

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791117

研究課題名(和文) バイオインフォマティクスを活用した前立腺癌進展における miRNA の発現と機能解析

研究課題名(英文) Analysis of miRNA expression and function in prostate cancer cells using bioinformatics

研究代表者

石黒 斉 (ISHIGURO HITOSHI)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：00381666

研究成果の概要(和文)：マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる機能性 RNA が各種癌の進展に重要と考えられているが、癌の進展における役割についての多くは不明である。本研究では、前立腺癌における miRNA の発現とその機能について検討をおこなった。miRNA データベースと前立腺癌細胞でのゲノムの増幅及び欠失部位から、前立腺癌の進展に関与すると考えられる miRNA を絞り込み、前立腺組織及び前立腺細胞株内の発現を定量的 PCR によって検証した。その結果、発現量が前立腺癌で高い miR-30d を見出した。さらに、miR-30d のインヒビターを前立腺癌細胞株に導入したところ、癌細胞の増殖が抑制された。このことから、miR-30d は前立腺癌の増殖に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Micro RNA (miRNA) is considered the responsibility of growth and invasion in some cancer cells. However, the function of miRNA is still unclear. We investigated miRNA expression and the function in prostate cancer. We used the databases of miRNA and the genome abnormality sites in prostate cancer for the screening of the target miRNA. Further, we examined the expression of miRNA in prostate cancer tissues and prostate cancer cell lines using quantitative PCR. As the result, we found miR-30d. The inhibitor for miR-30d was reduced the growth of prostate cancer cell lines. Thus, these data was suggested that miR-30d had an important role for prostate cancer cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

機能不明とされていた non-coding RNA の持つ重要な機能が明らかとなりつつある。中でも、マイクロ RNA (miRNA) による遺伝子発現制御は様々な疾患の重要な原因因子と示唆されている。

miRNA はたんぱく質をコードしない低分子 RNA であり、細胞内において標的遺伝子 mRNA の転写産物の分解、または翻訳を阻害することで、標的分子の発現制御をする機能性 RNA である。また、miRNA は完全な相補配列だけではなく、部分的に一致した相補配列に対し

ても機能するため、一つの miRNA が何種類もの標的分子の発現を低下させる。これらの miRNA は約 400 種類以上あると報告されており、実際はさらに多く、1000 種類以上存在するともいわれている。

miRNA と癌進展の役割についてはこれまでに幾つかの報告がなされているが、その研究は始まったばかりであり、いまだに癌進展と miRNA の機能についての多くは不明である。

そこで、本研究で、前立腺癌の進展に関与する miRNA を探索し、その機能について検討をおこなう。この研究をおこなうにあたり、すでに前立腺癌の発生や進展に関与する可能性のある miRNA をバイオインフォマティクス的手法を用いて絞り込んでいる。本研究では、絞り込んだ miRNA の前立腺癌における発現とその標的分子について分子生物学的手法を用いて検索し、前立腺癌細胞の発生や進展への関与と新たな治療標的としての可能性を探索する。

## 2. 研究の目的

本研究ではバイオインフォマティクス手法を応用して前立腺癌の進展に重要と考えられる miRNA を探索し、前立腺癌組織や細胞で癌の進展に重要な可能性を持つ miRNA の発現を確認するとともに癌進展における機能を明らかとすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 前立腺癌細胞及び前立腺組織

横浜市立大学内に設置された倫理委員会で研究について承認を受け、研究使用の同意を得た前立腺組織(癌組織及び正常組織)を用いた。また、前立腺細胞として、前立腺癌細胞株 LNCaP、PC-3、DU145 及び正常前立腺細胞株 PrEC を用いた。

### (2) miRNA の探索と定量的 PCR による miRNA の発現の検討

標的とする miRNA の探索のために、web 上のデータベースである miRBase (<http://www.mirbase.org/>) を用いて、これまでに同定されている miRNA を確認した。次に、前立腺癌において、これまでに遺伝子増幅及び欠失が認められている遺伝子領域を文献検索及び web 上のデータベース (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) 等より、抽出した。これらを統合させることにより、前立腺癌で高頻度に遺伝子増幅もしくは欠失を認めた部分にコードされている miRNA を抽出した。

### (3) 定量的 PCR による miRNA の発現の検討

前立腺組織もしくは前立腺細胞株より、低分子 RNA を ISOGEN (日本ジーン) により抽出した後、TaqMan MicroRNA Assays、TaqMan

MicroRNA RT Kit、TaqMan Universal Master Mix No AmpErase UNG (全て Applied Biosystems 社) を用いて、標的とした miRNA の発現量を定量的 PCR により確認した。

また、我々は atypical protein kinase C (aPKC) 分子が前立腺癌の進展に重要であることを報告している。そこで、aPKC の発現と標的 miRNA の関連性についても検討をおこなった。

### (4) miRNA インヒビターによる前立腺癌細胞の細胞増殖の解析

標的 miRNA に対するインヒビターとして Anti-miR miRNA Inhibitor (Ambion 社) を用いた。導入する試薬として、HiPerFect (Qiagen 社) を使用した。インヒビターに対応するネガティブコントロールとしては Anti-miR miRNA Inhibitors-Negative Control #1 (Ambion 社) を用いた。インヒビターを導入後に RNA を抽出し、定量的 PCR によりインヒビターの効果を確認した。

効果を確認した後、前立腺癌細胞を 24well プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well となるように撒き、それと同時に標的 miRNA のインヒビターを導入した。その後、7 日間の培養をおこない、細胞の増殖について細胞数を計測することにより検討した。

## 4. 研究成果

前立腺癌の進展に関わる miRNA を探索するために、これまでに同定されている miRNA の遺伝子上の位置と、前立腺癌における遺伝子異常の部位(増幅もしくは欠失)との関連について検討した。それらの条件から、前立腺癌の進展に重要と考えられた miRNA 群を推測し、定量的 PCR によって前立腺癌組織における発現量を検討した。その結果、8 番染色体上にコードされる miR-30d の発現量が前立腺癌組織で高い傾向にあることを認めた。更に、前立腺癌細胞株における miR-30d の発現量について検討した結果、前立腺癌細胞株ではその発現が増加していることが明らかとなった(図 1)。

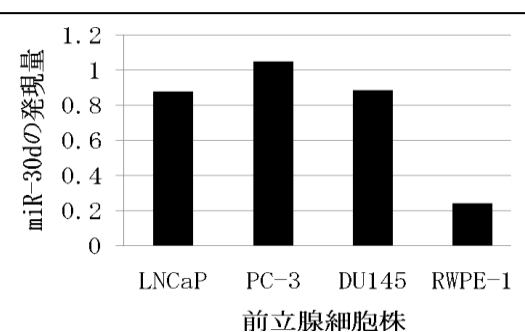


図 1 前立腺癌細胞株における miR-30d の発現

このことから、miR-30d は前立腺癌進展に重要な役割を持つと考えられた。

前立腺癌の進展における miR-30d の機能を探索するために、miR-30d のインヒビターを前立腺癌細胞株に導入した。インヒビターの効果は定量的 PCR によって確認した(図 2)。

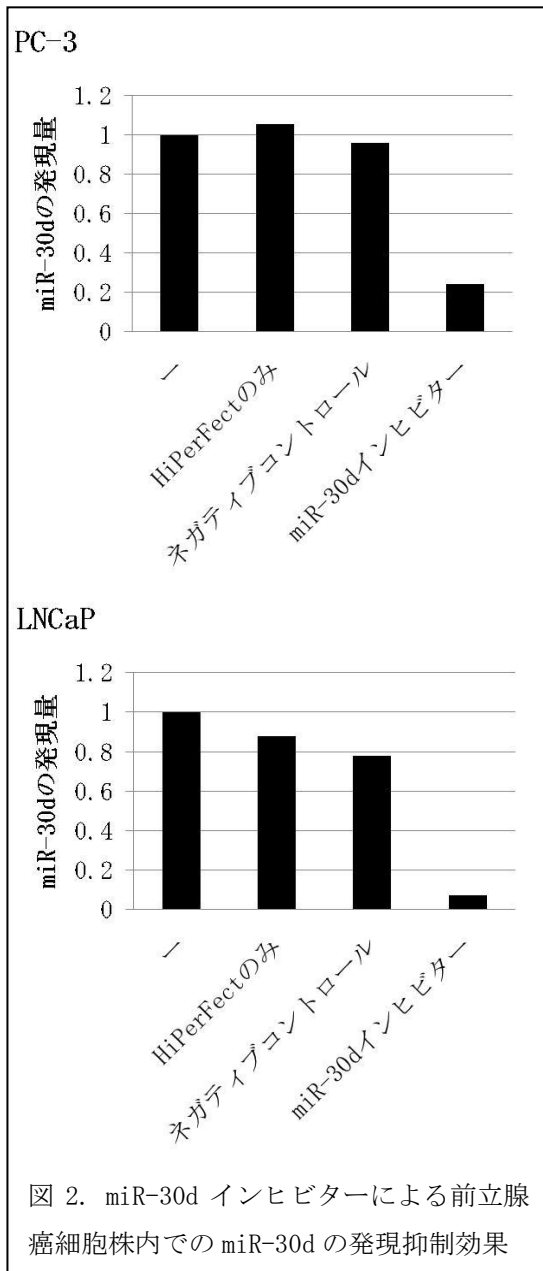


図 2. miR-30d インヒビターによる前立腺癌細胞株内での miR-30d の発現抑制効果

miR-30d のインヒビターを前立腺癌細胞に導入してから 7 日間培養の後、細胞数を計測したところ、コントロール細胞群と比較して、miR-30d のインヒビターを導入した前立腺癌細胞株では細胞増殖が抑制されていた(図 3)。この細胞増殖の抑制はアポトーシスによるものか検討したところ、アポトーシス関連遺伝子の発現に関与が認められなかった。また、aPKC 分子の発現量との間にも関連性は認められなかった。

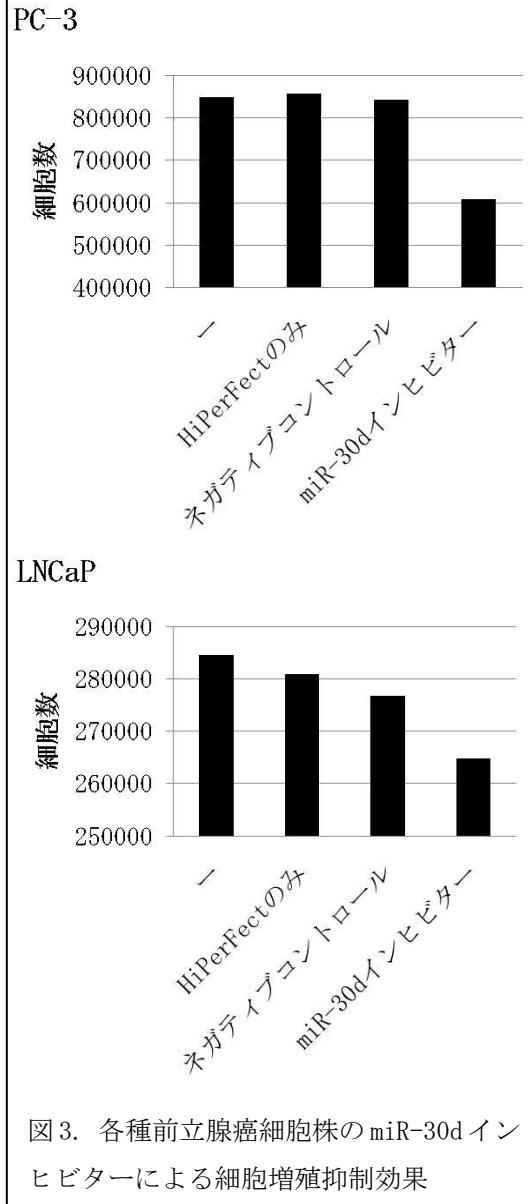


図 3. 各種前立腺癌細胞株の miR-30d インヒビターによる細胞増殖抑制効果

これらのことから、前立腺癌において、miR-30d が高発現することによって、癌細胞の増殖が促進されていると考えられた。また、その機構は miR-30d が前立腺癌内の癌抑制遺伝子の発現を抑制しているためと予測された。

現在、前立腺癌細胞内で miR-30d が高発現することにより、発現量が変動する標的遺伝子群を探索し、候補となる多くの癌抑制遺伝子を見出している。また、前立腺癌進展機構に深く関与する aPKC によって発現が制御される miRNA についても多くの miRNA を同定しており、解析を続けている。

今後、これらの見出した miRNA とその標的遺伝子群の解析を続けることで、前立腺癌に対する新たな治療標的分子と治療方法の開発につながると考える。

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 7 件)

1. Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kojima Y, Sasaki T, Ishiguro-Imagawa Y, Nakaigawa N, Ohno S, Kubota Y, Uemura H. aPKC $\lambda$ /i promotes growth of prostate cancer cells in an autocrine manner through transcriptional activation of interleukin-6. Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 16369-16374, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

1. 石黒 斉, 秋本 和憲, 長嶋 洋治, 小島 康幸, 佐々木 毅, 上村 博司, 大野 茂男, 窪田 吉信. 前立腺癌における aPKC の発現と前立腺癌進展機構. 第 97 回日本泌尿器科学会総会, 2009年4月, 岡山.
2. 石黒 斉, 秋本 和憲, 長嶋 洋治, 小島 康幸, 石黒 由香利, 佐々木 毅, 上村 博司, 大野 茂男, 窪田吉信. The role of aPKC lambda in prostate cancer progression. 第 67 回日本癌学会総会, 2008 年 11 月, 名古屋.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 斉 (ISHIGURO HITOSHI)  
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授  
研究者番号 : 00381666