

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09716

研究課題名(和文) 前立腺癌におけるアンドロゲン非依存性増殖の新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms of castration resistant prostate cancer progression

研究代表者

石黒 由香利 (Ishiguro, Yukari)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・特任助教

研究者番号：00423830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はmicroRNA (miRNA)の発現調節機能に着目し、新規分子標的治療法やバイオマーカーの確立を目指して、前立腺癌における機能性miRNAの探索と、それらによる癌の進展機序の解明を行ってきた。本研究では、去勢抵抗性前立腺癌(Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC)におけるmiRNAの機能に着目し、前立腺癌がアンドロゲン非依存性増殖となる過程においてmiRNAがどのように作用しているかの検討を行った。その結果、前立腺癌の増殖・進展にはmiR-30dが関与しており、予後予測因子としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AR signalが再燃癌の病態発生に深く関与していることから、これまでのCRPCにおけるmiRNA解析はARの発現を調節するmiRNAの同定が主流であった。しかし、ARの発現量の調節は様々な蛋白質との相互作用によるため、本研究では、ARを直接的に制御するmiRNAの同定だけでなく、miRNAによるCRPC進展の分子メカニズムの解明を試みた。miRNAの発現とCRPC進展機能との関連は不明なため、miRNAの機能を検討することにより、CRPCへの進展及び前立腺癌細胞がアンドロゲン枯渇下で生存するために必要な分子メカニズムが明らかになり、CRPC特異的な分子標的治療薬の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Some miRNAs are thought to act as oncogenes or tumor suppressor genes.

Recent findings have shown that the expression patterns of miRNA are often altered in PCa and that miRNAs contribute to the progression of PCa by accelerating androgen-independent growth, migration, invasion, cell cycle arrest, and apoptosis.

In this study, we focus on the function of miRNA in Castration Resistant Prostate Cancer (CRPC) and investigate how miRNA acts in the process of prostate cancer becoming androgen-independent growth.

As a result, our findings strongly suggest that miR-30d is a novel and independent prognostic marker for PCa progression.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：前立腺癌 miRNA 去勢抵抗性前立腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、高齢男性で特に発症頻度が高い癌の一つで、罹患、死亡率は急激に増加しており、2020年には肺癌に次ぐ罹患率になることが予測されている。米国では男性の癌の第一位を占め、日本でも高齢化社会における男性の健康管理上大きな問題となると考えられる。

前立腺癌の80-90%はアンドロゲン依存性増殖を示すため、進行癌ではアンドロゲン除去療法を中心としたホルモン療法が最も有効な治療法の1つである。しかし、多くの前立腺癌ではホルモン療法後の数年でアンドロゲン非依存性増殖を示すようになり、ホルモン療法に反応しなくなる。こうした状態は“去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer ; CRPC)”と定義され、有効な治療法が限られているうえその治療法も長く奏効しないため、臨床的に最も憂慮すべき問題点である。

アンドロゲン非依存性になったほとんどの癌細胞は、リガンドとなるアンドロゲンがないにも拘わらず、アンドロゲン受容体 (AR) signal pathway に依存した増殖を続ける。アンドロゲン枯渇状態で AR signal が増強するメカニズムとしては、AR 遺伝子の増幅、AR 遺伝子の突然変異、AR 補助因子のバランスの変化、ステロイド産生前駆物質の増加などが知られている。また AR signal は、他の signal pathway とリンクしながら癌細胞の増殖に関わっていることから、CRPC の制御には AR signal とそれに関連した pathway を抑制する治療法の確立が必要である。

近年、non-coding RNA の1つである microRNA (miRNA) が、標的 mRNA の3' 非翻訳領域上の相補的配列に結合して標的 mRNA の発現を調節するなどの重要な機能を持つことが明らかになっている。我々はこの miRNA の機能に注目し、新たな分子標的治療法およびバイオマーカーの確立を目指して、前立腺癌における機能性 miRNA の探索と、それらによる癌の進展機序を解明してきた。その結果、前立腺癌の増殖、進展に miR-30d が深く関わっており、前立腺癌再発の予後予測因子として有用であるとともに、今後の分子標的治療の候補となり得るという知見を得た (Ito Y, Ishiguro H, Kobayashi N, Hasumi H, Watanabe M, Yao M, Uemura H. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*. 2015 Jul 1;75(10):1009-19.)。

さらに、CRPC における miRNA の機能に着目し、CRPC モデル細胞株 (LNCaP-AI) を用いた miRNA の網羅的な発現解析を行っている。LNCaP-AI は当研究室が樹立した細胞株で、臨床検体における CRPC と同様、AR の高発現と AR signal の活性化を確認しており、親株であるアンドロゲン依存性増殖をする LNCaP と比べ極めて高い増殖能など、CRPC モデル細胞株として非常に優れた特徴を有している。この LNCaP-AI を用いた miRNA の発現解析の結果、特異的に発現が増加している複数の miRNA を同定している。

そこで本研究では、これらの miRNA が前立腺癌がアンドロゲン非依存性増殖へと進行する過程においてどのように機能しているか詳細に検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記で発現異常を示した miRNAs の解析を通して、CRPC への進展を引き起こす機能性 miRNAs を同定し、それらが AR signal pathway に及ぼす役割を明らかにするとともに、前立腺癌細胞がアンドロゲン枯渇下で生存するために必要な新たな分子メカニズムを検討する。また、臨床検体における miRNAs の異常発現の臨床病理学的意義を明らかにし、今後の分子標的治療開発にむけ標的分子としての可能性を検討する。

これまでの CRPC における miRNA 解析は、AR signal が再燃癌の病態発生に深く関わっていることに基づき、AR の発現調節に関わる miRNA の同定が主流であった。しかし、AR の発現量の調節は様々な補調節因子蛋白質との相互作用によるため、AR を直接的に制御する miRNA を同定しただけでは、CRPC 進展の分子メカニズム解明には不十分と応募者は考えている。また、ホルモン療法や抗癌剤、放射線治療など様々なストレスがかかることによる細胞周期やアポトーシス関連分子の発現も CRPC への進展に大きく関わっていると考えられている。本研究では、LNCaP-AI を用いた miRNA の網羅的解析を行うとともに、プロテオーム解析による標的分子の網羅的解析を行うことで、miRNA を中心とした詳細な CRPC 進展の分子メカニズム解明を試みる。現在、我々が同定している miRNA の発現異常と CRPC 進展機能との関連は不明であるため、同定した miRNA の機能を詳細に検討することによって、CRPC への進展および前立腺癌細胞がアンドロゲン枯渇下で生存するために必要な分子メカニズムが明らかになり、CRPC 特異的な分子標的治療薬の開発につながると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 1. アンドロゲン除去下における機能性miRNAの同定

CRPCの進展を引き起こす機能性miRNAの分子メカニズムを解明するため、前立腺癌細胞株であるLNCaPをアンドロゲン除去環境下において培養しLNCaP-Androgen independent (AI)細胞株を樹立する。樹立されたLNCaP-AIを培養し、継続的にたんぱく質およびRNAを抽出する。抽出したRNAからcDNAを合成し、miR-30dの発現量を検討する。また、ウェスタンブロットングによってタンパクの発現量を検討する。

#### 2. 機能性miRNAの標的分子同定とCRPC進展における分子メカニズムの同定

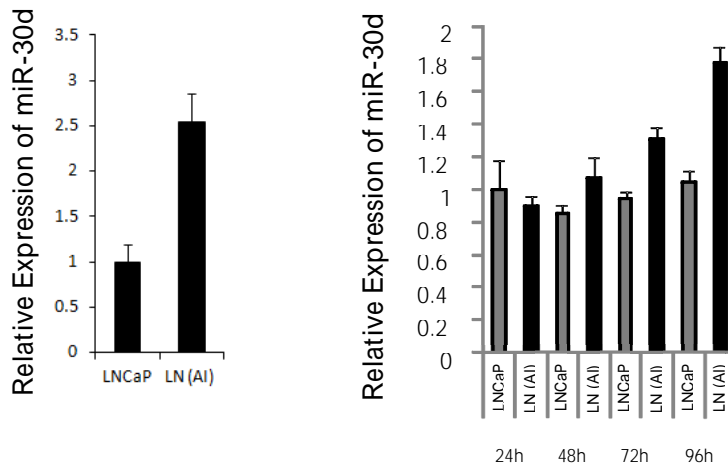
機能性 miRNAs が CRPC の進展を引き起こすメカニズムを解明するため、LNCaP 細胞株に miRNAs の Inhibitor および Mimic を遺伝子導入し、アンドロゲン除去下における細胞増殖に関わることを確認する。

### 4. 研究成果

#### 1. アンドロゲン除去下における機能性miRNAの同定

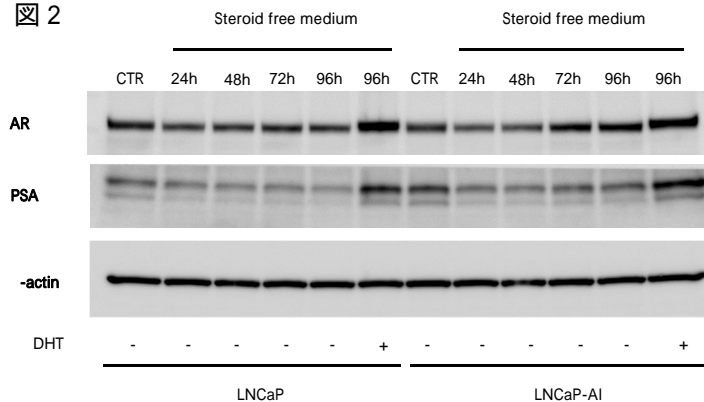
前立腺癌細胞株であるLNCaPをアンドロゲン除去環境下において培養しLNCaP-Androgen independent (AI)細胞株を樹立し、継続的にたんぱく質およびRNAを抽出した。RNAからcDNAを合成し、我々がこれまでに同定したmiR-30dの発現量を検討した。その結果、正常血清含有環境下で培養した細胞株に比べ、アンドロゲン除去環境下におけるmiRNAの発現量が亢進し、その発現量は継続的に増加していることが判明した(図1)。正常に培養したLNCaPにおいては継続的な発現量の増加がみられなかったことから、前立腺癌の増殖および進展にはこれらのmiRNAが関与しており、予後予測因子としての可能性が示唆された。

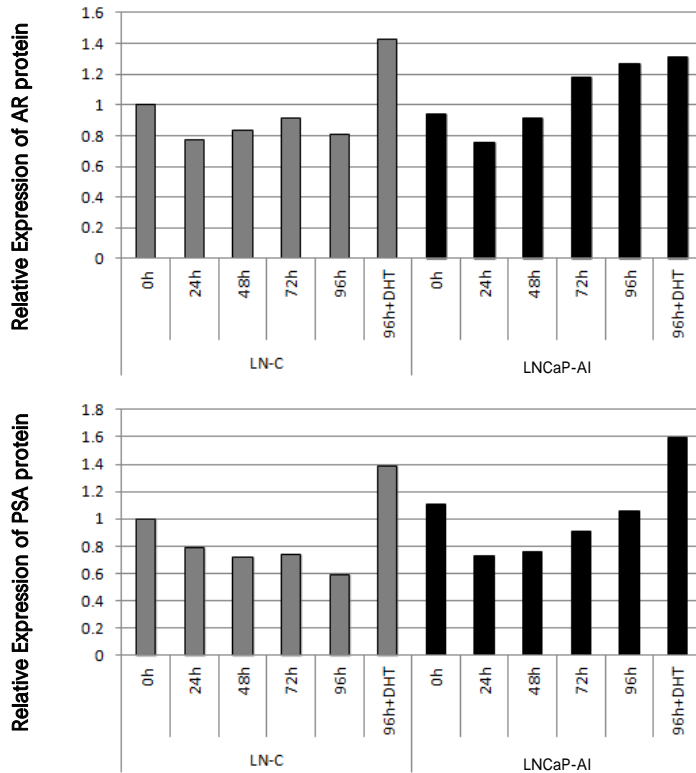
図1



また、抽出したたんぱく質を用いてウェスタンブロットング法にて発現量を検討したところ、正常血清含有環境下で培養した細胞株に比べ、アンドロゲン除去環境下におけるARおよびPSAの発現が亢進していた(図2)。

図2

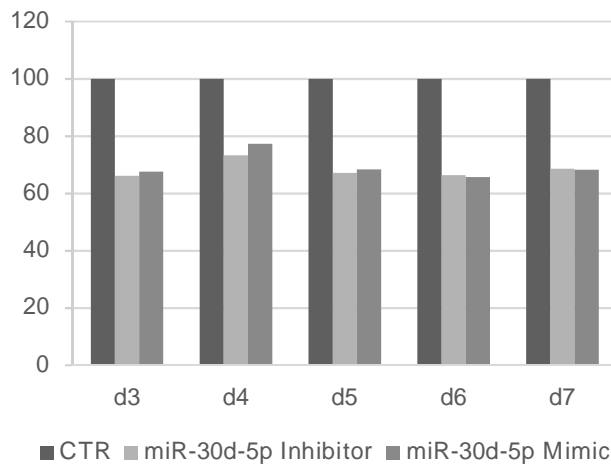




## 2. 機能性miRNAの標的分子同定とCRPC進展における分子メカニズムの同定

機能性 miRNAs が CRPC の進展を引き起こすメカニズムを解明するため、LNCaP 細胞株に miR-30d の Inhibitor もしくは Mimic を遺伝子導入し、アンドロゲン除去下における増殖能を MTT assay にて検討したところ、miR-30d の発現を抑制した細胞では増殖能が有意に抑制された。

図 3



以上の結果から、前立腺癌の増殖・進展には miR-30d が関与しており、予後予測因子としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	石黒 斉  (Ishiguro Hitoshi)  (00381666)	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・光触媒グループ・研究員(任期無)   (82718)	
研究分担者	上村 博司  (Uemura Hiroji)  (50244439)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授   (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関