

平成21年4月1日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791126  
 研究課題名 (和文) 前立腺癌における機能性 RNA の標的遺伝子の解析  
 研究課題名 (英文) miR-15a/16-1 functions as a tumor suppressor for prostate cancer by targeting multiple oncogenes  
 研究代表者  
 小島 聡子 (KOJIM SATOKO)  
 帝京大学・医学部・准教授  
 研究者番号：10345019

## 研究成果の概要：

microRNA15a/16-1 はヒト前立腺癌および、前立腺癌細胞株において発現が低下している。その機序として、BCL2 を介した細胞死の増加と細胞増殖の抑制を認めた。ホルモン抵抗性前立腺癌においてもアポトーシスの亢進が認められ、microRNA がホルモン抵抗性前立腺癌の治療に有用である可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

## 研究分野：医学

科研費の分科・細目：泌尿器科

キーワード：前立腺癌、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

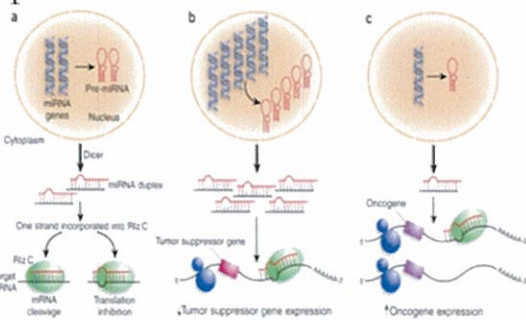
前立腺癌は欧米諸国の男性の癌のうち最も発生率が高く、死亡率も20%と肺癌に次いで頻度が多い。近年、前立腺癌による死亡率は日本において増加の一途をたどっており、死亡数は2020年には2000年の2.8倍になると予測されており、これは男性すべての癌の中で最高の増加率である。わが国においても食事の欧米化および高齢化社会に伴い、その頻

度は増加傾向にあり、泌尿器科領域においては前立腺癌が最も多い悪性腫瘍である。早期癌は手術療法、放射線療法により良好な予後を得られるが、進行性前立腺癌は主にホルモン療法によって治療される。前立腺癌は一般にアンドロゲン依存性増殖を示し、アンドロゲンを遮断すると癌細胞が死滅するが、次第にアンドロゲン非依存性癌へ進展し治療に抵抗性となり、不良な予後をたどることが知

られている 前立腺癌の進展の機序として、アンドロゲンレセプターのリガンド非依存的な活性化、増殖因子や癌遺伝子の活性化、アポトーシス抑制因子 (BCL-2 など) の過剰発現、そして癌抑制遺伝子の失活などがあげられる。前立腺癌の進展に関わる因子をゲノムワイドに解析するために、研究代表者はバンクーバーの British Columbia 大学 The Prostate Centre の Martin E. Gleave 教授のもとに留学し、前立腺癌細胞株を用いてアンドロゲン除去に伴う応答遺伝子を網羅的な遺伝子解析技術を用いて解析し、Insulin like growth factor binding protein-3 や Heat shock protein-27 がアンドロゲン非依存性癌の進展に関与することを明らかとした。このように現在のゲノム医学の進展を受け、前立腺癌の理解にはゲノム全体を見据えた解析が必須である。

近年、蛋白質をコードしない non-coding RNA が発見され機能性 RNA として注目されている。その中で miRNA と呼ばれる 19-23 塩基の短い二本鎖 RNA は標的となる蛋白コード遺伝子の coding region もしくは 3'-UTR をブロックして蛋白合成を妨げる働きをされると考えられている (図 1)。

図 1



特に、癌の領域では miRNA が癌抑制遺伝子の発現調節に深く関与しており、癌の発生や進展に関わっていることが報告されている。miR-15a, miR-16 遺伝子は 13q14.3 に存在し、標的遺伝子 BCL-2 の発現を抑制することが知

られている。B 細胞白血病などでは miR-15a, miR-16 の発現が低下し、その結果、BCL-2 の発現が亢進することが報告されている。

前立腺癌においても発癌および癌の進展に関わる miR が存在することが予測される。まず、前立腺癌における miR-15a, miR-16 を同定したところ、発現が低下していたことからこれらの miR が前立腺癌の増殖や細胞死に関わっている可能性を考え、前立腺癌の臨床検体および前立腺癌細胞株を用いて実験を行った。

## 2. 研究の目的

前立腺癌における miR-15a, miR-16 の役割を明らかにする目的で、進行前立腺癌および正常前立腺における miR-15a/16-1 の発現を比較検討した。その発現が低下していることを確認したうえで miR-15a/16-1 を前立腺癌細胞株に核酸導入し、miR-15a/16-1 が前立腺癌の細胞増殖、浸潤能、細胞死において果たす機能について検討することを目的とした。さらに、miR-15a/16-1 を前立腺癌に導入した際に変化する遺伝子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

今回我々は、miR-15a/16-1 の前立腺における発現を知るために、前立腺生検の標本および前立腺癌細胞株における miR-15a/16-1 の発現量を RT-PCR にて同定し、正常前立腺組織および細胞と比較した。実際の前立腺癌の臨床検体として、進行前立腺癌で前立腺生検にて組織のすべてに腫瘍細胞を認める献体から得られたヒト前立腺癌組織 (n=8) と前立腺生検で悪性所見を認めなかった正常前立腺組織 (n=8) を用いた。前立腺細胞株 (LNCaP, C4-2, PC3, DU145) における miR-15a/16-1 の発現も同様に RT-PCR にて同

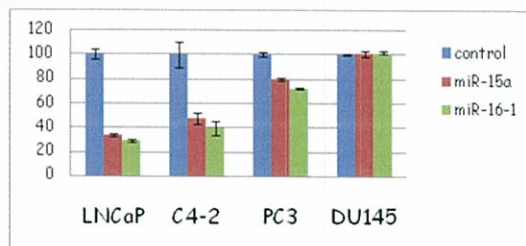


定し、正常前立腺組織と比較した。次に、ホルモン感受性 (LNCaP) および非感受性前立腺癌細胞株 (C4-2, PC3, DU145) に miR-15a/16-1 にリポフェクタミンを用いて transient に核酸導入し、細胞の増殖を XTT assay にて、アポトーシス反応および細胞周期を Flow cytometry にて、浸潤能を Wound healing assay にて検討した。また、miR-15a/16-1 をこれらの前立腺癌細胞株に核酸導入した場合に発現が変化する遺伝子を RT-PCR で検討した。なお、コントロールとして、ランダムな配列である塩基配列を用いた。

#### 4. 研究成果

臨床検体として用いた進行前立腺癌 (n=8) の平均 PSA 値は 319 ng/ml, 正常前立腺群 (n=8) では 6.9ng/ml であった。平均年齢は進行前立腺癌の群で 75 才、正常前立腺群では 69 才であった。miR-15a/16-1 の発現を RT-PCR にて同定したところ、進行前立腺癌における miR-15a/16-1 の発現は、正常前立腺と比較して有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。前立腺癌細胞株においても、正常コントロールと比較して miR-15a/16-1 の発現が低下していた。miR-15a/16-1 を核酸導入すると LNCaP, C4-2 では細胞増殖が抑制されたが PC3, DU145 では変化しなかった (図 2)。

図 2

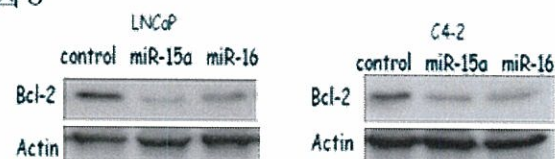


miR-15a/16-1 を核酸導入すると LNCaP, C4-2 細胞ではアポトーシスが亢進したが、PC3, DU-145 細胞では cell cycle にて sub-G0/1 分

画の多少の増加は認めるものの、明かなアポトーシスの亢進は認めなかった。miR-15a/16-1 の核酸導入によって細胞増殖が変化しなかった PC3 および DU145 細胞において Wound healing assay を行ったところ、PC3 細胞において細胞浸潤能が低下することがわかった。さらに miR-15a/16-1 の核酸導入後、細胞周期を flow cytometry によって検討すると、miR-15a/16-1 の核酸導入によりすべての細胞株 (LNCaP, C4-2, PC3, DU145) において、細胞周期の停止 (G1 arrest) を認め、細胞増殖に影響を与えることが示唆された。

miR-15a/16-1 の配列から予測される標的遺伝子として Bcl-2, Cyclin D1, FGR1, VEGFA MYB などが挙げられる。Western blot において Bcl2 の発現は LNCaP および C4-2 細胞にて低下したが、PC3, DU145 では変化しなかった (図 3)。

図 3



RT-PCR において、Cyclin D1, FGR1 の発現はすべての細胞株 (LNCaP, C4-2, PC3, DU145) で低下したが VEGFA の発現量には差を認めなかった。MYB の発現量は LNCaP, C4-2 細胞においては低下したが、PC3, DU145 細胞では発現の変化を認めず、これらの差がホルモン非依存性癌の原因になることが示唆された。

以上の結果より、miR-15a/16-1 単独では抗腫瘍効果が低いものの、miR-15a/16-1 が前立腺癌の治療として有効である可能性が示唆された。しかし、一部のホルモン非依存性癌では細胞死の誘導が弱く、今後、ホルモン非依存性の前立腺癌の抗腫瘍効果を示す miRNA を同定することが重要と考えられた。

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 2 件)

- ①  Satoko Kojima: Implications of IGF-I for prostate cancer therapies. International Journal of Urology, vol 16: 161-167, 2009
- ②  小島聡子 内分泌療法の長期的な問題点 Urology View Vol. 7. No. 2 p109-113, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ①  小島聡子 miR-15a/16-1 cluster controls prostate cancer proliferation by targeting Bcl2 activities. 日本癌学会 2008年10月31日名古屋
- ②  小島聡子 前立腺癌における miR-15a の発現と機能解析泌尿器分子細胞研究会 2009年2月14日鹿児島
- ③  小島聡子 miR-15a functions as a tumor suppressor for prostate cancer by targeting multiple oncogenes ヨーロッパ泌尿器科学会 2009年3月17日-22日、ストックホルム、スイス

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 聡子 (KOJIMA SATOKO)  
帝京大学・医学部・准教授  
研究者番号：10345019

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし