

機関番号：12601
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790305
 研究課題名 (和文) 全ゲノム AR 結合部位決定に基づく前立腺癌における miRNA と ncRNA の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of miRNAs and ncRNAs identified by global screening of AR binding sites in prostate cancer cells.
 研究代表者
 高山 賢一 (TAKAYAMA KENICHI)
 東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
 研究者番号：50508075

研究成果の概要 (和文)：前立腺癌細胞においてアンドロゲンに誘導される miRNA および ncRNA (non-coding RNA) の同定を試みた。まず ChIP-chip の結果より AR 結合部位を近傍に有する miRNA 群が同定され、直接的なアンドロゲン誘導を示唆するものであった。また CAGE や Short RNA sequence などによりいくつかのアンドロゲン応答性の miRNA や Non-coding RNA を同定した。特に miRNA-148a はアンドロゲン誘導性の miRNA であり前立腺癌細胞において高発現し細胞増殖を正に促進する因子であることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：We tried to identify androgen-regulated miRNAs and ncRNAs (Non-coding RNAs) in prostate cancer cell. First, We found several miRNAs are situated in the vicinity of AR binding sites we identified by ChIP-chip analysis. We also identified androgen responsive miRNAs and ncRNAs by large scale screening such as CAGE or short RNA sequence. Notably, we showed miR-148a is a primary androgen regulated miRNA strongly expressed in prostate cancer cells. Furthermore, we also found MiR-148a promotes prostate cancer cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：内科 内分泌

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌・ゲノム・ホルモン

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は高齢男性に発生率の高い癌であり、その発生、悪性化はアンドロゲンに強く依存している。アンドロゲンは前立腺上皮において細胞質中のアンドロゲン受容体 (AR) と結合後、核内へと移行しゲノム中のアンドロゲン応答配列を認識することで転写因子として機能している (Taplin ME et al. J Cell Biochem. 91, 483-490, 2004, Debes JD

et al. N Engl J Med. 351, 1488-1490, 2004.)。従って前立腺癌においてアンドロゲンがどのような転写産物を制御し癌の発生に関わっているか解析するためには AR の結合するゲノム領域を同定し AR の下流シグナルを解析することが重要である。

またマイクロ RNA (microRNA 以下 miRNA と略す) は 20-30 塩基からなる short RNA であり、miRNA と相同性のある mRNA に不完全な

結合をすることで蛋白レベルでの遺伝子発現を制御している。miRNA は蛋白をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の一種であり、近年、発生、分化、増殖において重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Chen K, Rajewsky N. Nat Rev Genet 8, 93, 2007)。

一方で、最近アンドロゲンによって制御をうける ncRNA や miRNA として mir-125b が同定された (Shi XB et al. Proc Natl Acad Sci USA 104, 19983-8, 2007)。mir-125b は前立腺癌の増殖を促進しており、癌の進行に関わっている可能性が示唆された。またその近傍には AR 結合領域も同定されており AR による直接の制御であることが示された。また別の報告では前立腺癌における miRNA の発現が確認されており、125b を初めとしていくつかの miRNA が癌で発現の上昇または減少していることが報告され、前立腺癌の発生には多数の miRNA が関わっている可能性が示唆されている (Porkka KP et al. Cancer Res 67, 6130-5, 2007)。しかしながら、アンドロゲンによる miRNA や ncRNA の転写制御、また癌への直接の関与については未だ十分に解明されたとはいえず、AR により転写を制御される miRNA を同定し癌へのメカニズムを解析することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々はクロマチン免疫沈法 (ChIP) を利用し AR の結合部位を同定し近傍の応答遺伝子に着目し前立腺癌における AR の標的遺伝子を解析してきた (Takayama K et al. Biochem Biophys Res Commun 374, 388-393, 2008)。また ChIP とゲノムタイリングアレイを組み合わせた ChIP-Chip 法を用いることにより ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) 領域、および染色体 21, 22 領域における AR の結合領域を合わせて 68 箇所同定している (Takayama K et al. Oncogene 26, 4453-63, 2007)。さらに全ゲノムアレイを用いた全ヒトゲノム領域における解析によりおよそ 3000 箇所 (P value $< 10^{-5}$) の AR 結合部位を同定した (Takayama K et al. Oncogene 30, 619-630, 2011)。

本研究では、現在までに我々が見出した AR 結合部位のデータを利用して近傍に存在する AR で直接制御される miRNA や ncRNA を同定し、それらの前立腺癌でのターゲットを見出すことで癌における機能を解析する。前立腺癌において癌の機能に関わる miRNA および ncRNA を同定しその標的を明らかとすることで発癌にいたるメカニズム解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) AR 結合部位を近傍に持ちアンドロゲンにより制御される miRNA を Taqman RT-PCR 法を用いて同定すること 2) それらアンドロゲン

で制御される miRNA の前立腺癌での増殖における役割を解析する 3) miRNA により発現が抑制されるターゲット遺伝子を同定し miRNA の癌における作用機構を解明する。4) さらに transcriptome 解析として CAGE (Cap analysis of gene expression) をおこなった。LNCaP 細胞でのアンドロゲン刺激前後での転写開始点のシグナルをシーケンスにより比較し新たに見出されたアンドロゲン応答性転写開始点より ncRNA を同定する。

5) ChIP assay を用いて miRNA 近傍の AR 結合領域ならびにヒストンの修飾 (K4me3, K9Ac) を解析した。

4. 研究成果

まず AR 結合領域の近傍にある新たなアンドロゲン応答性 miRNA, ncRNA の同定を行いそれらの前立腺癌細胞株における発現を検証した。

ChIP-chip を用いて解析した AR 結合領域はヒトゲノム上で 2872 箇所 (P -value $< 10^{-5}$) 同定され近傍の miRNA を miRBASE にて検索した。その結果 AR 結合部位近傍の miRNA として mir-99a, let7c, mir342 をリストアップした。まずアンドロゲン応答性の miRNA の反応性を見るため Taqman qPCR によって検証した。LNCaP 細胞に対して R1881 10 nM にて刺激を行い 24, 48 時間後に RNA を回収した。逆転写反応を行い qPCR により Vehicle 刺激での発現量に対する比を $\Delta\Delta$ Ct 法により解析したところ mir99a は 24 h で 1.7 Fold, mir342 は 24 h で 2.2 Fold, 48 h で 1.98 Fold また let7c は 48 h で 6.0 Fold の発現亢進を認めた。以上の miRNA はアンドロゲン応答性 miRNA として機能していることが考えられた。

ncRNA については Ensembl や GENBANK などの database に登録されている transcript より AR 結合部位近傍の ncRNA を検索しいくつかの Non-coding な transcript, EST を同定した。それらの transcript の発現抑制により細胞増殖にも差がでることも同定した。

またアンドロゲン応答性の miRNA として同定された miRNA を transfection することで LNCaP 細胞に過剰発現する実験を行った。AR 結合領域近傍の miRNA のなかで Short RNA-sequence で同定された miR-148a, 141, 200a が前立腺癌細胞の増殖を促進することを見出した。これらの miRNA のアンドロゲンによる誘導の機構として ChIP を用いた実験により 5' 側において通常の Refseq 遺伝子のプロモーターとは異なるヒストンの活性化領域 (AcH3, H3K4me3) を有しており、AR 結合領域も近傍にもつことから AR による直接的な primary transcript の転写制御をうけていることが考えられた。また ChIP-chip により同定された AR 結合領域近傍に存在する新規のアンドロゲン応答性転写開始点を CAGE により解析した。約 7% の転写開始点は Refseq

遺伝子の Antisense 領域に存在しており、GENBANK に存在する ncRNA を参考に絞り込んだところ幾つかの遺伝子の antisense に存在する transcript が同定され着目した。AS 領域の transcript は non-coding RNA と考えられ、興味深いことにこのように AS にアンドロゲン誘導性の transcript が存在する遺伝子はアンドロゲンにより抑制、もしくは誘導されるなどの双方向の制御をうけることが観察された。以上我々はアンドロゲン応答性の miRNA ならびに non-coding RNA を同定しアンドロゲンによる発現制御、癌の増殖における役割を解析した。

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 5 件)

1. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int J Cancer* (in press) 査読あり
2. Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Takahashi S, Inoue S: ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* (in press) 査読あり
3. Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S: Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* 30, 619-630, 2011. 査読あり
4. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ijichi N, Ikeda K, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S: Differential expression of estrogen-related receptors β and γ (ERR β and ERR γ) and their clinical significance in human prostate cancer. *Cancer Sci* 101, 646-651, 2010. 査読あり
5. Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Takahashi S, Kawazu C, Hasegawa A, Ouchi Y, Homma Y, Hayashizaki Y, Inoue S: miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13, 356-361, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S: Integrative analysis of androgen receptor signaling in prostate cancer cells by cap analysis of gene expression (CAGE) and chromatin immunoprecipitation analysis on array in prostate cancer cells. (2010.12.7-10) BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会) (神戸)
2. Takayama K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S: ChIP analysis on array reveals genome-wide androgen receptor-binding sites in human prostate cancer cells. (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪)
3. 高山賢一、片山慎太郎、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、大内尉義、林崎良英、井上聡：[学会賞(基礎部門)受賞] 次世代シーケンサーを活用したアンドロゲン依存性転写開始点の包括的同定による前立腺癌におけるアンドロゲン標的シグナルの解析 (2010.7.30-31) 第 29 回日本アンドロロジー学会学術大会 (東京)
4. 高山賢一、浦野友彦、大内尉義、井上聡：ヒト 21、22 番染色体におけるアンドロゲン受容体結合部位の探索 (2010.6.24-26) 第 52 回日本老年医学会学術集会 (神戸)
5. Takayama K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S: Global analysis of Androgen receptor binding sites in human prostate cancer cells. (2010.3.31) Satellite Symposia, Nuclear Receptor and its Frontier, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan.
6. Takayama K, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S: A cell cycle regulator, transforming acidic coiled-coil protein 2 (TACC2), is an androgen-regulated gene that promotes prostate cancer progression. (2010.3.26-30) 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto,

- Japan.
7. Takayama K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S: RUNX1 is a novel androgen-regulated gene that modulates AR transcriptional activity and prostate cancer cell proliferation. (2009. 10. 1-3) 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜)
 8. 高山賢一、堀江公仁子、池田和博、浦野友彦、鈴木貴、藤村哲也、高橋悟、堤修一、油谷浩幸、大内尉義、井上聡: [YIA 受賞] ヒトゲノムにおけるアンドロゲン受容体結合部位ならびにヒストン蛋白修飾の包括的解析による新規前立腺癌診断・治療標的の同定 (2009. 4. 23-25) 第 82 回日本内分泌学会学術集会 (群馬)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 賢一 (TAKAYAMA KENICHI)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号: 50508075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし