

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791636

研究課題名(和文) 癌抑制マイクロRNA 145が制御する前立腺癌における新規分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Tumor-suppressive microRNA-145 regulates molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer

研究代表者

布施 美樹 (Fuse, Miki)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：90568627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌臨床検体に基づくマイクロRNA発現プロファイルを作成し、癌組織において発現抑制されているマイクロRNAを探索した。その結果、ゲノム上でクラスターを形成しているmiR-143およびmiR-145の発現抑制を認めた。miR-143およびmiR-145を前立腺癌細胞株に核酸導入した結果、癌細胞の遊走能・浸潤能の抑制を認めた。更に、これらマイクロRNAが制御する遺伝子を探索した結果、ゴルジ膜タンパク1(GOLM1)がその共通の標的遺伝子である事が示された。GOLM1は前立腺癌臨床検体において高発現しており、その機能解析から遊走・浸潤に関する癌遺伝子機能を有する事が判明した。

研究成果の概要(英文)：Our recent study of microRNA (miRNA) expression signature of prostate cancer (PCa) has revealed that the microRNA-143/145 (miR-143/145) cluster is significantly downregulated in cancer tissues. Restoration of miR-143 or miR-145 in PCa cell lines showed that these miRNAs significantly inhibited cancer cell migration and invasion, this findings suggesting that these clustered miRNAs function as tumor suppressors. Gene expression studies and luciferase reporter assays showed that Golgi membrane 1 (GOLM1) was directly regulated by the miR-143/145 cluster. Silencing of GOLM1 resulted in significant inhibition of cell migration and invasion in PCa cells. Furthermore, the expression of GOLM1 was upregulated in cancer tissues by immunohistochemistry.

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：マイクロRNA 前立腺癌 miR-143 miR-145 癌抑制遺伝子 癌遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は男性の固形癌で罹患率、死亡率ともに高く、その課題の一つは進行癌、中でも既存の治療法に抵抗性となった転移性前立腺癌の治療である。今後新規治療法を開発するためには癌の浸潤・転移のメカニズムの解明が必要と考えられるが、未だその機序は明らかになっていない。

近年、約 22 塩基長の小分子非タンパクコード遺伝子であるマイクロ RNA が注目を集めている。マイクロ RNA は標的とするタンパクコード遺伝子に結合し、翻訳の阻害あるいは mRNA の分解を引き起こすことでその発現を制御する。また、マイクロ RNA と標的遺伝子の結合は部分相補的であるために 1 つのマイクロ RNA が複数の標的遺伝子を制御し、逆に複数のマイクロ RNA が 1 つの標的遺伝子を制御しうることになり、結果としてマイクロ RNA とその標的遺伝子は非常に複雑なネットワークを形成する。マイクロ RNA は癌を含めた様々な疾患に関与すると報告されており、実際に癌において発現異常を示すマイクロ RNA が多数報告されている。我々の研究室ではこれまで様々な癌における癌抑制型マイクロ RNA およびその標的遺伝子を同定してきた。

前立腺癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、それを元にマイクロ RNA-標的遺伝子のネットワークを解明することで、前立腺癌における発癌・浸潤・転移のメカニズムの解明、ひいては新たな治療法の開発にもつながると考えられる。

## 2. 研究の目的

前立腺癌臨床検体を用いた網羅的なマイクロ RNA 発現解析を施行し、前立腺癌において発現変動を認めるマイクロ RNA の探索を行う。癌組織において発現抑制されているマイクロ RNA に着目し、その機能解析から癌抑制型マイクロ RNA を探索する。前立腺癌・癌抑制型マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワークを探索し、本疾患の新規分子メカニズムの一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

前立腺癌臨床検体より total RNA を抽出し、PCR-base array により、778 種類のマイクロ RNA の発現を解析した。そのうち癌抑制機能を有するマイクロ RNA について、ゲノム科学的手法により、その標的遺伝子の探索を行った。候補となった標的遺伝子については、前立腺癌臨床検体における発現、siRNA を用いた機能解析を施行し、前立腺癌における癌遺伝子機能の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 前立腺癌マイクロ RNA 発現プロファイルに基づく癌抑制型マイクロ RNA の探索と機能解析

前立腺癌臨床検体におけるマイクロ RNA 発現プロファイリングから得られた、癌で発現低下を示すマイクロ RNA のうち、既に当研究室で膀胱癌、食道癌など複数の癌種で癌抑制型マイクロ RNA として同定されている miR-145 に着目した。miR-145 は miR-143 と染色体上でクラスターを形成しているが (miR-143/145)、このクラスターは複数の癌種での発現低下が報告されており、癌抑制型マイクロ RNA としての可能性が示唆されている。

RT-PCR による解析を行うと、前立腺癌臨床検体における miR-143、miR-145 の発現レベルは非癌検体に比べ有意に低く (図 1-a, b)、miR-143 と miR-145 の発現量は相関していた (図 1-c)。

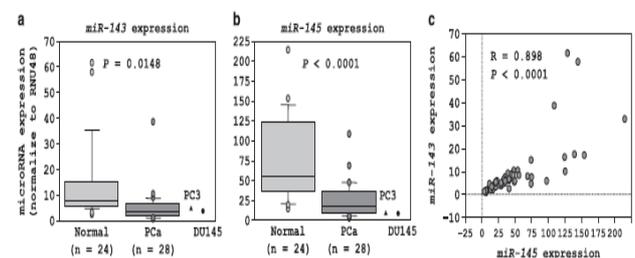


図 1

また、機能解析の結果、これら核酸の前立腺癌細胞株への導入により細胞増殖、遊走、

浸潤能が抑制され、miR-143/145 が癌抑制型マイクロ RNA であることが示された (図 2)。

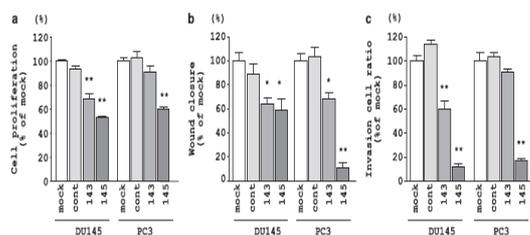


図 2

## (2) 癌抑制型 miR-143/145 の標的遺伝子の探索

miR-143/145 が制御する遺伝子の探索について TargetScan, GEO database, KEGG pathway を用いたゲノム科学的手法にて行ったところ、miR-143/145 の 3' UTR への予測標的配列を有する遺伝子は 1053 個あり、そのうち前立腺癌で発現亢進が確認されているのは 44 個であった。

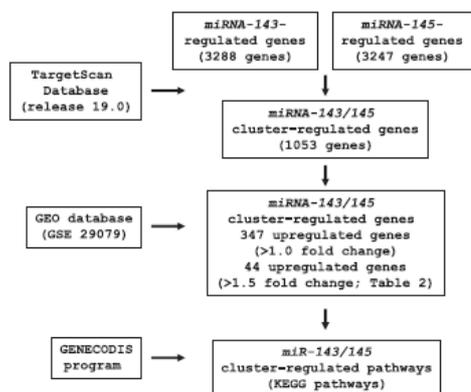


図 3

さらにその中でも癌での発現が最も高かったゴルジ膜タンパク 1 (GOLM1) を標的遺伝子候補として選択した。

前立腺癌細胞株に miR-143 および miR-145 を導入すると GOLM1 の発現が低下した (図 2-a, b) ことからルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GOLM1 は miR-143, miR-145 に直接制御されることが示された。

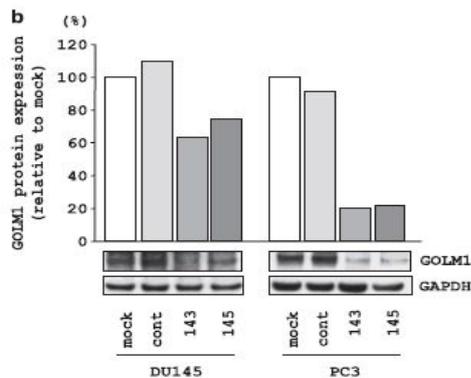
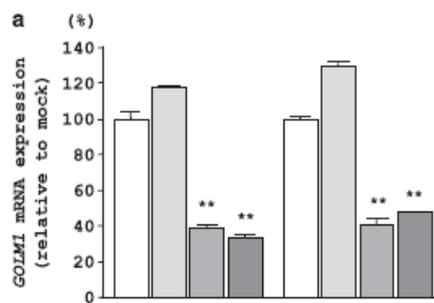


図 4

## (3) miR-143/145 の標的遺伝子 GOLM1 の前立腺癌における発現および機能解析

前立腺癌臨床検体を用いた RT-PCR では、癌組織では非癌組織に比べて GOLM1 の mRNA 発現レベルが有意に高く、Western blot や免疫染色によるタンパク発現解析でも、GOLM1 は前立腺癌臨床検体において高発現していた (図 5)。

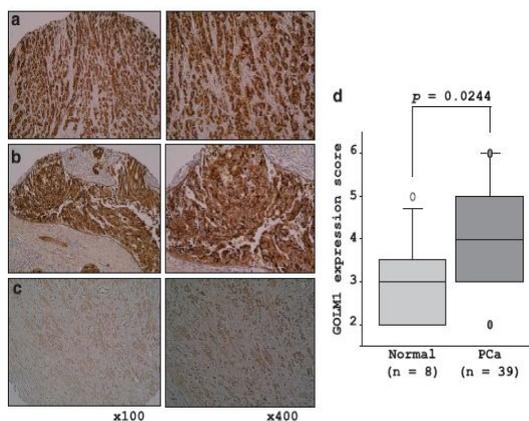


図 5

さらに si-RNA により GOLM1 遺伝子をノックダウンすると、癌細胞株の遊走と浸潤が抑制された (図 6)。

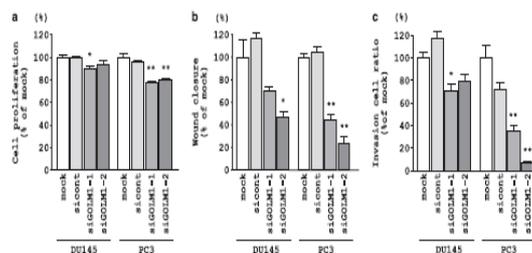


図 6

以上から GOLM1 は前立腺癌において癌遺伝子機能を有することが示された。

GOLM1 は粗面小胞体で合成されたタンパクを加工処理するとともにゴルジ装置を介した輸送に関わる遺伝子であり、ゴルジ装置は細胞遊走に関わる様々なシグナル経路

(Rho-family GTPase, cyclin-dependent kinase など)に関わる分子をゴルジ装置から運び出す、あるいは運び入れることで細胞遊走において重要な役割を果たすことが明らかになってきており、癌の転移への関与も示唆される。GOLM1 は前立腺癌患者の尿中での高値が報告されており、癌の診断ツールとしての可能性が示唆されている。

本研究により、前立腺癌において miR-143/145 クラスターが、癌遺伝子機能をもつ GOLM1 の発現を直接制御することにより癌抑制型マイクロ RNA として機能することが判明した。miR143/145 が制御する新規標的遺伝子の同定により、今後前立腺癌の発生や進行、転移といったメカニズムを解明や新規治療法の開発につながると期待される。

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 4 件)

1. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer.

Nishikawa R, Goto Y, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Sakamoto S, Fuse M, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. *Int J Oncol.* (2014) 45(1):401-10. doi: 10.3892/ijo.2014.2437.

2. Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer.

Goto Y, Nishikawa R, Kojima S, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Kinoshita T, Fuse M, Sakamoto S, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. *FEBS Lett.* 2014 May 21;588(10):1973-82. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.020. Epub 2014 Apr 24.

3. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer.

Kojima S, Enokida H, Yoshino H, Itesako T, Chiyomaru T, Kinoshita T, Fuse M, Nishikawa R, Goto Y, Naya Y, Nakagawa M, Seki N. *J Hum Genet.* (2014) 59(2):78-87. doi: 10.1038/jhg.2013.121.

4. Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma.

Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Tatarano S, Kinoshita T, Fuse M, Kojima S, Nakagawa M, Seki N. *J Hum Genet.* (2013)58(8):508-16. doi: 10.1038/jhg.2013.31.

5. Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer.

Fuse M, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Yoshino H, Nohata N, Kinoshita T, Sakamoto S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. *J Hum Genet.* (2012) 57(11):691-9. doi: 10.1038/jhg.2012.95.

6. Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and

microRNA-133a in bladder cancer.  
Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka  
H, Chiyomaru T, Nohata N, Kinoshita T, Fuse  
M, Seki N, Nakagawa M.  
Int J Oncol. (2012) 40(6):1821-30. doi:  
10.3892/ijo.2012.1391.

〔学会発表〕(計1件)

AACR 103rd Annual Meeting (March, 31-  
April, 4, 2012, Chicago, IL, USA)  
Molecular targets regulated by tumor  
suppressive microRNA-1 and  
microRNA-133a in prostate cancer\_  
Miki Fuse, Satoko Kojima, Takeshi  
Chiyomaru, Hirofumi Yoshino, Nijiro

Nohata, Masayuki Nakagawa, Tomohiko  
Ichikawa, Naohiko Seki

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://genomejet.jp>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
布施 美樹 (MIKI FUSE)  
獨協医科大学排泄機能センター・助教  
研究者番号：9056802