

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 23 年 12 月 21 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791798

研究課題名（和文） 前立腺癌の再燃に関わる miRNA の同定とプロテオーム解析による標的分子の探索

研究課題名（英文） Identification of miRNA and its target gene by proteome analysis in hormone refractory prostate cancer

研究代表者

石黒 齊 (ISHIGURO HITOSHI)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・重点研究室光触媒グループ・研究員

研究者番号：00381666

研究成果の概要（和文）：マイクロ RNA (miRNA) は数多くの遺伝子発現制御に関与しており、我々はこれまでに前立腺癌の進展に関与する可能性の高い miRNA 群を同定してきた。本研究ではその中から、miR-30d に注目し、miR-30d が前立腺癌細胞及び前立腺癌組織で高く発現していることを明らかとした。また、miR-30d が高く発現している前立腺癌ほど再発までの期間が短いことから、miR-30d が前立腺癌再発の診断マーカーとなりうることを明らかとした。その標的分子としては SOCS1 を同定し、miR-30d による SOCS1 の発現制御が前立腺癌の進展に大きくかかわっていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：micro RNAs (miRNAs) regulate many genes and therefore their expression abnormality cause various diseases including cancer. Previously, we identified some miRNAs that might be related with prostate cancer progression. In this study, we found that miR-30d expression in cancer cells and tissues is higher than in normal prostate cells and tissues. Further, miR-30d expression was associated with recurrence free survival ratio. Therefore miR-30d might be a prognosis factor for prostate cancer recurrence. We identified that SOCS1 was one of the targets for miR-30d. SOCS1 regulation by miR-30 was related with prostate cancer progression.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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、miRNA、再燃、前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は男性ホルモン依存性の増殖を示す高齢者に多い癌であり、日本ではその罹患率が上昇傾向にある。また、ホルモン療法不応性となった再燃前立腺癌に対する有効な治療法は確立していない。そのため、今後の高齢化社会に向けて再燃前立腺癌をはじめとした前立腺癌の予防方法、早期診断方法や新たな治療方法の開発が急務である。

マイクロ RNA (miRNA) は癌を始めとした

様々な疾患の原因因子となっていることが明らかとなりつつある。miRNA はタンパク質をコードしない低分子 RNA であり、細胞内における役割として標的遺伝子 mRNA の翻訳を阻害することで、標的分子の発現を制御する機能性 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ため、多くのタンパク質が一つの miRNA によ

って発現制御を受けると考えられる。このことから、各種疾患に miRNA ネットワークが重要な機能を持つと示唆される。

我々は、これまでに前立腺癌の進展に関与する可能性の高い miRNA の探索を行い、幾つかの miRNA 群を同定してきた。本研究では miRNA についてより詳細な検討を行い、前立腺癌及び再燃性前立腺癌の発生や進展との関係を明らかとすることについて検討し、新たな治療標的や診断マーカーの探索を目的とした。

2. 研究の目的

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。我々は、これまでに前立腺癌の進展に関与する多くの重要な新規分子の同定とその機能について明らかにしてきた。更に、前立腺癌の発生や進展への関与が疑われる miRNA 群を同定してきた。本研究ではこれまでの研究をさらに進化させて、特に臨床的に重要な課題である再燃性前立腺癌の発生や進展に関与する miRNA 群の同定と詳細な検討をバイオインフォマティクス及びプロテオミクスにより網羅的に検索し、新たな治療標的としての可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1)miR-30d の前立腺細胞株及び前立腺組織検体における発現と臨床像との関連性

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)及び前立腺細胞株における miR-30d 及び標的遺伝子の発現を qPCR によって確認し、更に各臨床像との関連性について検討した。また、標的分子と考えられた SOCS1 については qPCR と共に免疫染色法を用いて検討した。

(2)miR-30d の標的遺伝子の同定及び機能解析

miR-30d の標的遺伝子について TargetScan 5.1 (<http://www.targetscan.org>), PicTar (<http://pictar.org>) 及び miR-Base 13.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk>) の 3 つのデータベースを用いて探索した。得られた結果の中から、すべてのデータベース上で予測された標的分子について qPCR 及び western blot による発現の確認を行った。

機能解析方法としては miR-30d の発現を抑制した細胞株、または miR-30d 及び 3' 非翻訳領域を持つ標的遺伝子を高発現する細胞株を作製し、レポーターアッセイ、MTT assay、invasion assay、western blot を用いて解析

した。

(3)in vivo における腫瘍増殖能の検討

5 週令のヌードマウスに miR-30d の発現を抑制した PC3 及び LNCaP を移植し、PC3 は 36 日経過後、LNCaP は 49 日経過後に腫瘍サイズを測定し、腫瘍を摘出した。摘出したサンプルは qPCR や免疫染色法によって評価した。

4. 研究成果

以前の研究結果から、miR-30d が前立腺癌株で高く発現し、前立腺癌細胞株の増殖に関与する可能性を明らかとしている。そこで、前立腺癌組織における miR-30d の発現について検討し、正常組織と比較して癌組織では miR-30d の発現量が増加していることを明らかとした(図 1a)。更に、臨床像との関連性を検討したところ、miR-30d の発現量が高いほど再発までの期間が短いことを明らかとした(図 1b)。この結果から、miR-30d は前立腺癌の予後マーカーとなりうると考えられた。

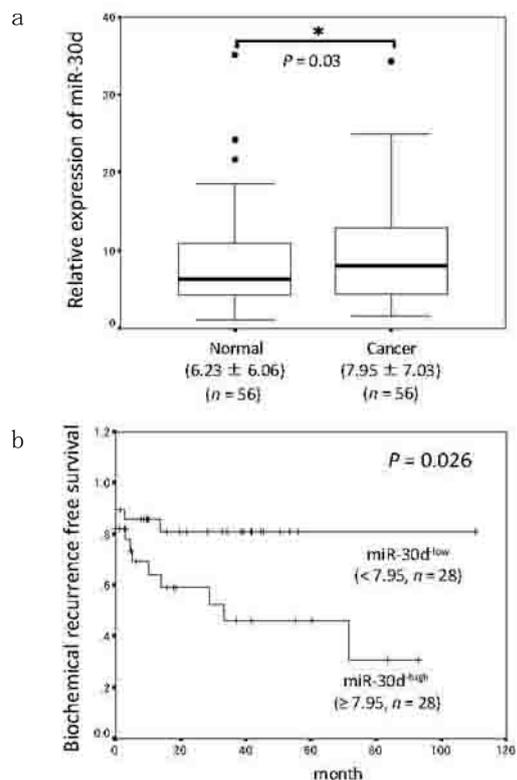


図 1. 前立腺における miR-30d の発現と再発期間の関連性 (a)前立腺組織における発現 (b)前立腺癌の再発期間と miR-30d の発現の関連性

miR-30d の機能解析を行うために、miR-30d 発現を抑制もしくは高発現させた細胞株を作製した。それらの細胞の増殖能と浸潤能について検討した結果、miR-30d の発現を抑制した前立腺癌細胞では、その増殖及び浸潤のどちらも抑制された。また、逆に miR-30d を強く発現させた正常前立腺細胞では細胞増殖及び浸潤能が上昇した(図 2 及び図 3)。これらの結果から、miR-30d は前立腺癌の進展に重要な miRNA であると考えられた。

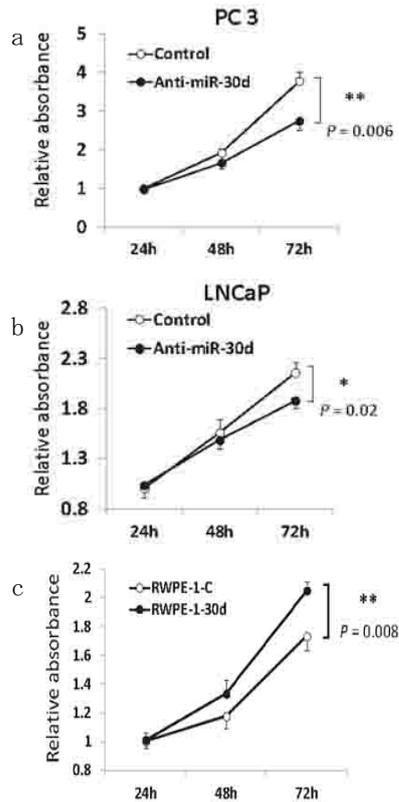


図 2. 前立腺細胞株における miR-30d の細胞増殖への影響. (a) PC3, (b) LNCaP and (c) RWPE-1

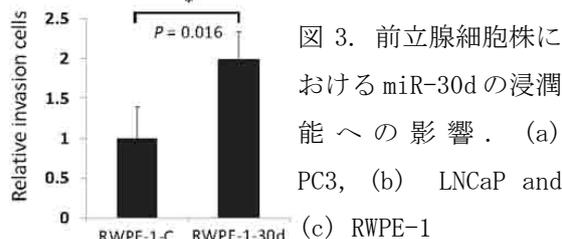
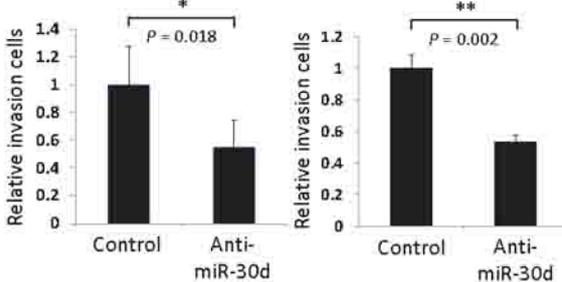


図 3. 前立腺細胞株における miR-30d の浸潤能への影響. (a) PC3, (b) LNCaP and (c) RWPE-1

続いて、miR-30d の標的分子についてプロテオーム解析及びバイオフィヨマティクス的手法によって探索した結果、SOCS1 を標的分子として同定した。そこで、miR-30d の発現を抑制した細胞株における SOCS1 の発現を確認したところ、miR-30d の発現を抑制した細胞株では SOCS1 の発現が上昇した(図 4)。また、SOCS1 の過剰発現が前立腺癌細胞株の浸潤を低下させることを確認した。

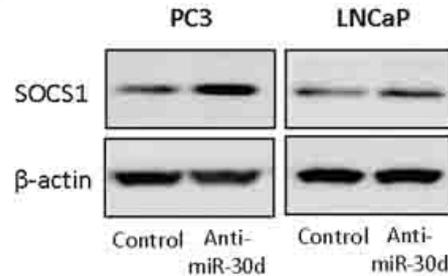


図 4. 前立腺癌細胞株における miR-30d の発現抑制による SOCS1 の発現増加

更に、miR-30d が SOCS1 mRNA 内の 3' 非翻訳領域(3' -UTR)に結合することで SOCS1 の発現を制御していることを確認するために、野生型(SOCS1 3' -UTR WT)及び変異型(SOCS1 3' -UTR Mut)の 3' UTR を持つレポータープラスミドを作製し、miR-30d の過剰発現と組み合わせたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。miR-30d が SOCS1 mRNA の発現量を直接制御することを明らかとした(図 5)。

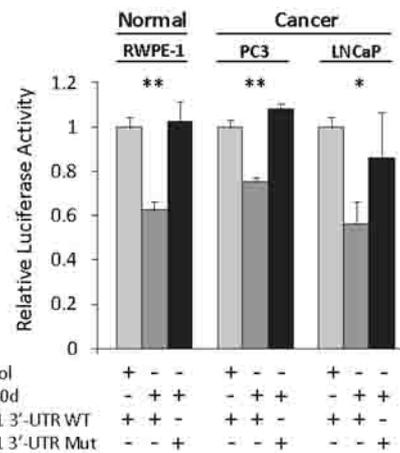


図 5. miR-30d による SOCS1 mRNA の制御.

in vivo における検討においても in vitro と同様であり、miR-30d の発現を抑制した移植モデルで得られた腫瘍はコントロール細胞由来の腫瘍サイズと比較して小さい腫瘍サイズであった。また、得られた腫瘍を用いて SOCS1 を免疫染色したところ、miR-30d を抑制した腫瘍では SOCS1 タンパクが増加していた。また、臨床検体における SOCS1 の発現を検討したところ、miR-30d の発現と逆相関していた。

以上の事から、本研究で miR-30d は前立腺

癌の再発マーカーとなりうること、また SOCS1 を直接制御することで前立腺癌の増殖及び浸潤に関与していると考えられた。

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1件)

1. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. Oncotarget, 3: 1455-1471, 2012. (査読有)
[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=696](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=696)

[学会発表] (計3件)

1. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama N, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Kagoshima, 2013, 2.
2. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama N, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Overexpression of miR-30d modulates cancer progression through the downregulation of SOCS1. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa, 2012, 11
3. 古林直人、上村博司、長濱清隆、奥寺康司、古屋充子、井野洋子、伊藤悠亮、平野久、稲山嘉明、青木一郎、長嶋洋治、窪田吉信、石黒齊. miR-30d promotes prostate cancer progression and associated with early biochemical recurrence. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012, 9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

石黒 齊 (ISHIGURO HITOSHI)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ

ー・重点研究室光触媒グループ・研究員
研究者番号：00381666

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：