

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462489

研究課題名(和文) in vivoモデルのmiRNA発現解析に基づく前立腺癌浸潤機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of prostate cancer cell invasion identified by micro-RNA expression with in vivo model.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヌードマウス前立腺癌モデルの解析の結果、PC-3前立腺癌モデルにおいて、癌浸潤の最先端部分であるinvasive frontと腫瘍の非浸潤部の免疫染色による比較において、Invasive frontではリン酸化E-cadherinおよびβ-cateninの発現低下、リン酸化Akt、MMP7および9の発現亢進を認めた。invasive frontと非浸潤部分のmicroRNA発現パターンの解析によりinvasive frontと非浸潤部分において有意に発現が異なるmiRNAを複数同定した。今後機能解析により同定したmiRNAと癌細胞浸潤との関わりを明らかにする必要がある。

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. The LNCaP, PC-3 or DU145 prostate cancer cell was inoculated in nude mouse. The PC-3 reproducibly showed local invasion. Immunohistochemical analysis showed cancer cells in invasive front significantly decreased phosphorylated E-cadherin and beta-catenin, and increased phosphorylated Akt, and MMP-7 and 9. The miRNA expression pattern at the invasive front was different from that of non-invasive part of cancer, several microRNA were identified to be a potential regulator of cancer invasion. Further investigation should be done to answer this principal question.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 浸潤 invasive front マウスモデル microRNA 発現解析

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。臨床的な病理学的悪性度(Gleason score)と病理学的な浸潤の程度(T-stage)は必ずしも相関しせず、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く、癌細胞の浸潤能獲得の機序は分子細胞学的手法が不可欠と考えられる。

(2) 浸潤・転移の一連のプロセスの初期段階において、癌細胞は epithelial-mesenchymal transition (EMT)と呼ばれる脱分化を起こし、遊走・浸潤能の高い表現型を獲得することが知られている。EMT 後の前立腺癌細胞は E-cadherin 発現系から N-cadherin 発現系へと変化する cadherin switch の他に様々な発現の変化や、それに伴う新たな機能を獲得している可能性が極めて高いと考えられるが、その全貌は未だ解明されていない。浸潤能を獲得していない癌細胞と比較して、EMT 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いることが報告されており、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。

(3) 一方、近年 microRNA (miRNA)と呼ばれる遺伝子をコードしない短鎖 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知られている。前立腺癌において miRNA の発現変化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。

(4)以上より、従来の病理学的因子に囚われず、局所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と考えられ、癌の局所浸潤機構を解明するためには浸潤の再先端部である invasive front における癌細胞の microRNA の解析が重要と考えられる。

2. 研究の目的

マウス前立腺癌モデルを用いて、前立腺癌の invasive front における表現系の変化を免疫組織学的に検討する。さらに、miRNA 発現解析に基づいた初期浸潤能獲得に関与する miRNA の同定とその機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス in vivo モデルを用いて、前立腺癌の invasive front と非浸潤部分の免疫染色を行い、表現系の差を検討する。前立腺癌切片の invasive front と非浸潤部分を分け miRNA を抽出し、miRNA microarray にて解析する。発現プロファイルの解析によって、前立腺癌の浸潤に関与する miRNA を同定する。

(1) 前立腺癌細胞 (LNCaP, PC-3, DU145) をそれぞれ Matrigel と混和し 2×10^7 個の細胞を nude mouse 大腿部に移植する。皮下腫瘍径が 10mm の時点で腫瘍を皮膚及び大腿部筋を含む周囲組織と一塊に切除する。組織は無固定にて OCT compound に包埋し、凍結保存する。

(2) 厚さ 10 μ m の連続切片を作成し、HE 染色にて invasive front と非浸潤部分を同定する。

(3) 厚さ 10 μ m の切片を作成し、後固定を行

い、phospho-Akt, phospho-E-cadherin, -catenin 及び MMP7, 9 に対する抗体を用いて蛍光抗体法による免疫染色を行う。免疫染色後の切片を顕微鏡下に観察し、染色の強度を4段階で判定する。

(4) 凍結組織の連続切片をトルイジンブルー染色し、laser capture microdissection (LCM) を用いて顕微鏡下に切り出し、個々のサンプルよりを用いて顕微鏡下に切り出し、RNA 抽出キットを用いて total RNA を抽出する。

(5) miRNA マイクロアレイを行う。キットを用いて Cy3 にてラベルし、ハイブリダイズする。アレイは Agilent 社プローブを用い、洗浄後 confocal スキャナで蛍光シグナルを検出しソフトウェアを用いてその強度を測定する。

(6) マイクロアレイのデータを GeneSpring GX software にてクラスター解析を行い、miRNA 発現パターンによる invasive front、非浸潤部分の分類が可能か否かを解析する。

(7) 異常発現（発現亢進及び発現低下）した miRNA のうち、癌細胞浸潤との関連が示唆される候補 miRNA を同定する。

4. 研究成果

(1) LNCaP、PC-3 及び DU145 前立腺癌細胞のうち、PC-3 が最も再現性の高い腫瘍生着率と高い浸潤傾向を認めた。LNCaP は腫瘍生着率、浸潤傾向共に低く、DU145 は腫瘍生着率は高いものの、浸潤の強さに個体差が大きかった。よって、以後の実験は PC-3 前立腺癌細胞を用いて行った。

(2) PC-3 前立腺癌マウスモデルにおいて、免

疫染色の結果、腫瘍の非浸潤部分と比較して invasive front ではリン酸化 E-cadherin および -catenin の発現低下を認めた。その一方で、invasive front ではリン酸化 Akt, MMP7 および MMP9 の発現が亢進していた。すなわち、PC-3 前立腺癌モデルにおいて、局所浸潤の最先端部分は EMT と考えられる表現型の変化をきたした細胞集団と考えられ、さらに、同細胞集団は MMP の高発現から、高い浸潤能を獲得、維持していることが示唆された。また、phospho-Akt の高発現は、invasive front における癌細胞が生存に促進的に関与する蛋白を合成していることが示唆された。

(3) miRNA マイクロアレイの結果、マウス個体間に若干の発現パターンの差が見られたが、PC-3 前立腺癌の invasive front と非浸潤部分において有意に発現が異なる miRNA を複数同定した。

(4) 現在、浸潤に関与している可能性が高い候補遺伝子の絞り込みと、RT-PCR による発現解析を行っている。さらに今後、浸潤に関与していると考えられる候補 miRNA の機能解析によって、miRNA と前立腺癌細胞の局所浸潤との関わりを明らかにすべく、さらなる検討を行う予定である。

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1件)

Ma L, Sato E, Sato R, Matsubara T, Hirai K, Yamasaki M, Shin T, Shimada T, Nomura T, Mori K, Sumino Y, Mimata H. Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer.

Oncol Rep. 査読あり. Vol.31, No. 6, 2014, pp.
2482-2492. doi: 10.3892/or.2014.3132. PMID:
24718854

〔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

野村 威雄 (NOMURA TAKEO)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：40347034

(3) 連携研究者

なし