

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 9 1 5 3 0

研究課題名（和文）前立腺癌における機能性 RNA の分子生物学的意義および標的遺伝子の解析

研究課題名（英文）

Analysis of function and the target genes of micro-RNAs in prostate cancer

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：1 0 3 4 5 0 1 9

研究成果の概要（和文）：

前立腺癌の進行の分子生物学的機序は未だ明らかでない。本研究では新しい概念である機能性 RNA（マイクロ RNA）に注目し、前立腺癌において重要な役割をするマイクロ RNA と、その標的遺伝子の同定・機能解析を行った。まず、白血病の発生にかかわると言われている miR-15a と miR-16-1 の機能について、前立腺癌細胞株を用いて検討し、標的遺伝子を同定した。さらに、前立腺癌にて発現するマイクロ RNA を網羅的に解析し、機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism of progression of cancer (PCa) to androgen-independent (AI) stage has not completely known. MicroRNAs (miRNAs) are known to have important roles in cancer development and malignant transformation. It is well known that miR-15a and miR-16-1 functions as tumor suppressor in lymphomas. We previously revealed that miR-15a caused growth inhibition and induced apoptosis in prostate cancer cells. In this study, we identified several miRNAs those were differentially expressed in PCa based on genome-wide miRNA expression signature. Analysis of the target genes may have therapeutic implications and may be exploited for future treatment of advanced PCa.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 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、マイクロ RNA、アポトーシス、標的遺伝子解析、発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の発生、進展の発現調節機構として non-coding RNA（microRNA：miR）が注目されている。miRNA の発現が癌において変化することにより、癌細胞の増殖やアポト

ーシス、浸潤、転移に影響することが知られている。miR-15a, miR-16 は Bcl2 を標的とし癌抑制的に作用することが白血病で示された後、乳癌、glioblastoma, 肺癌、甲状腺癌、大腸癌、膵癌、そして前立腺癌でも同様

の機能が示された。最近は、癌において発現の変化している miR に注目し、その標的遺伝子を同定することで新たな癌の進展のメカニズムを探求する研究が報告されている。

2. 研究の目的

miRNA は癌組織において発現が低下するケースが多いことが知られている。miRNA の発現を網羅的に (マイクロアレイ解析などで) 調べることで、癌と非癌組織を比較すれば、発癌に関する miRNA が予測でき、予後不良群と予後良好群を比較すれば、癌細胞の増殖・進展に関与する miRNA が予測される。前立腺癌の発生・進展に重要 miRNA を同定するために、今回我々は以下の研究を行った。(1) 臨床検体を用いて、miR-15a および miR-16-1 の発現が低下するかどうか検討した。

(2) 前立腺癌細胞株における miR-15a および miR-16-1 の発現を検討し、細胞増殖抑制能や細胞死の誘導について調べた。

(3) 進行性前立腺癌の臨床検体における miR の発現をマイクロアレイを用いて genome-wide に調べ、前立腺癌における細胞増殖に影響を与える miR の発現プロファイルを作成した。前立腺癌において発現の低下している miR を、前立腺癌細胞株に遺伝子導入し、その細胞増殖や細胞死に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 前立腺針生検にて得られた進行前立腺癌と正常前立腺組織検体それぞれ 8 例ずつから RNA を抽出し、miR-15a と miR-16-1 の発現を RT-PCR にて同定した。

(2) 前立腺癌細胞株 LNCaP, C4-2, PC3, DU145 に miR-15a および miR-16-1 を遺伝子導入 (transient transfection) し、細胞増殖を XTT アッセイにて、細胞死について FACS を用いて比較検討した。

(3) 進行前立腺癌と正常前立腺組織それぞれ前立腺針生検にて得られた検体 5 例ずつから得られた検体における miR の発現をマイクロアレイ (Low Density MicroRNA Array) で比較検討した。LNCaP, PC3, DU145 に miRNA のプレカーサーを transient transfection し、XTT アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌では正常前立腺より miR-15a および miR-16-1 の発現が有意に低下していた (図 1)。

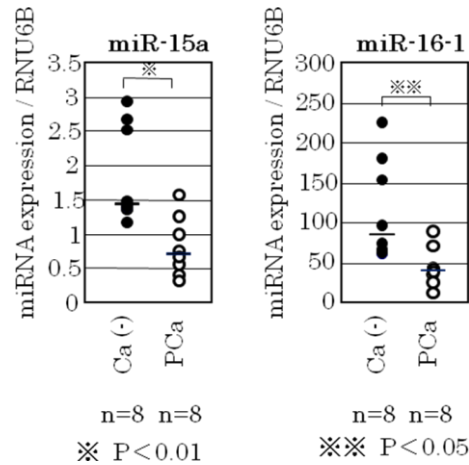


図 1 前立腺癌における miR-15a/16-1 の発現低下

(2) miR-15a および miR-16-1 を遺伝子導入すると LNCaP および C4-2 では細胞増殖の抑制およびアポトーシスの亢進が認められたが、PC3, DU145 では変化しなかった (図 2)。

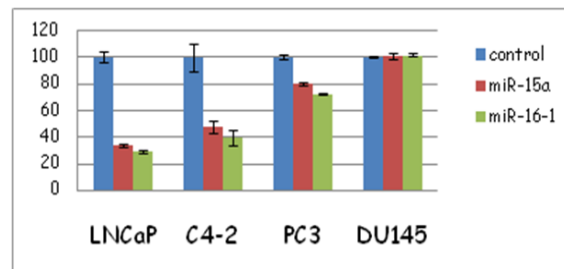


図 2 LNCaP, C4-2 における miR-15a/16-1 による増殖抑制

(3) Low Density MicroRNA Array による解析の結果、進行性前立腺癌において最も発現の低下のみられたのは miR-184, miR-187, miR-205, miR-200a*, miR-31 であった (表 1)。これらの miR を前立腺癌細胞株に導入すると、LNCaP, PC3 細胞では増殖抑制を示したが、DU145 細胞では変化を認めなかった。

| miRNA | Normalized data | | | Mature miRNA Sequences | Chromosomal position |
|-----------|-----------------|--------------|--------------|------------------------|----------------------|
| | PCa positive | PCa negative | Fold changes | | |
| miR-184 | 9.3 | 153.6 | 0.060 | uggacggagaacugauaagggu | 15q25.1 |
| miR-187 | 22.6 | 562.8 | 0.040 | uegugucuuugugucagcgg | 18q12.1 |
| miR-200a | 57.3 | 3858.0 | 0.015 | uaacacugucuguaacgaugu | 1p36.33 |
| miR-200a* | 48.5 | 178.4 | 0.271 | caucuuaaccgacagucugga | 1p36.33 |
| miR-205 | 210.8 | 3611.6 | 0.058 | uccuauuccacggagucug | 1q32.2 |
| miR-31 | 544.1 | 5386.7 | 0.101 | aggcaagaucgucgcauagcu | 9p21.2 |

表 1 前立腺癌において発現の低下を認めた miRNA

前立腺癌における miRNA プロファイルは最初 2007 年に Porkka らにより報告された。2009 年、Tong らは、T2a/b の前立腺全摘除術を施行した患者の PSA 再発（2 年以内）を起こす症例では非再発症例と比較して 16 の miRNA の発現の変化を認めたと報告した。このように、癌における miRNA の発現プロファイルから、発癌のメカニズムや、予後などを予測することが可能となる。今回、miRNA15a および miR-16-1 が本邦の進行前立腺癌においても臨床的に重要であることが示唆された。また、miRNA の発現プロファイルから同定された miRNA は、他の癌でも重要な役割を果たしていることが示されている。ホルモン抵抗性前立腺癌の細胞株 DU145 においては、明かな細胞死の誘導は認めなかったが、LNCaP と PC3 においては抑制効果を認めたため、これら表 1 に示した miRNA が、前立腺癌の増殖・進展に重要な役割を果たしている可能性がある。その分子生物学的な細胞増殖抑制機構を解明するために、現在、我々はさらにその miRNA の標的遺伝子の同定とその遺伝子の機能解析を行っている。今回の研究により、網羅的な遺伝子解析の手法を用いることにより、進行前立腺癌の増殖や進展を抑える miR を同定できる可能性が示唆された。

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 3 件）

- ① Yasutoshi Yamada, Hideki Enokida, Satoko Kojima, Kazumori Kawakami, Takeshi Chiyomaru, Shuichi Tatarano, Hirofumi Yoshino, Kazuya Kawahara, Kenryu Nishiyama, Naohiko Seki and Masayuki Nakagawa. Mir-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 102(3):522-529, 2011. 査読あり
- ② Miki Fuse, Nijiro Nohata, Satoko Kojima, Shinichi Sakamoto, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yukio Naya, Tomohiko Ichikawa and Naohiko Seki. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int. J. Oncol.* 38:1093-1011, 2011. 査読あり
- ③ Satoko Kojima, Masahiko Inahara, Yoshihiro Suzuki, Tomohiko Ichikawa, and Yuzo Furuya Implications of IGF-I for prostate cancer therapies. *Int. J. Urol.* Feb;16(2):161-7, 2009. 査読あり

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 第 69 回日本癌学会学術総会 前立腺癌における miR-200 family および miR-205 の機能解析. 小島聡子、榎田英樹、千代丸剛、中川昌之、稲原昌彦、納谷幸男、関直彦. 平成 22 年 9 月 22 日—9 月 24 日 大阪
- ② 第 19 回泌尿器分子・細胞研究会 進行前立腺癌における microRNA のプロファイル解析. 小島聡子、榎田英樹、千代丸剛、稲原昌彦、中川昌之、納谷幸男、関直彦. 平成 22 年 2 月 19-20 日 鹿児島
- ③ 第 68 回日本癌学会学術集会 進行前立腺癌における microRNA の発現解析. 小島聡子、有馬雅史、榎田英樹、千代丸剛、中川昌之、稲原昌彦、関直彦. 2009 年 10 月 1-3 日 横浜
- ④ EUA The 24th annual congress of European association of urology, 17-21 march 2009 Stockholm, Sweden Abstract 777. MiR-15a functions as a tumor suppressor for prostate cancer by targeting multiple oncogenes. Satoko

Kojima, Ryoko Watanabe, Jun Tsukada, Yuzo Furuya, Naohiko Seki. 17-21 march 2009. Stockholm, Sweden.

- ⑤The 100th AUA annual meeting MiR-15a functions as a tumor suppressor for prostate cancer by targeting multiple oncogenes. Satoko Kojima, Ryoko Watanabe, Jun Tsukada, Yuzo Furuya, Naohiko Seki. 25-30 April, 2009. Chicago, Illinois, USA.

〔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

関 直彦 (SEKI NAOHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50345013