

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591772

研究課題名（和文）Invasive front の mRNA の発現解析による前立腺癌細胞浸潤機序の解明

研究課題名（英文）The mechanism of cancer cell invasion identified by micro-RNA expression at the invasive front of prostate cancer.

研究代表者

佐藤文憲（SATO FUMINORI）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30305049

研究成果の概要（和文）：前立腺全摘除術にて得られた組織の癌細胞浸潤の最先端部（invasive front）と非浸潤部分の micro-RNA（miRNA）発現パターンを解析し、浸潤に関与する miRNA の同定を試みた。個体間および同一患者の組織間に発現パターンの差が大きく、invasive front と非浸潤部分において有意に発現が異なる miRNA は同定できず、miRNA は前立腺癌の浸潤において明らかな関連はないことが示唆された。本研究の問題点として、サンプル数（n=32）が限定的である点と、サンプル間の miRNA 発現のばらつきが比較的大きいことが挙げられ、前立腺癌の浸潤に miRNA が関与するか否かについてはさらなる研究を行う必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of prostate cancer cell invasion using micro-RNA (miRNA) expression analysis. Paraffin-embedded human prostate cancer tissues were used for this study. The miRNA was extracted from the invasive front and noninvasive part of cancer lesion. Individual prostate cancer expressed various miRNAs. Unexpectedly, the miRNA expression pattern at the invasive front was not significantly different from that of non-invasive part of cancer. The major limitation of this study is small sample size (n=32), and the quality of miRNA extracted from paraffin-embedded tissues. From this study, miRNA may not influence or play an important role for the prostate cancer invasion, but we cannot reach the conclusion. Further investigation should be done to answer this principal question.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、浸潤、micro-RNA、invasive front

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 浸潤及び転移は前立腺癌の臨床的な予後規定因子として最も重要であり、その機序を解明することは極めて重大な課題である。

(2) 臨床的には悪性度の高い前立腺癌は局所浸潤傾向が強く、実際に病理診断上重要な Gleason pattern は前立腺癌の組織構築と浸潤様式によって分類されている。しかし病理学的悪性度(Gleason pattern or score)と病理学的な浸潤の程度(T stage)は必ずしも相関しない。また、同一の前立腺組織内に病理学的悪性度の異なる癌細胞が混在することはしばしば経験するが、悪性度の高い細胞が局所浸潤の程度(T-stage)を規定しているとは限らない。すなわち癌細胞の表現型に基づいた現在の病理学的診断法は癌細胞の浸潤能を測る正確な物差しではないと同時に、癌細胞の浸潤能獲得の機序は分子細胞学的手法を抜きに解明は不可能と考えられる。

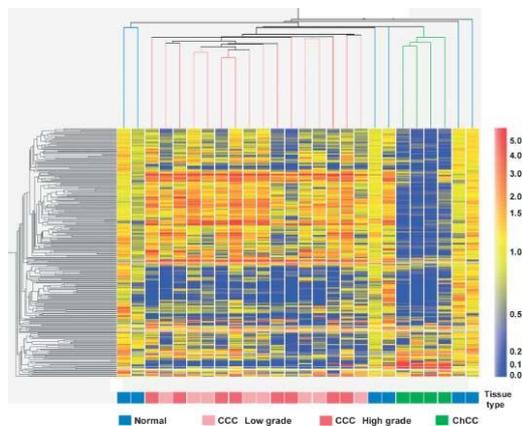
(3) 浸潤能を獲得していない癌細胞と比較して、EMT(epithelial-mesenchymal transition)を経て浸潤の最先端部

(invasive front)に到達した癌細胞は、表現型の変化に留まらず、重大な遺伝情報の変化を伴っており、原発臓器における invasive front の解析は癌細胞の浸潤機構の解明に極めて重要な意味を持つと考えられる。

(4) 原発巣と転移巣の遺伝子発現解析に関する報告は散見されるものの、同研究の問題点としては原発巣における個々の細胞集団の浸潤能は考慮していない点と、転移巣ではすでに浸潤・転移能を獲得後に標的臓器に定

着した EMT とは逆の MET (mesenchymal-epithelial transition)を起こした細胞集団との比較であり、癌細胞が原発巣で獲得する初期の浸潤能を解明するには適していない点が挙げられる。

(5) 近年 microRNA (miRNA) と呼ばれる遺伝子をコードしない 19-25bp 程度の短い短鎖 RNA が mRNA の阻害によって種々の遺伝情報を制御していることが証明されたが、その全貌は不明である。miRNA は EMT にも深く関与することが解明されつつあり、我々は miRNA microarray の結果に基づいて、ZFHX1B を介して CDH1/E-cadherin の転写を制御する miR-200c の発現低下が腎細胞癌 (Renal cell carcinoma: RCC) の浸潤と密接に関連していることを報告した。



(J Pathol 216, 2008., J Pathol 224, 2011.)

(5) 前立腺癌においても mRNA の阻害によって種々の遺伝情報を制御している microRNA (miRNA) が癌細胞の浸潤能を制御している可能性は極めて高いと考えられる。

(6) 前立腺癌組織における invasive front と非浸潤部における miRNA 発現プロファイルに関する研究は、従来の病理学的因子に囚わ

れず、前立腺組織内の浸潤傾向に主眼を置くことで、必ずしも癌細胞の表現型に依存しない細胞集団の遺伝子発現解析が可能となるが、現在までその報告はない。

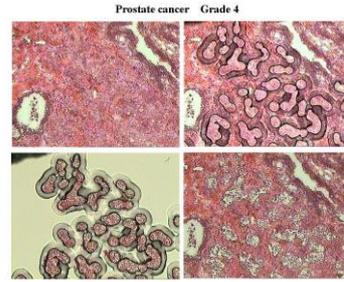
## 2. 研究の目的

前立腺癌の浸潤に関与する miRNAs とその標的 mRNA を同定する。また、標的 mRNA とさらにその翻訳産物の発現解析および miRNA 発現系の機能解析から前立腺癌細胞の局所浸潤を制御する遺伝情報の一端を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 前立腺癌の診断で当科にて前立腺全摘除術を施行した 249 例うち、局所浸潤傾向を有する Pathological stage 3a 以上の 43 例を抽出、年齢や初診時 PSA 等の患者背景、臨床病期、病理診断 (Gleason score, pT-stage, 他)、術後生化学的および生物学的再発の有無等の臨床病理学的な項目をデータベース化した。

(2) 癌細胞が LCM にて切り出し可能と判断した 32 例について厚さ  $10\mu\text{m}$  の連続切片を 20 枚作成し、各 1 枚を再度 HE 染色し浸潤の最先端部 (invasive front) と非浸潤部分、正常腺組織を同定した。他の連続切片をトルイジンブルー染色し、LCM (ライカ社) を用いて顕微鏡下に 1) 浸潤の最先端部 (invasive front) と 2) 非浸潤部分および 3) 正常腺組織を分けて顕微鏡下に切り出し、RNA を抽出した。



(3) RNA 抽出キット (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出した。miRNA labeling and hybridization kit (Agilent 社) を用いて Cy3 にてラベル、ハイブリダイズし、miRNA マイクロアレイ (Agilent 社) を行った。アレイは蛍光シグナルを検出し Feature extraction software (Agilent 社) を用いてその強度を測定した。

(4) マイクロアレイのデータを GeneSpring GX software (Agilent 社) にてクラスター解析を行い miRNA 発現パターンによる invasive front、非浸潤部分および正常腺組織の分類が可能か否かを解析し、浸潤に関与する miRNA の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 本研究の対象とした 32 例の平均年齢は 72 歳、初診時 PSA は  $12.4\text{ng/ml}$ 、pT3a 24 例、pT3b 8 例であり、Gleason score 3+3=6 5 例、3+4/4+3=7 8 例、4+4=8 12 例、4+5/5+4 5 例、5+5=10 2 例であった。

(2) 個々の前立腺癌は様々な miRNA を発現しており、その発現強度も様々であった。また、正常細胞においても癌細胞と同様に様々な miRNA の発現を認めた。

(3) miRNA 発現パターンによる invasive front、非浸潤部分、および正常腺組織の分

類が可能か否かを解析した結果、前立腺癌の個体間および同一患者の組織間に発現パターンの差が大きく、invasive front と非浸潤部分において有意に発現が異なる miRNA は同定できなかった。また、正常細胞と癌細胞には miRNA の発現が異なることが期待されたが、サンプルによる発現のばらつきが大きく、有意な発現パターンの相違は見られなかった。

(4) 以上の結果より miRNA は前立腺癌の浸潤において明らかな関連はないか、あるいは重要な役割は果たしていないことが示唆された。

(5) 本研究の問題点として、サンプル数が限定的である点と、サンプル間の miRNA 発現のばらつきが比較的大きいことが挙げられる。サンプル間の miRNA 発現のばらつきが大きい原因の 1 つにはパラフィン包埋での miRNA の保存状態、あるいは抽出効率にばらつきが生じていることが推察された。

(6) 本研究においては前立腺癌の浸潤への miRNA 関与は否定的であったが、その結論についてはさらなる研究が必要と考えられた。

(7) 今後、同様の実験手法を用いる場合、課題としてサンプル数の問題や total RNA/miRNA のクオリティーの問題を克服することが必要と考えられた。ヒト前立腺癌組織においては肉眼所見から癌病巣の同定が困難であるため、癌病巣の切り出しと凍結保存が困難であり、結果としてホルマリン固定組織を用いざるえないことが障壁となっている可能性が示唆される。今後 1 つの解決法として miRNA が安定的に抽出可能な凍結サンプルが得られるマウス等の in vivo モデルを用いた検討が妥当と推察され、さらに in vivo

モデルから得られた情報を、再度臨床検体で検証することが可能ではないかと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐藤文憲 (SATO FUMINORI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：30305049

(2) 研究分担者  
三股浩光 (MIMATA HIROMITSU)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：60219714

(3) 連携研究者 なし