

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16724

研究課題名(和文) 機能性RNA発現解析に基づく去勢抵抗性前立腺癌・治療抵抗性に関わる分子経路の探索

研究課題名(英文) Search for molecular pathways related to castration-resistant prostate cancer and therapeutic resistance based on functional RNA expression analysis

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：転移性去勢抵抗性前立腺癌剖検標本を基にマイクロRNA発現プロファイルを作成した。前立腺癌細胞株にmiR-199a/b-3pを核酸導入すると、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が抑制された。NCAPH (condensin I complex subunit H)の発現上昇は、miR-199a/b-3pによって直接制御されていた。公共のデータベース分析では、NCAPHの発現上昇は、無病生存期間の短縮と有意に関連していた。NCAPHは、ホルモン感受性前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌標本で発現上昇しており、NCAPHをノックダウンすると、遊走能および浸潤能が著明に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移を生じた薬剤耐性腫瘍細胞に対する新しい治療法の開発は非常に重要である。今回、エンザルタミド、アピラテロン、カバジタキセル治療後の剖検検体を使用して、転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)マイクロRNA発現プロファイルを作成した。アンドロゲン非依存性となった前立腺癌細胞において、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に対する新たな診断マーカーや治療戦略の開発において画期的な進歩をもたらす。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA expression profiles were prepared based on autopsy specimens of metastatic castration-resistant prostate cancer. When miR-199a/b-3p was introduced into a prostate cancer cell line, its ability to proliferate, migrate, and invade was inhibited. The increased expression of NCAPH (condensin I complex subunit H) was directly regulated by miR-199a/b-3p. In a public database analysis, elevated NCAPH expression was significantly associated with shorter disease-free survival. NCAPH is upregulated in hormone-sensitive and castration-resistant prostate cancer specimens, and knockdown of NCAPH significantly inhibited migration and invasion.

研究分野：前立腺癌

キーワード：マイクロRNA 去勢抵抗性前立腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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

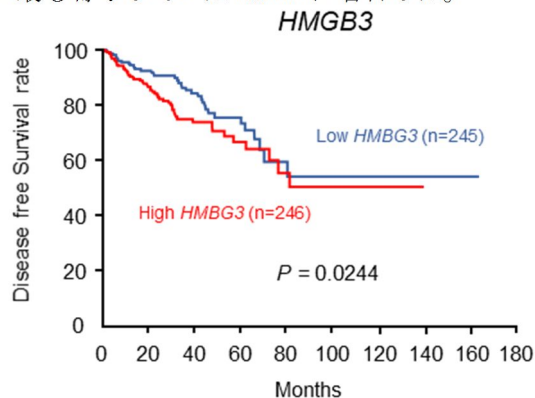
これまでに、前立腺癌臨床検体から、次世代シーケンサーを用いて、機能性 RNA (マイクロ RNA、タンパクコード遺伝子、タンパク非コード遺伝子) 発現プロファイルを作成した。19 塩基~22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子であるマイクロ RNA は、配列依存的に、数百~数千種のタンパクコード遺伝子の発現を制御する事が報告されている。1 種類のマイクロ RNA は、複数の遺伝子を制御する。また、1 種類の遺伝子は、複数のマイクロ RNA の制御を受ける。つまり、マイクロ RNA と癌関連遺伝子は相互に制御されており、非常に複雑な分子ネットワークを形成していると考えられる。前立腺癌においても、マイクロ 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

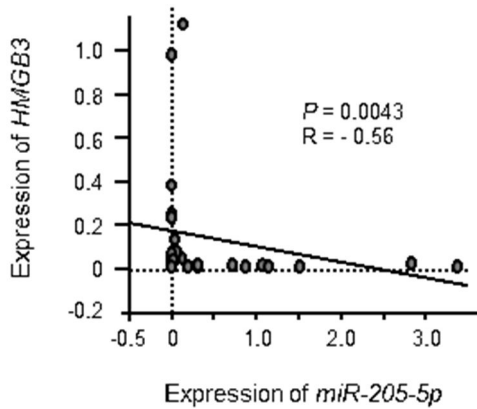
- (1)前立腺癌と、対照となる正常前立腺組織を用いて、マイクロ RNA 発現プロファイルを作製した。癌部で発現が抑制されているマイクロ RNA、つまり癌抑制型マイクロ RNA の候補を抽出した。
- (2)これらのマイクロ RNA を前立腺癌細胞株である PC-3、DU-145 に核酸導入し、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能について、抑制効果があるか、検討を行った。
- (3)前立腺癌臨床検体から RNA を抽出した。TaqMan プローベを用いたリアルタイム PCR を施行することで、マイクロ RNA の発現を調べた。
- (4)公共のデータベースを用いて、マイクロ RNA の標的遺伝子を抽出した。
- (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、標的遺伝子をノックアウトし、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

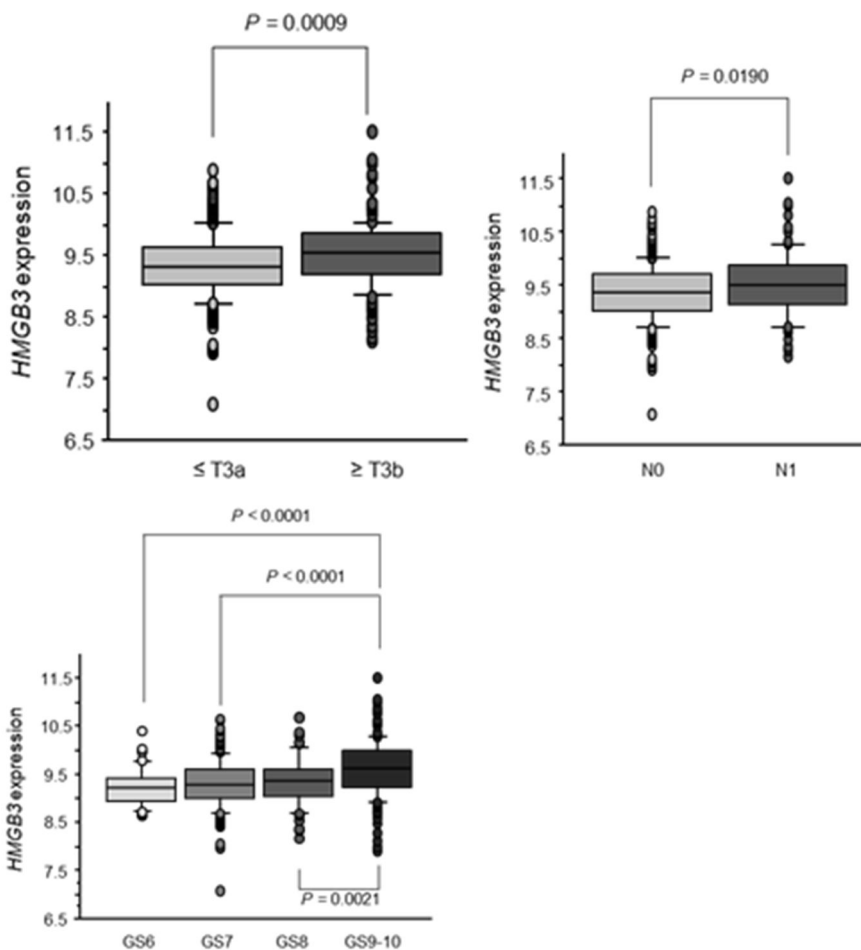
(1)ホルモン感受性前立腺癌において、*miR-205-5p* の発現が低下しており、前立腺癌細胞株に核酸導入した場合、遊走能、浸潤能が抑制されていた。この結果から、前立腺癌において *miR-205-5p* は癌抑制型マイクロ RNA として機能することはすでに報告している。この結果をもとに、公共のデータベースを用いて、新たな標的遺伝子を探索した。Target scan database を用いて、*miR-205-5p* の標的遺伝子を抽出した。次に *miR-205-5p* を前立腺癌細胞株 PC3 に核酸導入し、発現が低下した遺伝子を抽出した。これらの抽出した遺伝子のうち、GEO の遺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*, *MK167*, *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。

HMGB3 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 *HMGB3* 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、*HMGB3* は前立腺癌あるいはほかの癌腫においても予後を規定する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

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yamada Y, Nohata N, Uchida A, Kato M, Arai T, Moriya S, Mizuno K, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Replisome genes regulation by antitumor miR-101-5p in clear cell renal cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14327.	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 -
1. 著者名 Yamada Y, Kato M, Arai T, Sanada H, Uchida A, Misono S, Sakamoto S, Komiya A, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Aberrantly expressed PLOD1 promotes cancer aggressiveness in bladder cancer: a potential prognostic marker and therapeutic target.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Oncol.	6. 最初と最後の頁 1898-1912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12532.	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 -
1. 著者名 Arai T, Kojima S, Yamada Y, Sugawara S, Kato M, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Pirin: a potential novel therapeutic target for castration-resistant prostate cancer regulated by miR-455-5p.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular oncology	6. 最初と最後の頁 322-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12405.	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 -
1. 著者名 Arai T, Kojima S, Yamada Y, Sugawara S, Kato M, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 26
2. 論文標題 Micro-ribonucleic acid expression signature of metastatic castration-resistant prostate cancer: Regulation of NCAH by antitumor miR-199a/b-3p.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of urology	6. 最初と最後の頁 506-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.13911.	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 -

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kato M, Kojima S, Sakamoto S, Komiya A, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of pre-miR-532 (miR-532-5p and miR-532-3p) in regulation of gene expression and molecular pathogenesis in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American journal of clinical experimental urology	6. 最初と最後の頁 11-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12405.	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 -

1. 著者名 Yamada Y, Sugawara S, Arai T, Kojima S, Kato M, Okato A, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of renal cell carcinoma: Impact of the anti-tumor miR-29 family on gene regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of Urology	6. 最初と最後の頁 953-965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13783.	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 -

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kojima S, Sugawara S, Kato M, Okato A, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 109
2. 論文標題 Regulation of antitumor miR-144-5p targets oncogenes: Direct regulation of syndecan-3 and its clinical significance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 2919-2936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13722.	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 -

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kojima S, Sugawara S, Kato M, Okato A, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-tumor roles of both strands of the miR-455 duplex: their targets SKA1 and SKA3 are involved in the pathogenesis of renal cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 26638-26658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25410.	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 -

1. 著者名 Sugawara S, Yamada Y, Arai T, Okato A, Idichi T, Kato M, Koshizuka K, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 63
2. 論文標題 Dual strands of the miR-223 duplex (miR-223-5p and miR-223-3p) inhibit cancer cell aggressiveness: targeted genes are involved in bladder cancer pathogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 657-668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0437-8.	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 -

1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Sugawara S, Okato A, Kato M, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 109
2. 論文標題 Impact of novel oncogenic pathways regulated by antitumor miR-451a in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1239-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13526.	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
研究協力者	市川 智彦 (ICHIKAWA TOMOHIKO) (20241953)	千葉大学・泌尿器科学・教授 (12501)	
研究協力者	関 直彦 (SEKI NAOHIKO) (50345013)	千葉大学・機能ゲノム学・准教授 (12501)	
研究協力者	小島 聡子 (KOJIMA SATOKO) (10345019)	帝京大学・泌尿器科・准教授 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	新井 隆之 (ARAI TAKAYUKI) (40793055)	千葉大学・泌尿器科・医員 (12501)	
研究協力者	山田 康隆 (YAMADA YASUTAKA) (30814595)	千葉大学・泌尿器科・医員 (12501)	