

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462424

研究課題名(和文) ヒト前立腺癌に発現する特異性の高いmicroRNAの有用性についての検討

研究課題名(英文) The role of specific microRNAs in human prostate cancer

研究代表者

藤井 智美 (Fujii, Tomomi)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50623477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌においてmicroRNA(miRNA)の発現異常が癌関連遺伝子の発現ネットワークを攪乱し、発癌や進展、転移に深く関与している。今回申請者は前立腺癌細胞におけるmiRNA(miR)-331-3pの役割を検討した。前立腺癌細胞株PC3を用いてmiR-331-3p前駆体を導入すると細胞遊走能が有意に上昇するとともにEMT関連分子のうちvimentin, TGF- $\beta$ , Smad4の発現が増加した。さらにmiR-331-3pの標的候補分子として、NRP2, NACC1を同定し、これらが前立腺癌におけるTGF- $\beta$ , Smad4の発現上昇を介したEMTの活性化に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant expression of miRNAs has been implicated in the progression and metastasis of cancer. The present study aimed to investigate whether miR-331-3p positively affects the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Overexpression of miR-331-3p promoted cell migration and up-regulated mesenchymal markers such as vimentin, N-cadherin, and snail and down-regulated epithelial markers such as E-cadherin and desmoplakin in the prostate cancer cell line PC3. We identified NRP2 and NACC1 as putative target molecules in silico, as they were closely associated with the expression of miR-331-3p and TGF- $\beta$ /Smad 4 signals. MiR-331-3p-mediated miRNA maturation and enhanced EMT via effects on TGF- $\beta$ /Smad 4 are essential for the development of prostate cancer.

研究分野：分子病理学

キーワード：前立腺癌 microRNA 分子診断マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌の早期診断として、血清 prostate specific antigen(PSA)値の測定が有用であるが、前立腺炎や前立腺肥大との鑑別が必要となることがあり、血清 PSA 値と併用可能な前立腺癌特異的な血清あるいは尿中マーカーの開発が急務である。

(2) microRNA(miRNA)は19-25塩基よりなる non-coding short RNA で、配列特異的に標的遺伝子の3'-UTR領域に結合し、翻訳抑制や mRNA の分解など抑制的に機能し、標的遺伝子の発現調節を行っている。特に癌において miRNA は様々な遺伝子発現ネットワークを構成しており、miRNA の発現異常が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現ネットワークを攪乱し、発癌や進展、転移に深く関与することが明らかとなってきた。

(3) 一方、申請者らの研究室では、前立腺癌における miRNA の発現を検討し、アンドロゲン抵抗性前立腺癌細胞において、miR-126,149 が幹細胞関連因子の発現を調節することで細胞増殖に重要な役割を果たしていることを見出した。また、これらの miRNA は前立腺癌の tumor initiating cells に高発現し、アンドロゲン抵抗性の獲得や自己複製能に重要な syndecan-1 の発現に連動していることも明らかにした。

### 2. 研究の目的

(1) アンドロゲン感受性ならびに不応性前立腺癌を用いて、アンドロゲン抵抗性の獲得に関わる miRNA をアレイ解析によって見いだすことと、miRNA の標的分子を推定し、且つアンドロゲン受容体やエストロゲン受容体の発現を制御する分子を絞り込む。

(2) miRNA およびその標的分子が前立腺癌組織においてどの程度発現を認めるかを *in situ* hybridization(ISH)法ならびに免疫組織化学的染色により検討し、Gleason 分類による組織診断および治療後の再発症例における発現変化について検討する。今回、予測した miRNA や標的分子の発現がいずれも ISH 法や免疫組織化学的染色により検出できない場合や有意な相関関係が得られない場合、パラフィン包埋組織を用いたリアルタイム RT-PCR 法による発現解析や標的分子の絞り込みを再検討する。

(3) 前立腺癌組織における発現と癌の組織学的分化度やアンドロゲン抵抗性獲得による再発と相関性を有する miRNA ならびにその標的分子が前立腺癌の分子標的となり得るかどうかを検証するため、癌細胞ターゲットングシステムの機序を分子生物学的に明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) アンドロゲン抵抗性前立腺癌細胞株

に、miR-331-3p 前駆体を導入し、細胞増殖、細胞遊走能について各々 MTS assay, wound healing assay を行って評価した。

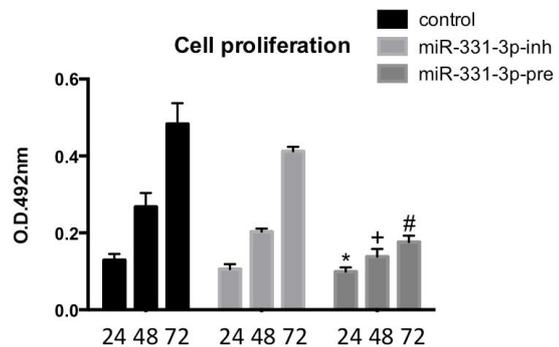
細胞遊走に関わる分子として、EMT 関連分子 (E-cadherin, vimentin, desmoplakin, Smad3/4, TGF- $\beta$  の mRNA 発現を qRT-PCR 法で検討した。

(2) MiR-331-3p の推定標的分子を 3 種類のデータベースを用いて *in silico* で検索し、レポーターアッセイにて NRP2, NACC1 が miR-331-3p の標的分子であることを確認した。

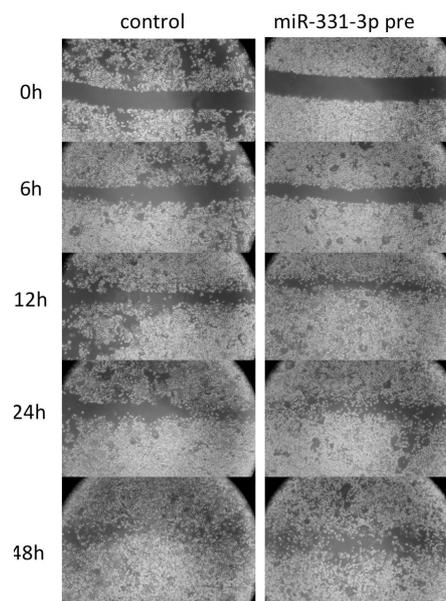
(3) miR-331-3p が前立腺癌組織においてどの程度発現を認めるかを、Gleason 分類による組織診断を行った症例について *in situ* hybridization(ISH)法により検討した。

### 4. 研究成果

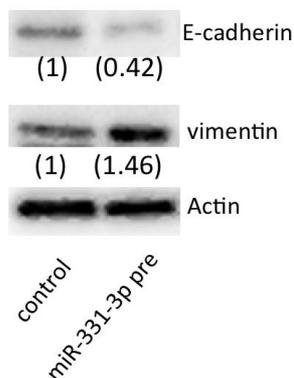
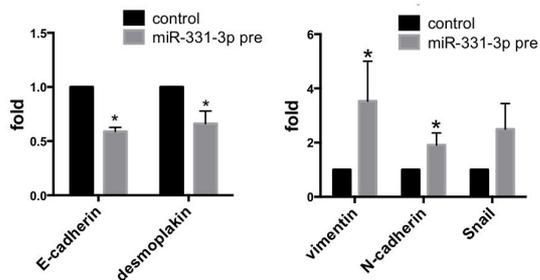
(1) 前立腺癌細胞 PC3 に miR-331-3p 前駆体を導入し、miR-331-3p を過剰発現させると、前立腺癌の細胞増殖は有意に抑制された。



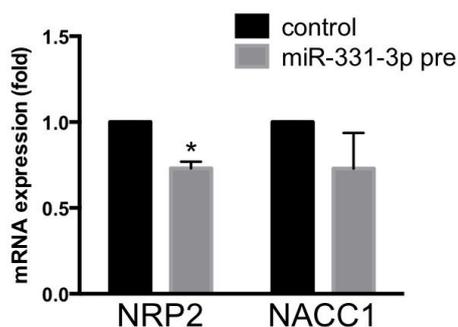
(2) miR-331-3p を過剰発現したところ、wound healing assay では細胞の遊走が有意に促進された。



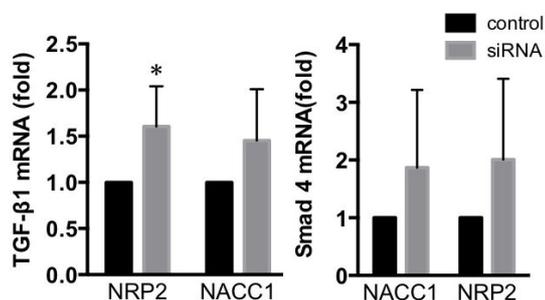
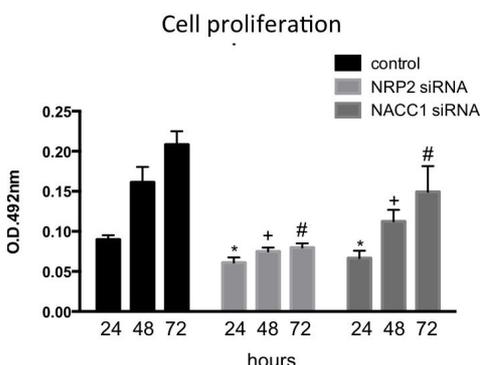
この結果を踏まえ、EMT 関連分子の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて検討したところ、間葉系マーカーの発現上昇と上皮系マーカーの発現低下を認めた。タンパク発現でも同様の結果が得られた。



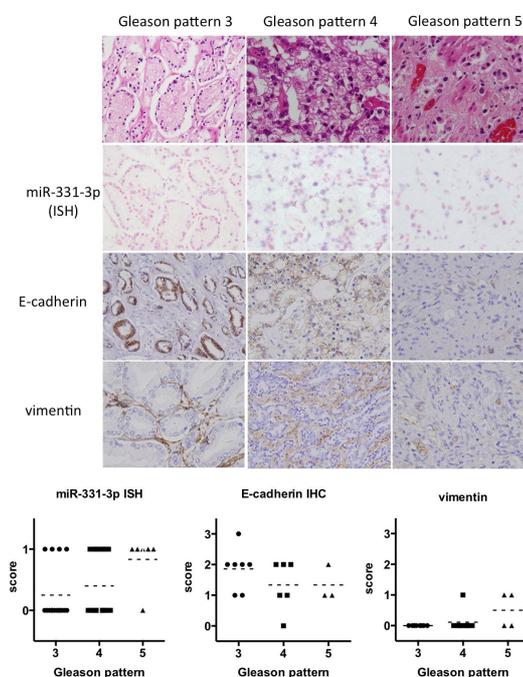
(3) miR-331-3p の推定標的分子を TargetScan, microRNA.org and RNAhybrid 2.2 により in silico で検索し、候補分子について miR-331-3p 過剰発現下で抑制される分子 NRP2, NACC1 が見出された。



NRP2, NACC1 を抑制すると miR-331-3p の過剰発現と同様に細胞増殖が抑制され、TGF- $\beta$  や Smad 4 の発現が有意に上昇した。



(4) 前立腺癌組織を用いて、miR-331-3p の in situ hybridization, E-cadherin, vimentin の免疫組織化学染色を行い、miR-331-3p, E-cadherin, vimentin の発現ならびに Gleason score との関連性を調べたところ、低分化の癌ほど vimentin, miR-331-3p の発現が高く、E-cadherin の発現は低いことが示唆された。



以上より、前立腺癌細胞では miR-331-3p が細胞増殖抑制とともに TGF- $\beta$  や Smad4 を介した EMT 促進に重要な役割を果たし、前立腺癌組織においては低分化型腺癌において発現上昇を認めることが明らかとなった。このことから、miR-331-3p が前立腺癌細胞の浸潤増殖に重要な key factor であるとともに、miR-331-3p ならびに標的分子が前立腺癌の分化度を含めた組織学的診断マーカーとなり得ることが示唆された。

## 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6件)

Tomomi Fujii, Keiji Shimada, Yoshihiro Tatsumi, Kiyohide Fujimoto, Noboru Konishi

Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer

Biochem Biophys Res Commun. 456(1), 183-9, 2015.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.056.

Tomomi Fujii, Keiji Shimada, Yoshihiro Tatsumi, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto, Noboru Konishi

Syndecan-1 up-regulates microRNA-331-3p and mediates epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer.

Mol Carcinog. 55(9):1378-1386, 2016.

doi: 10.1002/mc.22381

Tomomi Fujii, Keiji Shimada, Yoshihiro Tatsumi, Kinta Hatakeyama, Chiho Obayashi, Kiyohide Fujimoto, Noboru Konishi

microRNA-145 promotes differentiation in human urothelial carcinoma through down-regulation of syndecan-1

BMC Cancer.2015, 15:818,

doi: 10.1186/s12885-015-1846-0

Keiji Shimada, Tomomi Fujii, Yoshihiro Tatsumi, Satoshi Anai, Kiyohide Fujimoto, Noboru Konishi

Ubiquilin2 as a novel marker for detection of urothelial carcinoma cells in urine.

Diagn Cytopathol. 44(1):3-9, 2016

doi: 10.1002/dc.23332

Tomomi Fujii, Aya Asano, Keiji Shimada, Yoshihiro Tatsumi, Chiho Obayashi, Noboru Konishi

Evaluation of RNA and DNA extraction from liquid-based cytology specimens

Diagn Cytopathol.44(10):833-840, 2016

doi: 10.1002/mc.22381

Tomomi Fujii, Keiji Shimada, Aya Asano, Yoshihiro Tatsumi, Naoko Yamaguchi, Masaharu Yamazaki, Noboru Konishi

MicroRNA-331-3p Suppresses Cervical Cancer Cell Proliferation and E6/E7 Expression by Targeting NRP2

Int. J. Mol. Sci. 2016, 17(8), 1351;

doi:10.3390/ijms17081351

{学会発表}(計 5件)

Tomomi Fujii, Yoshihiro Tatsumi, Noboru Konishi

Syndecan-1 up-regulates microRNA-331-3p and mediates epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer

8th Euro Global Summit on Cancer Therapy, 2015

Tomomi Fujii, Yoshihiro Tatsumi, Kiyohide Fujimoto, Noboru Konishi,

MicroRNA-145 promotes differentiation in human urothelial carcinoma through down-regulation of syndecan-1

31th Annual European Association of Urology, No.797, 2016

藤井智美、島田啓司、辰巳佳弘、畠山金太、大林千穂、藤本清秀、小西 登

ヒト尿路上皮癌における syndecan-1 の発現制御を介した microRNA-145 の役割

第 105 回日本病理学会総会、2016 年、演題番号 2-H-21

藤井智美、島田啓司、小西 登

液状化検体細胞診(LBC)における RNA および DNA 検出効率の検討

第 57 回日本臨床細胞学会総会(春期大会)、2016 年、演題番号 P-2-40

Tomomi Fujii, Yoshihiro Tatsumi, Noboru Konishi

microRNA-331-3p inhibits cell proliferation and E7 expression by targeting NRP2 in cervical cancer

European Society for Medical Oncology (ESMO) congress 2016, No.22P, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 智美 (FUJII, Tomomi)

奈良県立医科大学・病理病態学講座・講師

研究者番号：50623477

### (2)研究分担者

小西 登 (KONISHI, Noboru)

奈良県立医科大学・病理病態学講座・教授

研究者番号：20145832