

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293333

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌における機能性RNAネットワークの解明と革新的診断治療シース

研究課題名(英文) Clarification of microRNA functional networks and development of novel tools for diagnosis and treatment of castration-resistant prostate cancer

研究代表者

市川 智彦 (Ichikawa, Tomohiko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20241953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌臨床検体を用いたマイクロRNA発現プロファイルを独自に作成し、癌抑制型マイクロRNAの探索および機能解析を行なった。更に、癌抑制型マイクロRNAが制御する癌遺伝子の探索を行った。miR-221/222, miR-29s, miR-218, miR-224, miR-23b/27b/24, miR-26a/b, miR-205, miR-223が前立腺癌の癌抑制型マイクロRNAである事を証明し、それらが制御する遺伝子について明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We constructed the microRNA (miRNA) expression signature of castration-resistant prostate cancer (CRPC) using clinical specimens, and investigated the functional significance of tumor-suppressive miRNAs. We further investigated oncogenes regulated by the tumor-suppressive miRNAs. We have revealed that miR-221/222, miR-29s, miR-218, miR-224, miR-23b/27b/24, miR-26a/b, miR-205, and miR-223 function as tumor suppressors in prostate cancer. We have also identified the genes regulated by those miRNAs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 癌抑制 転移抑制 去勢抵抗性 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の機序は、アンドロゲン受容体 (AR) の解析とともに明らかとなってきたが、依然 CRPC を克服するには至っていない。近年、19~21 塩基の低分子 RNA である micorRNA (miRNA) が癌の進展・転移・治療抵抗性獲得に関わっている事が報告されている。しかし、前立腺癌、特に CRPC における miRNA の関与は十分に研究されておらず不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) これまでに得られている前立腺癌の miRNA プロファイルに加え、CRPC 剖検組織のプロファイルを独自に作成する。
- (2) CRPC に関与する miRNA やそれが制御する機能性 RNA ネットワーク (蛋白コード遺伝子・蛋白非コード遺伝子) の探索を行う。
- (3) CRPC における機能性 RNA ネットワークの解析から、CRPC 特異的な癌のシグナル経路を明らかにし CRPC の機序や革新的な診断・治療シーズの開発を行う。

3. 研究の方法

- (1) 前立腺癌において発現が低下している miRNA について、癌細胞の増殖・遊走・浸潤の抑制とアポトーシス誘導を指標とした機能スクリーニングを施行して、癌抑制型 miRNA の探索を行う。
- (2) CRPC 剖検検体を用いた miRNA 発現プロファイルを作成し、CRPC 特異的に発現変動する miRNA を抽出する。さらに、CRPC における癌遺伝子型・癌抑制型 miRNA の探索と証明を行う。
- (3) 前立腺癌・非前立腺癌および CRPC などの機能解析で明らかとなった癌遺伝子型・癌抑制型 miRNA について miRNA を基点とした機能性 RNA 分子ネットワークの解析を行い、前立腺癌および CRPC において活性化しているシグナル伝達機構を明らかにする。
- (4) (3) のシグナル伝達経路を遮断する候補治療薬を既存の治療薬から選択し、前立腺癌 Xenograft モデルマウスや CRPC モデルマウスを用いて抗腫瘍効果の有無を検証する。

4. 研究成果

- (1) miRNA-143/145 (miR-143/145) クラスターの解析: miR-143/145 は前立腺癌組織で発現が低下している。PC3 および DU145 前立腺癌細胞株における遊走・浸潤能の解析により、miR-143/145 は Golgi membrane protein 1 (GOLM1) の発現を制御していることを明らかにした。GOLM1 は前立腺癌臨床検体の免疫組織学的解析でその発現が亢進していることから、癌遺伝子として機能していると考えられ、それを抑制する miR-143/145 とともに、前立腺癌の進展や転移の機序の解明や治療への応用の可能性があることを示した。

- (2) miR-224 の解析: 発現抑制を認めた miR-224 をアンドロゲン非依存性癌細胞に核酸導入した結果、癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する事を見出した。このことから、miR-224 は癌抑制機能を有する事が判明した。miR-224 の標的遺伝子として TPD52 を同定した。TPD52 の機能解析を進めた結果、癌細胞の浸潤・遊走を促進する癌遺伝子機能を有していることを明らかにした。

- (3) miR-23b/27b/24-1 クラスターの解析: ヒト染色体の同一部位 (9q22.32) に存在する miR-23b/27b/24-1 クラスターの発現抑制を認めたため、機能解析を施行した。いずれのマイクロ RNA も細胞の遊走・浸潤を抑制する癌抑制型マイクロ RNA である事を証明した。また、miR-27b の発現は、去勢抵抗性前立腺癌に至るまでの期間を予測するマーカーとして有効である事を証明した (図 1)。更に、miR-27b が制御する遺伝子として、これまでに機能が明らかとなっていない GOLM1 を同定し、前立腺癌の新たな癌遺伝子である事を証明した。

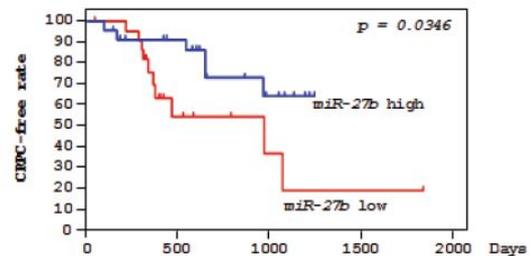


図 1 miR-27b の発現と去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に至るまでの期間 (雑誌論文)

- (4) miR-218 の解析: 転移抑制型マイクロ RNA として選択された miR-218 は、LIM and SH3 protein (LASP1) を直接制御していた。LASP1 は、臨床検体で高発現しており、癌細胞株でノックダウンすると浸潤・遊走を顕著に抑制し、前立腺癌の転移に関わる可能性を示した。
- (5) miRNA-29a/b/c クラスターの解析: miRNA-29a/b/c についても転移抑制型マイクロ RNA であること、標的分子の Laminin C2 (LAMC2) が癌細胞の浸潤・遊走に関わることを明らかにした。
- (6) miR-205 の解析: 発現抑制を認めた miR-205 をアンドロゲン非依存性癌細胞に核酸導入した結果、癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する事を見出した。このことから、miR-205 は癌抑制機能を有する事が判明した。miR-205 の標的分子として centromere protein F を同定した。この標的分子は癌細胞の浸潤・遊走を促進する癌遺伝子機能を有することを明らかにした。
- (7) miR-26a/26b クラスターの解析:

miR-26a/26b の発現抑制を認めたため、機能解析を施行した。いずれも癌細胞の浸潤を抑制する癌抑制型マイクロRNAである事を示した。miR-26a/26b が制御する分子として、La-related protein 1 を同定し、この分子が前立腺癌組織において過剰に発現していることも明らかにした。

(8) miR-221/222 クラスターの解析：去勢抵抗性前立腺癌組織を用いたマイクロRNA発現プロファイルを新規に作成し、発現抑制されているものとしてmiR-221/222 クラスターを同定し機能解析を施行した。いずれも癌細胞の遊走・浸潤を抑制する癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。また、miR-221/222 が制御する分子としてEcm29を同定し、このmRNAや蛋白が前立腺癌組織において過剰に発現していること、さらにCRPCの一部でさらに過剰に発現していることを示した(図2, 3)。

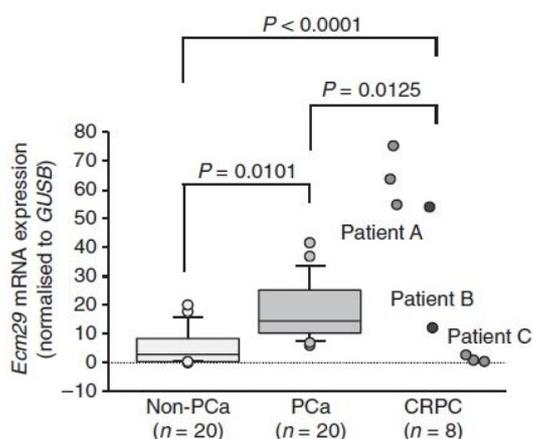


図2 非癌組織ならびに前立腺癌組織におけるEcm29 mRNAの発現(雑誌論文)

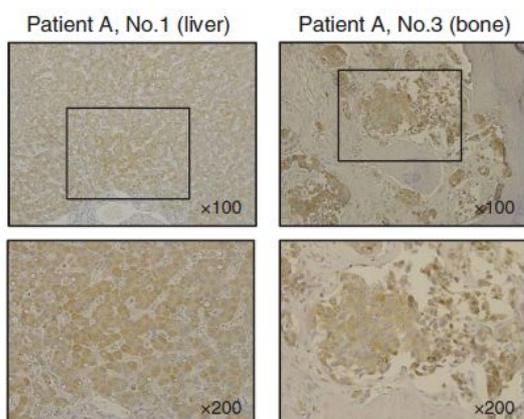


図3 前立腺癌転移組織における抗Ecm29抗体による免疫組織学的所見(雑誌論文)

(9) miR-223 の解析：miR-223 についても癌抑制型マイクロRNAであること、標的分子のITGA3とITGB1が癌細胞の浸潤・遊走に関わることを明らかにした。

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21件)

Kurozumi A, Kato M, Goto Y, Matsushita R, Nishikawa R, Okato A, Fukumoto I, Ichikawa T, Seki N. Regulation of the collagen cross-linking enzymes LOXL2 and PLOD2 by tumor-suppressive microRNA-26a/b in renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2016 May;48(5):1837-46. doi: 10.3892/ijo.2016.3440. 査読有

Xu M, Sakamoto S, Matsushima J, Kimura T, Ueda T, Mizokami A, Kanai Y, Ichikawa T. Upregulation of LAT1 during anti-androgen therapy contribute to progression in prostate cancer cells. *J Urol.* 2016 May;195(5):1588-97. doi: 10.1016/j.juro.2015.11.071. 査読有

Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Fukumoto I, Kato M, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer. *Cancer Sci.* 2016 Jan;107(1):84-94. doi: 10.1111/cas.12842. 査読有

Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, Matsushita R, Yamazaki K, Ishida Y, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer.* 2015 Sep 29;113(7):1055-65. doi: 10.1038/bjc.2015.300. 査読有

Kato M, Goto Y, Matsushita R, Kurozumi A, Fukumoto I, Nishikawa R, Sakamoto S, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA-26a/b directly regulate La-related protein 1 and inhibit cancer cell invasion in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2015 Aug;47(2):710-8. doi: 10.3892/ijo.2015.3043. Epub 2015 Jun 10. PubMed PMID: 26063484. 査読有

Nishikawa R, Goto Y, Kurozumi A, Matsushita R, Enokida H, Kojima S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA-205 inhibits cancer cell migration and invasion via modulation of centromere protein F regulating

pathways in prostate cancer. *Int J Urol*. 2015 Sep;22(9):867-77. doi: 10.1111/iju.12829. 査読有

Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol*. 2015 Mar;22(3):242-52. doi: 10.1111/iju.12700. 査読有

Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7748-59. 査読有

Nishikawa R, Goto Y, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Sakamoto S, Fuse M, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2014 Jul;45(1):401-10. doi: 10.3892/ijo.2014.2437. 査読有

Nishikawa R, Goto Y, Sakamoto S, Chiyomaru T, Enokida H, Kojima S, Kinoshita T, Yamamoto N, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer. *Cancer Sci*. 2014 Jul;105(7):802-11. doi: 10.1111/cas.12441. 査読有

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. Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer. *FEBS Lett*. 2014 May 21;588(10):1973-82. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.020. 査読有

[学会発表](計10件)

Goto Y, Kurozumi A, Nishikawa R, Kato M, Sakamoto S, Kojima S, Naya Y, Enokida H, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Targeting multiple functions of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) signaling by miR-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate

cancer. AUA annual meeting 2015. 2015年5月17日、New Orleans (米国ルイジアナ州)

[その他]
ホームページ等
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/urology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 智彦 (ICHIKAWA TOMOHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20241953

(2) 研究分担者

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

(3) 研究分担者

坂本 信一 (SAKAMOTO SHINICHI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70422235