

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861280

研究課題名(和文) 前立腺癌のアンドロゲン非依存性増殖における新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel molecular mechanisms in androgen independent growth of prostate cancer

研究代表者

古林 直人 (KOBAYASHI, Naohito)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：20420680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CRPCモデル細胞株であるLNCaP-AIを用いたmiRNAマイクロアレイ解析の結果、親株であるLNCaPに比較してLNCaP-AIにおいて発現増加が認められた複数のmiRNAを同定した。これらのmiRNAを臨床検体における発現量を定量したところ、miR-30dがCRPC症例において増加していることを見出した。また、LNCaPにmiR-30dを強制発現させたところPSAプロモーターが活性化し、PSAの発現が増加することを明らかにした。さらに、この細胞をアンドロゲン除去環境下において培養すると、ARの発現が増加し、コントロールに比較して細胞生存率が有意に増加することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We are interested in molecular mechanisms involved in the progression of castration-resistant prostate cancer (CRPC). We found significantly higher expression of miR-30d in the androgen-independent LNCaP-AI cell line compared with the androgen-dependent LNCaP cell line using miRNA microarrays and qPCR. Clinicopathological study revealed that miR-30d expression levels were significantly higher in bone metastatic CRPC tissue than in untreated primary prostate cancer tissue. To evaluate the biological functions of miR-30d during the progression of CRPC, we determined whether miR-30d overexpressing cell lines grew well without androgen, and thus manifest growth characteristics of CRPC. As shown by the cell proliferation assay, LNCaP-30d cell lines were able to grow in an androgen-indepleted medium, while the control cell (LNCaP-C) grew poorly in the absence of androgen. Taken together, we found that miR-30d promotes prostate cancer cell proliferation in an androgen-indepleted.

研究分野：泌尿器病態学

キーワード：前立腺癌 miRNA CRPC

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療・管理は、今後超高齢化社会を迎える日本において高齢者の健康を保つ上で大きな問題の一つである。前立腺癌は、高齢男性において特に発症頻度が高い癌の一つであり、罹患、死亡率は急激に増加しており、2020年には肺癌に次ぐ罹患率になることが予測されている。米国では既に男性の癌の第一位を占めており、日本においても、今後の高齢化社会における男性の健康管理上大きな問題となることが憂慮される。前立腺癌の80-90%はアンドロゲン依存性増殖を示すため、進行癌ではアンドロゲン除去療法を中心としたホルモン療法が最も有効な治療法の一つである。しかしながら、多くの前立腺癌では、ホルモン療法後の数年でアンドロゲン非依存性増殖を示すようになり、ホルモン療法に反応しなくなる。こうした状態は“去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC)”と定義され、臨床的に最も憂慮すべき問題点である。現在、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) に対する有効な治療法は限られており、これらの治療法も長くは奏効しないことから、CRPC 発生機序に基づく新たな治療法の確立が待たれる。我々は、これまで miRNA に着目し、新たな分子標的治療法およびバイオマーカーの確立を目指して、前立腺癌における miRNA の探索とそれら miRNA による癌の進展機序の解明を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、アンドロゲン除去環境における miRNA の発現および機能を網羅的に解析し、CRPC における Key molecule となる miRNA を同定するとともに、miRNA を中心とした新たな CRPC 発症メカニズムを解明し、有効な補助療法確立にむけた病態解明を行った。これまでの CRPC における miRNA 解析は、その多くが AR の発現調節に関わる miRNA の同定が主流であった。これは、AR signal が CRPC の病態発生に深く関わっていることに基づいている。しかし、AR は様々な補調節因子蛋白質と多くの相互作用によってその発現量が調節されており、AR を直接的に制御する miRNA を同定しただけでは、CRPC の分子メカニズム解明には不十分であると考えられる。また、CRPC 発症には細胞周期やアポトーシスに関わる分子も大きく関わっていることが予測される。そこで、本研究では、CRPC モデル細胞株 LNCaP-AI を用いた miRNA の網羅的解析を行うとともに、LNCaP におけるアンドロゲン除去下での機能解析を行うことによって、miRNA を中心とするより詳細な CRPC 発生の分子基盤解明を試みるものである。

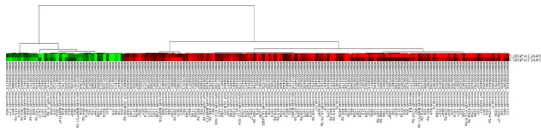
### 3. 研究の方法

前立腺癌細胞株 LNCaP と横浜市立大学において樹立した CRPC モデル細胞株 LNCaP-AI を用いて miRNA マイクロアレイ解析を行い、LNCaP-AI 細胞株において発現異常を呈する miRNA の網羅的解析を行った。また、横浜市立大学附属病院において摘出され、医学研究倫理委員会の承認を得た原発性前立腺癌組織 (n = 56) と同一患者から得られた良性前立腺肥大を含む正常前立腺組織 (n = 56)、並びに CRPC 骨転移組織 (n = 7) を使用し、miRNA の発現を real-time RT-PCR によって定量的に解析した。CRPC 症例において発現異常の認められた miRNA の発現 vector を LNCaP に遺伝子導入し、アンドロゲン除去培養液中で培養し、増殖能ならびに AR signal 関連タンパクの発現についてウエスタンブロットング並びにレポータージーンアッセイによって解析し、アンドロゲン除去環境下における機能性 miRNAs を同定した。また、AR や PSA のタンパク量を定量するとともに、低アンドロゲン環境下での増殖能の測定を行った。さらに、Luciferase reporter assay やウエスタンブロットング法を用いて標的分子の同定を行った。

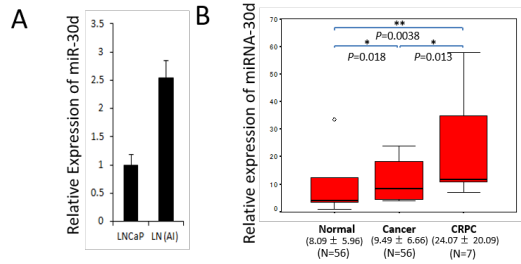
### 4. 研究成果

miRNA マイクロアレイ解析の結果、LNCaP-AI において発現増加が認められた複数の miRNA を同定した (図 1)。これら発現異常の認められる miRNA の臨床検体における発現量を定量したところ、miR-30d が CRPC 症例において増加していることを見出した (図 2)。また、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株である LNCaP に miR-30d を強制発現させて作製した LN-30d 細胞では、PSA プロモーターが活性化し、PSA の発現が増加することを明らかにした (図 3)。さらに、LN-30d をアンドロゲン除去環境下において培養すると、AR の発現が増加し、コントロールに比較して細胞生存率が有意に増加することを明らかにした (図 4)。また、miR-30d の標的分子候補の解析から、AR の co-repressor である NCoR2 が miR-30d の標的分子の一つであることを同定し、miR-30d の発現増加によって NCoR2 の発現が抑制されることを見出した。

我々は、CRPC 症例で発現が増加している miR-30d を同定し、miR-30d がアンドロゲン除去環境下における前立腺癌の増殖進展に深く関わっていることを明らかにした (図 5)。今後、miR-30d を標的とした CRPC 特異的な分子標的としての可能性が示唆された。

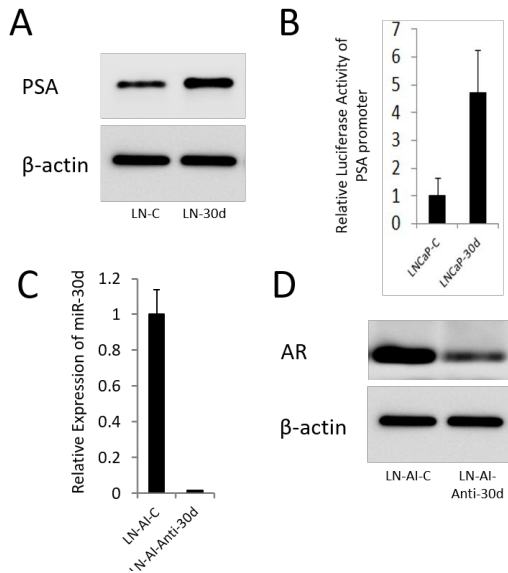


**図 1 miRNA マイクロアレイの結果**  
LNCaP と LNCaP-AI を使って miRNA の発現解析を行った。



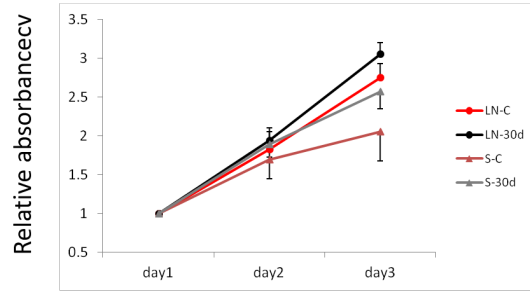
**図 2 前立腺癌細胞株ならびに臨床検体における qPCR を用いた miR-30d の発現解析**

A、LNCaP-AI では LNCaP に比較して miR-30d の発現が有意に増加していた。B、臨床検体においても、CRPC 症例において miR-30d の発現が明らかに増加していた。



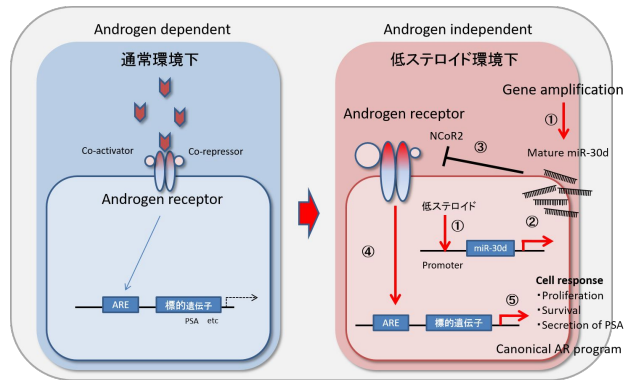
**図 3 miR-30d による PSA ならびに AR タンパクの発現**

A、B、miR-30d の発現を増加によって、PSA プロモーターが活性化し PSA タンパクの発現が増加する。C、D、miR-30d の発現を低下させると AR タンパクの発現が低下する。



**図 4 アンドロゲン除去環境下における細胞増殖**

miR-30d を高発現させた細胞群では、アンドロゲン除去環境下でも細胞生存率が有意に増加した。



**図 5 CRPC における miR-30d の機能**  
低アンドロゲン環境下では miR-30d の発現が亢進し、PSA の産生増加や細胞増殖、細胞生存率に深く関わっている

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2件)

Kawahara T, Fukui S, Sakamaki K, Ito Y, Ito H, Kobayashi N, Izumi K, Yokomizo Y, Miyoshi Y, Makiyama K, Nakaigawa N, Yamanaka T, Yao M, Miyamoto H, Uemura H. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts prostatic carcinoma in men undergoing needle biopsy. *Oncotarget*. 2015;6(31):32169-76 査読有  
DOI: 10.18632/oncotarget.5081.

Ito Y, Ishiguro H, Kobayashi N, Hasumi H, Watanabe M, Yao M, Uemura H. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*. 2015 ;75(10):1009-19. 査読有  
DOI: 10.1002/pros.22972.

〔学会発表〕(計1件)

古林直人, 伊藤悠亮, 石黒齊, 長濱清隆, 高橋智, 矢尾正祐, 上村博司. 去勢抵抗性前立腺癌における miRNA の機能解析. 第31回前立腺癌シンポジウム 2015年12月12日 東京コンファレンスセンター(東京都、品川区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
該当なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者

古林 直人 (KOBAYASHI Naohito)  
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授  
研究者番号：20420680

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )