前立腺癌においても、マイクロ RNA の解析は世界規模で行われており、前立腺癌における「癌促進型マイクロ RNA」「癌抑制型マイクロ RNA」の存在が明らかとなっている。マイクロ RNA を起点とした、CRPC 細胞内の分子ネットワークを探索することで、治療抵抗性に関与する新たな分子経路の探索を行うことが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌と、対照となる正常前立腺組織

を用いて、マイクロ RNA 発現プロファイルを作製した。癌部で発現が抑制されているマイクロ RNA、つまり癌抑制型マイクロ RNA の候補を抽出した。

(2) これらのマイクロ RNA を前立腺癌細胞株である PC-3、DU-145 に核酸導入し、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能について、抑制効果があるか、検討を行った。

(3) 前立腺癌臨床検体から RNA を抽出した。TaqMan プローベを用いたリアルタイム PCR を施行することで、マイクロ RNA の発現を調べた。

(4) 公共のデータベースを用いて、マイクロ RNA の標的遺伝子を抽出した。

(5) マイクロ RNA を核酸導入した前立腺癌細胞株で、発現が低下している遺伝子を抽出した。

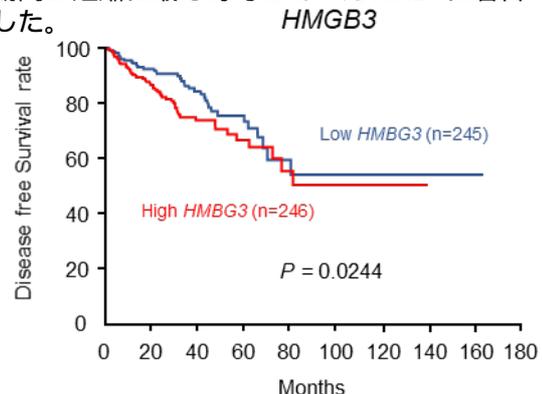
(6) 前立腺癌臨床検体を用いて免疫染色し、標的遺伝子の発現の程度を検討した。

(7) siRNA を用いて、標的遺伝子をロックアウトし、DNA マイクロアレイにより、遺伝子発現を解析した。

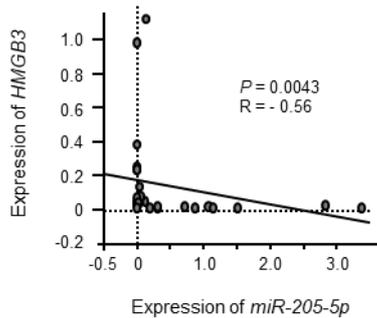
(8) ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、標的遺伝子が探索しているマイクロ RNA に直接結合するかどうかを検討した。

4. 研究成果

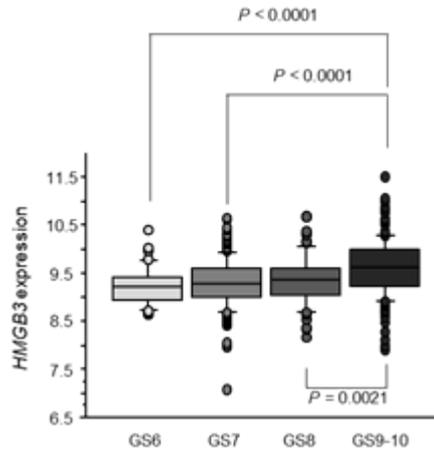
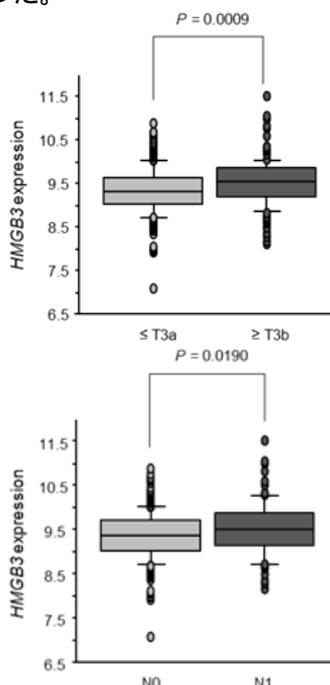
(1) ホルモン感受性前立腺癌において、*miR-205-5p* の発現が低下しており、前立腺癌細胞株に核酸導入した場合、遊走能、浸潤能が抑制されていた。この結果から、前立腺癌において *miR-205-5p* は癌抑制型マイクロ RNA として機能することはすでに報告している。この結果をもとに、公共のデータベースを用いて、新たな標的遺伝子を探索した。Target scan database を用いて、*miR-205-5p* の標的遺伝子を抽出した。次に *miR-205-5p* を前立腺癌細胞株 PC3 に核酸導入し、発現が低下した遺伝子を抽出した。これらの抽出した遺伝子のうち、GEO の遺伝子発現データにおいて、前立腺癌で発現が上昇している遺伝子は 37 遺伝子だった。無再発生存期間の短縮に寄与する遺伝子として、7 遺伝子 (*HMGB3*, *SPARC*, *MKI67*, *CENPF*, *CDK1*, *RHOA*, *POLR2D*) を抽出した。この中で、*miR-205-5p* を核酸導入した場合、発現が最も低下しており、無再発生存期間の短縮に最も寄与していた *HMGB3* に着目した。



RT-PCR を施行したところ、正常前立腺組織と比較した場合、前立腺癌で *HMBG3* の発現が上昇しており、*HMBG3* と *miR-205-5p* の発現には正の相関を認めた。



次に免疫染色を用いて、前立腺癌における *HMBG3* の発現を調べた。癌部では強く染色され、*HMBG3* の発現が上昇していることが示された。また、前立腺癌細胞株 PC3、DU145 に *miR-205-5p* を核酸導入すると、mRNA 発現、蛋白発現のいずれも低下していた。Target scan database によると、*HMBG3* の 3' -UTR 領域には、*miR-205-5p* の結合部位が 2 か所存在していることがわかっている。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、*HMBG3* の 3' -UTR 領域に *miR-205-5p* が直接結合して制御していることを確認した。siRNA を前立腺癌細胞株に核酸導入し、*HMBG3* をノックダウンした。前立腺癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能は著明に抑制された。TCGA データベースを用いて、前立腺癌の病期と *HMBG3* の発現レベルの関係を調べた。その結果、T stage、リンパ節転移の有無、Gleason score と *HMBG3* の発現レベルには関連性があることが分かった。



*miR-205-5p* は上皮細胞における上皮間葉転換において重要な役割を果たしていると考えられる。*miR-205-5p* は乳癌、肺癌、食道癌、前立腺癌など多くの癌腫で癌抑制型マイクロ RNA として機能することが報告されている。アンドロゲンレセプターを介したアンドロゲンシグナル経路は、前立腺癌の進行に重要な役割を果たしていると考えられている。アンドロゲンレセプターは直接 *miR-205-5p* により制御されており、*miR-205-5p* の発現が高いほど転移が生じやすいこと、また全生存率が短縮することが示されている。これらの報告から、*miR-205-5p* の発現低下は前立腺癌や CRPC の発生に関与していると考えられ、新規分子経路を探索することは前立腺癌治療に対する新たなアプローチを提供するであろう。

*HMBG3* は HMGBfamily の一つであり、乳癌、胃癌、膀胱癌、食道癌など多くの癌腫で発現が上昇しており、発現が高いほど予後が悪いことが報告されている。我々の研究でも同様に、前立腺癌あるいは CRPC で *HMBG3* の発現が上昇しており、発現が高いほど無再発生存期間が短いことが示されている。以上から、*HMBG3* は前立腺癌あるいはほかの癌腫においても予後を示す有用なバイオマーカーとな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 10 件)

(1) 著者名: Yamada Y, Nishikawa R, Kato M, Okato A, Arai T, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

論文標題: Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis

雑誌名: Journal of Human Genetics

査読有、巻 63 発行年 2018 年 最初と最後の頁 195-205

DOI: 10.1038/s10038-017-0371-1.

(2)著者名 : Okato A, Arai T, Yamada Y, Sugawara S, Koshizuka K, Fujimura L, Kurozumi A, Kato M, Kojima S, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Dual Strands of Pre-miR-149 Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting FOXM1 in Renal Cell Carcinoma.

雑誌名 : International journal of molecular sciences

査読有、巻 18 発行年 2017 年 最初と最後の頁 E1969

DOI : 10.3390/ijms18091969.

(3)著者名 : Arai T, Okato A, Kojima S, Idichi T, Koshizuka K, Kurozumi A, Kato M, Yamazaki K, Ishida Y, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Regulation of spindle and kinetochore-associated protein 1 by antitumor miR-10a-5p in renal cell carcinoma.

雑誌名 : Cancer science

査読有、巻 108 発行年 2017 年 最初と最後の頁 2088-2101

DOI : 10.1111/cas.13331.

(4)著者名 : Goto Y, Kurozumi A, Arai T, Nohata N, Kojima S, Okato A, Kato M, Yamazaki K, Ishida Y, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Impact of novel miR-145-3p regulatory networks on survival in patients with castration-resistant prostate cancer.

雑誌名 : British journal of cancer

査読有、巻 117 発行年 2017 年 最初と最後の頁 409-420

DOI : 10.1038/bjc.2017.191.

(5)著者名 : Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Kurozumi A, Kato M, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

論文標題 : Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer.

雑誌名 : Cancer science

査読有、巻 108 発行年 2017 年 最初と最後の頁 1681-1692

DOI : 10.1111/cas.13298.

(6)著者名 : Okato A, Arai T, Kojima S, Koshizuka K, Osako Y, Idichi T, Kurozumi A, Goto Y, Kato M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Dual strands of pre-miR-150 (miR-150-5p and miR-150-3p) act as antitumor miRNAs targeting SPOCK1 in naive

and castration-resistant prostate cancer.  
雑誌名 : International journal of oncology  
査読有、巻 51 発行年 2017 年 最初と最後の頁 245-256

DOI : 10.3892/ijo.2017.4008.

(7)著者名 : Kato M, Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Okato A, Nishikawa R, Fukumoto I, Koshizuka K, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer.

雑誌名 : Journal of Human Genetics

査読有、巻 62 発行年 2017 年 最初と最後の頁 123-132

DOI : 10.1038/jhg.2016.68.

(8)著者名 : Fukumoto I, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Matsushita R, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Okamoto Y, Seki N.

論文標題 : The tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster regulates the MET oncogene in oral squamous cell carcinoma.

雑誌名 : International journal of oncology  
査読有、巻 49 発行年 2016 年 最初と最後の頁 1119-1129

DOI : 10.3892/ijo.2016.3602.

(9)著者名 : Okato A, Goto Y, Kurozumi A, Kato M, Kojima S, Matsushita R, Yonemori M, Miyamoto K, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Direct regulation of LAMP1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer.

雑誌名 : International journal of oncology  
査読有、巻 49 発行年 2016 年 最初と最後の頁 111-122

DOI : 10.3892/ijo.2016.3522.

(10)著者名 : Goto Y, Kojima S, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Matsushita R, Ichikawa T, Seki N.

論文標題 : Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer.

雑誌名 : British journal of cancer  
査読有、巻 114 発行年 2016 年 最初と最後の頁 1135-1144

DOI : 10.1038/bjc.2016.95.

〔学会発表〕(計1件)

発表者 : Mayuko Kato

発表標題 : Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) are involved in castration-resistant

prostate cancer pathogenesis  
学会名：American Association for Cancer  
Research  
発表年月日：2017年4月3日  
発表場所：Washington, D.C., USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 繭子 (KATO MAYUKO)  
千葉大学, 医学部附属病院, 助教  
研究者番号：80733857

### (3) 連携研究者

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  
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  
小島 聡子 (KOJIMA SATOKO)  
帝京大学, 医学部, 准教授  
研究者番号：10345019  
岡東 篤 (OKATO ATSUSHI)  
千葉大学, 医学部附属病院, 医員  
研究者番号：90756719  
新井 隆之 (ARAI TAKAYUKI)  
千葉大学, 医学部附属病院, 医員  
研究者番号：40793055  
越塚 慶一 (KOSHIZUKA KEIICHI)  
千葉大学, 医学部附属病院, 医員  
研究者番号：00791609  
山田 康隆 (YAMADA YASUTAKA)  
千葉大学, 医学部附属病院, 医員  
研究者番号：30814595  
菅原 翔 (SUGAWARA SYO)  
千葉大学, 医学部附属病院, 医員  
研究者番号：70815290