

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791741

研究課題名（和文） スタチンによる、miRNA を介した前立腺癌増殖制御機構の解明

研究課題名（英文） The effects of statin on prostate cancer progression via miRNA

## 研究代表者

関根 芳岳（SEKINE YOSHITAKA）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00516370

## 研究成果の概要（和文）：

スタチンは前立腺癌に対して抗腫瘍効果のあることが報告されているが、まだそのメカニズムは明らかではない。今回、我々は、スタチン投与によって発現変化する miRNA の同定、その発現変化のあった miRNA のターゲットである mRNA の中で、前立腺癌の進展阻害と関与するものを検討した。PC-3 細胞において、シンバスタチン投与により、miR-210 や miR-375 の発現は上昇し、特に miR-210 に関しては、癌と関連のある INSIG1 の発現を抑えることで、前立腺癌の進展が抑えられる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Statins have been being studied for their proapoptotic and antimetastatic effects. However, the exact mechanisms of their anticancer action are still unclear. In this study, we identified miRNAs affected by treatment of statins, and mRNAs, targeted by the identified miRNAs, which are concerned with progression of prostate cancer. In PC-3 cells, the expressions of miR-210 and miR-375 were up-regulated by simvastatin. Moreover, INSIG1, which is a target of miR-210 and down-regulated by simvastatin, seemed to play a role in the antitumoral effects of statin.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

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：腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の成因として数多くのものが存在するが、その一つに食事が挙げられる。特に、前立腺癌罹患率の違いから、前立腺癌患者の多い欧米型の食事（高脂肪食）が前立腺癌の発症、進展に影響を与えているのではないかと、いう事は以前より指摘されてきており、我々は高脂肪食によって血中で増加する、LDL コレステロールやレムナントリポタンが前立腺癌細胞増殖を

引き起こすことを示してきた。一方で、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは高コレステロール血症の治療薬として広く使用されているが、その pleiotropic な作用として、スタチン内服群では前立腺癌の罹患率が低い、根治的前立腺全摘術や放射線療法後の前立腺癌の再発率が低いなどが報告されている。しかしスタチンがこういった抗腫瘍効果を引き起こすメカニズムとしては、いまだ不明瞭な点も多く、解明することで新たな治療法へつながる可能性が

示唆された。

## 2. 研究の目的

今回我々は、前立腺癌細胞株における、スタチン投与によって発現変化する miRNA の同定、その発現変化のあった miRNA のターゲットである mRNA の中で、前立腺癌の進展阻害と関与するものを検討しスタチンの抗腫瘍効果のメカニズムを解明した。

## 3. 研究の方法

まずシンバスタチンが前立腺癌細胞 PC-3 に対して、細胞増殖、遊走、浸潤効果のある濃度を *in vitro* にて検証した。次に *in vitro* におけるシンバスタチン投与群 (5  $\mu$  M) および非投与群の total RNA (miRNA および mRNA) を miRNeasy Mini Kit (Qiagen) にて抽出し、その total RNA を用い、miRNA マイクロアレイおよび cDNA マイクロアレイにて遺伝子発現の包括的な解析により、発現変化のあった miRNA 及び mRNA を同定した。さらには、同定された miRNA を PC-3 ヘトランスフェクションし、細胞への影響、アレイで変化のあった mRNA の発現変化を確認した。

## 4. 研究成果

シンバスタチン (5  $\mu$  M) にて、PC-3 に対して、細胞増殖・遊走・浸潤抑制効果を認めた。そこで、シンバスタチン (5  $\mu$  M) を投与して 48 時間後に回収した total RNA を用い、miRNA および cDNA マイクロアレイを施行したところ、miR-375 ; ターゲット mRNA として MATN3、CENPM、PDE4B 等、miR-210 ; ターゲット mRNA として、INSIG1、ESCO2、E2F3 等、ほかの miRNA としては、miR-148a、miR-22 等がその候補として挙げられた (1) (2) (3)。それぞれの miRNA の発現変化は定量的 PCR にて確認を行った。さらにそれらの候補 miRNA を PC-3 にトランスフェクションしたところ、miR-210 では、細胞増殖・遊走・浸潤抑制効果、miR-375 では細胞遊走・浸潤抑制効果を認め、スタチンの効果に miRNA が関与していることが示唆された (4) (5)。次に、miR-210、miR-375 を PC-3 ヘトランスフェクションし、mRNA の変化を確認したところ、miR-210 に対しては、INSIG1 の発現低下を認めた (6) もの、miR-375 に対しては、ピックアップした mRNA の発現低下が認められなかった。INSIG1 は細胞内の脂質環境を調節している遺伝子で、乳癌細胞では、その発現低下にて癌の細胞増殖抑制効果が報告されているが、INSIG1 の siRNA を PC-3 ヘトランスフェクションすることで、細胞増殖及び遊走抑制効果を認めた (7) (8)。前立腺癌にお

けるスタチンの抗腫瘍効果において、miRNA が重要な役割を果たしていることが示唆された。最近では、circulating miRNA と前立腺癌との関与を示す報告も散見され、それらでピックアップされた miRNA と今回ピックアップされた miRNA との関与なども今後は検討していきたい。

(1)

miRNA	Fold Change	regulation
hsa-miR-375	9.47729	up
hsa-miR-210	3.5479422	up
hsa-miR-148a	2.6899185	up
hsa-miR-22	2.5113654	up

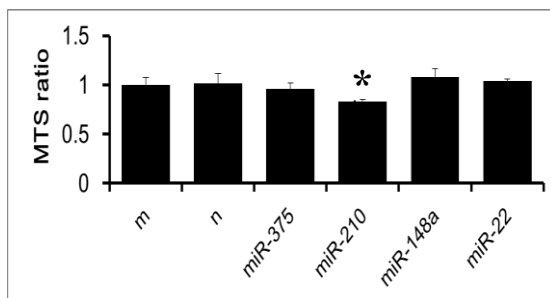
(2)

miR-210		
Gene Symbol	Fold change	Regulation
ESCO2	9.00	down
SCARA3	7.41	down
ESCO2	6.61	down
RAB3B	4.53	down
TMEM20	4.53	down
MCM8	3.88	down
STMN1	3.46	down
INSIG1	3.04	down
ZNF618	3.00	down
RUNX3	2.89	down
RUNX3	2.78	down
ERP27	2.72	down
BNC2	2.66	down
AKAP7	2.53	down
SLC2A4RG	2.52	down
IPO5	2.43	down
FKBP1B	2.41	down
FBXO5	2.40	down
CACNA2D2	2.40	down
SCARA3	2.31	down
IPO5	2.31	down
E2F3	2.25	down
CHN1	2.23	down
RRP1B	2.05	down

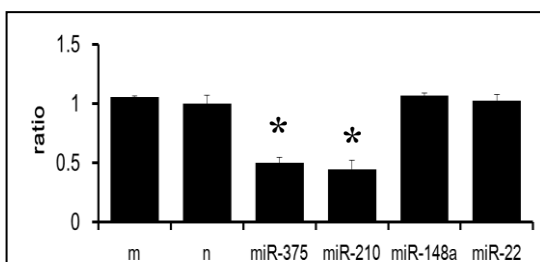
(3)

miR-375		
Gene Symbol	Fold change	Regulation
MATN3	12.86	down
CENPM	9.12	down
CENPM	8.54	down
PDE4B	8.33	down
HELLS	8.27	down
EFEMP1	8.25	down
RFC3	7.61	down
MND1	7.58	down
MATN3	7.12	down
SKA3	6.91	down
ENC1	6.53	down
MPP2	6.52	down
IGFBP4	6.37	down
WDHD1	6.25	down
RFC3	6.10	down
ZNF385B	5.55	down
PDE8B	5.41	down
DEPDC1B	5.33	down
AURKB	5.31	down
CDK6	3.26	down
GDF11	3.21	down
STARD13	3.18	down
GLS2	3.18	down
ZRANB3	3.13	down
INSIG1	3.04	down
IFIT2	3.02	down
NMT2	2.99	down

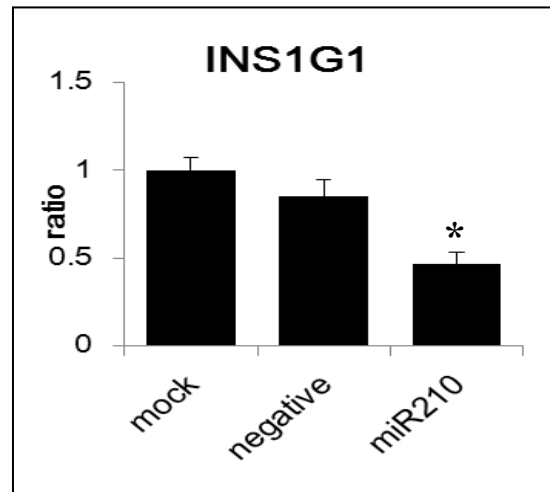
(4) \*p<0.05 vs n(negative control)  
MTS assay



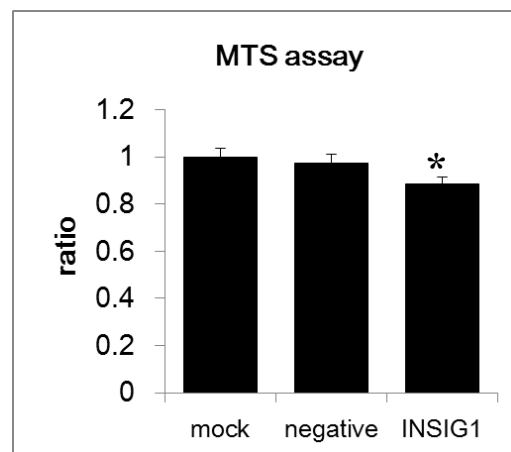
(5) \*p<0.05 vs n(negative control)  
Migration assay



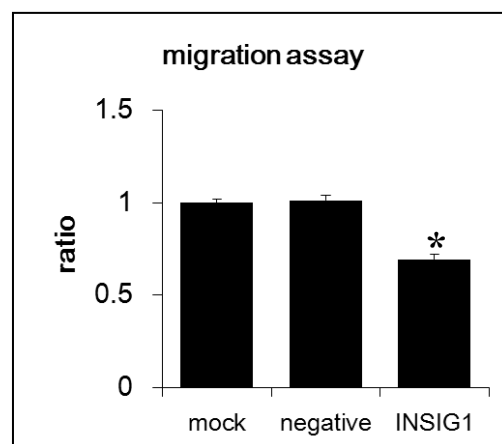
(6) \*p<0.05 vs negative control  
qPCR



(7) \*p<0.05 vs negative control  
MTS assay



(8) \*p<0.05 vs negative control  
Migration assay



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1件)

関根芳岳、古谷洋介、加藤春雄、宮澤慶行、新井誠二、村松和道、新田貴士、小池秀和、松井博、柴田康博、伊藤一人、鈴木和浩、スタチンによるmiRNAを介した前立腺癌増殖制御機構の解明、第28回前立腺シンポジウム、2012.12.08、東京コンファレンスセンター

〔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 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 芳岳 (SEKINE YOSHITAKA)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00516370

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し