

〔第八回千葉医学会奨励賞〕

## 治療抵抗性前立腺癌における 機能性RNA分子ネットワークの解明

五 島 悠 介

### 要 旨

治療抵抗性を獲得した前立腺癌患者に対する有効な治療法は無く、局所再発・全身転移により死に至る。本研究では、新たな治療法を模索するため、治療抵抗性前立腺癌で活性化している分子経路を明らかにする事を目的とした。そのために、治療抵抗性前立腺癌における機能性RNA発現プロファイルを作成し、マイクロRNAを起点とした分子ネットワークの探索を行った。さらに、これまで未知であった、前立腺癌細胞の遊走・浸潤の原因となる分子経路の一端を明らかにした。

**Key words:** castration-resistant prostate cancer, microRNA, tumor-suppressive microRNA

### I. はじめに

前立腺癌は欧米で罹患率1位、死亡率2位の癌であり、近年本邦においても急激に罹患率、死亡率ともに上昇している癌である。食生活の欧米化・高齢化に伴い、2020年には、国内の前立腺癌患者数は全癌種のうち肺癌に次いで罹患率2位になる事が予測されている。当初、前立腺癌は男性ホルモンに依存して増殖するため、男性ホルモンを遮断するホルモン遮断療法により治療効果が望める。しかし、いずれ治療に対する耐性機構を獲得し、血清テストステロン低値でも病状の進展を認める、去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) と呼ばれる状態となる。CRPCの予後改善のため、タキサン系抗がん剤や新規ホルモン剤などが次々に開発されているが、いずれの治療も予後延長効果は限定的で、最終的には様々な治療に抵抗性となる。このような治療抵抗性CRPCの検体入手は困難であることより、ゲノム科学的な解析は進んでいない。

ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒトゲノム中には蛋白をコードしない機能性RNA分子が多数存在し、実際に転写されている事が判明した。その中で、マイクロRNAに分類されるRNA分子は、ヒトゲノム中に存在する内在性遺伝子であり、僅か19~22塩基の1本鎖RNAとして機能する。1種類のマイクロRNAが数多くの蛋白コード遺伝子を制御する事から、その発現異常が癌を含む、多くの疾患に関与している事が示されている。特に、癌においては①癌組織で非癌組織と比較して発現が低下し、標的遺伝子である癌遺伝子を制御できなくなり、癌の進展に寄与するという癌抑制型マイクロRNA、そして②癌組織で非癌組織と比較して発現が亢進し、標的遺伝子である癌抑制遺伝子を制御することで癌の進展に寄与するという癌促進型マイクロRNAの2種類が、癌の進展に大きく関与することが近年多数報告されている(図1, [1]より改変)。

我々研究グループでは、国内で逸早くマイクロRNAに着目し、様々な癌種におけるマイクロ

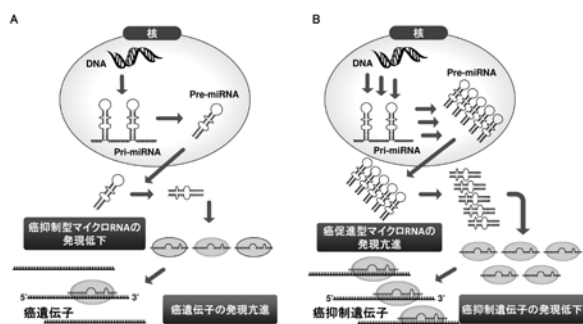


図1 癌におけるマイクロRNA

癌においては、マイクロRNAは癌抑制型マイクロRNAと癌促進型マイクロRNAに分類される。(A) 癌抑制型マイクロRNA。癌で発現低下しており、結果として癌遺伝子を制御できず、癌進展の方向に向かわせる。(B) 癌促進型マイクロRNA。癌で発現亢進しており、癌抑制遺伝子を制御することで、癌進展の方向に向かわせる。文献[1]より改変。

RNA解析を行ってきた。癌細胞で特異的に活性化している分子経路が探索できれば、その経路を遮断する事で癌の増殖や転移を抑制する事が可能となる。本研究では、治療抵抗性前立腺癌臨床検体に対して、網羅的RNA解析を行なう事で、その分子機序を解明することを目的とした。

## II. 未治療前立腺癌・治療抵抗性前立腺癌におけるマイクロRNA発現プロファイルの作成

我々の研究グループは、前立腺癌で発現異常を示すマイクロRNAを見出すため、2012年に未治療前立腺癌検体を用いて、PCRアレイベースで網羅的解析を行ない、マイクロRNA発現プロファイルを作成した(表1, [2]より改変)。このプロファイルは、非癌前立腺組織と前立腺癌組織を比較して、前立腺癌において有意に発現抑制されているマイクロRNAを示したものである。これら発現抑制されているマイクロRNAの中に「前立腺癌・癌抑制型マイクロRNA」が存在すると仮定して解析を行なった。前立腺癌の癌細胞株に、発現抑制が認められたマイクロRNAを核酸導入し、細胞の増殖・アポトーシス・浸潤・遊走を指標とした機能解析を施行した。その結果、*microRNA-23b/27b/24-1*, *microRNA-224/452*, *microRNA-223*, *microRNA-320a*, *microRNA-26a/26b*などが前立腺癌遊走・浸潤を抑制する癌抑制型マイクロRNAであることが判明した[3-7]。

表1 前立腺癌におけるマイクロRNA発現プロファイル

非癌組織と比較して前立腺癌で発現が低下するマイクロRNA。これらが前立腺癌における癌抑制型マイクロRNAの候補となる。文献[2]より改変。

microRNA	Log <sub>2</sub> ratio (癌/非癌)	前立腺非癌組織 における発現	未治療前立腺癌 における発現	P-value
<i>miR-187</i>	-4.78	1.835	0.067	8.16E-03
<i>miR-205</i>	-4.72	13.311	0.504	6.56E-03
<i>miR-222</i>	-3.88	547.451	37.090	5.31E-03
<i>miR-31</i>	-3.55	24.270	2.075	4.74E-03
<i>miR-133a</i>	-3.5	65.008	5.739	3.10E-02
<i>miR-224</i>	-3.17	1.464	0.163	1.30E-02
<i>miR-196b</i>	-2.95	10.595	1.367	3.28E-02
<i>miR-455-5p</i>	-2.94	1.894	0.246	6.24E-03
<i>miR-30a*</i>	-2.71	39.956	6.107	2.00E-02
<i>miR-139-5p</i>	-2.7	15.533	2.385	7.51E-03
<i>miR-221</i>	-2.67	8.681	1.364	2.26E-02
<i>miR-30e*</i>	-2.64	28.765	4.606	1.28E-02
<i>miR-574-3p</i>	-2.48	128.315	22.962	3.78E-02
<i>miR-133b</i>	-2.48	1.547	0.277	8.42E-04
<i>miR-409-3p</i>	-2.3	4.044	0.822	1.53E-02
<i>miR-411</i>	-2.29	1.080	0.221	7.45E-03
<i>miR-320</i>	-2.24	89.062	18.840	2.19E-02
<i>miR-125a-5p</i>	-2.23	9.848	2.096	3.58E-02
<i>miR-28-3p</i>	-2.23	31.722	6.773	3.86E-03
<i>miR-409-3p</i>	-2.21	3.551	0.765	1.84E-03

表2 治療抵抗性前立腺癌におけるマイクロRNA発現プロファイル

非癌組織と比較して治療抵抗性前立腺癌で発現が低下するマイクロRNA。文献[8]より改変。

microRNA	Log <sub>2</sub> ratio (抵抗癌/非癌)	前立腺非癌組織 における発現	治療抵抗性前立腺癌 における発現	P-value
miR-205	-11.34	3.18.E-03	1.23.E-06	4.01E-02
miR-378	-11.15	3.36.E-03	1.48.E-06	4.85E-02
miR-222	-8.4	1.11.E-01	3.29.E-04	1.61E-02
miR-143	-8.34	5.56.E-02	1.72.E-04	4.65E-02
miR-133a	-7.7	1.22.E-02	5.85.E-05	2.03E-02
miR-23b	-6.5	1.03.E-03	1.14.E-05	2.76E-02
miR-345	-6.45	2.66.E-03	3.04.E-05	2.64E-02
miR-150	-6.25	9.45.E-03	1.24.E-04	8.40E-03
miR-139-5p	-6.22	2.99.E-03	4.02.E-05	7.50E-03
miR-221	-6.21	2.08.E-03	2.82.E-05	3.55E-02
miR-484	-5.68	1.54.E-02	3.00.E-04	1.44E-02
miR-29c	-5.55	1.46.E-02	3.12.E-04	4.47E-02
miR-28-3p	-5.44	6.72.E-03	1.55.E-04	2.62E-02
miR-27b	-5.28	1.34.E-03	3.44.E-05	3.62E-02
miR-320	-5.26	1.83.E-02	4.78.E-04	3.82E-02
miR-30a*	-5.21	7.30.E-03	1.97.E-04	4.80E-03
miR-532-3p	-5.21	1.13.E-03	3.05.E-05	4.15E-02
miR-574-3p	-5.15	2.29.E-02	6.44.E-04	4.80E-03
miR-30e*	-5.13	5.53.E-03	1.58.E-04	1.05E-02
miR-24	-5.06	1.44.E-01	4.31.E-03	2.15E-02

さらに、患者および家族の同意のもと、数年をかけて、治療抵抗性前立腺癌剖検検体（3症例）からRNAを得る機会を得た。これら臨床検体を用いて、未治療前立腺癌と同様に網羅的解析を行ない、マイクロRNA発現プロファイルを作成した（表2, [8]より改変）。治療抵抗性前立腺癌において、非癌と比較して発現が有意に低下するマイクロRNAは42個認められた（表2には上位20個を記載）。これらは治療抵抗性前立腺癌において発現が低下するマイクロRNA、すなわち、治療抵抗性前立腺癌における癌抑制型マイクロRNAの候補となる。このプロファイルの内容を確認すると、未治療前立腺癌のプロファイルにも含まれ、前立腺癌における癌抑制型マイクロRNAとして証明してきたマイクロRNAが多数含まれていることが分かった[3,6,9]。よって、このプロファイルは信頼性の高いものと考えられた。

このうち、ゲノム上で近接して存在する、すなわちクラスターを形成するマイクロRNAに着目した。このプロファイルには3つのクラスターマイクロRNAが含まれるが、このうち、microRNA-221/222クラスターについて、機能

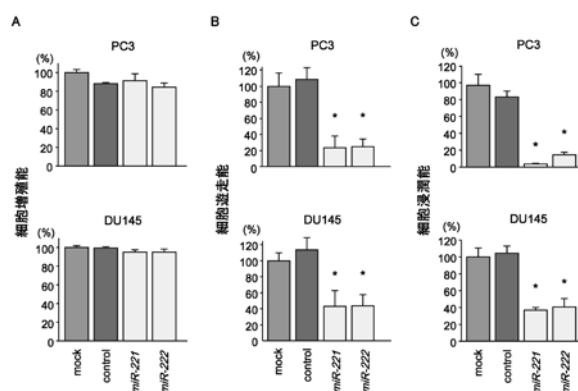


図2 microRNA-221/222は前立腺癌細胞の遊走と浸潤を抑制する

前立腺癌細胞株PC3, DU145にmiR-221とmiR-222をそれぞれ核酸導入すると、癌細胞の遊走と浸潤を有意に抑制する。これにより、前立腺癌では、miR-221/222はいずれも癌抑制型マイクロRNAとして機能していることがわかる。(A)細胞増殖アッセイ, (B)細胞遊走アッセイ, (C)細胞浸潤アッセイ。文献[8]より改変。

解析を施行したところ、前立腺癌細胞遊走・浸潤を有意に抑制し、これらは前立腺癌における癌抑制型マイクロRNAであることが分かった（図2, [8]より改変）。

### Ⅲ. 癌抑制型マイクロRNA 標的遺伝子群の探索

マイクロRNAの特徴の一つは、配列依存的に標的遺伝子の3' UTRに結合し、その遺伝子の機能を抑制することである。最新のデータベースによると、マイクロRNAは2,578個報告されており (miRBase, release 21, June 2014), バイオインフォマティクス解析では全遺伝子の6割程度がマイクロRNAの制御を受けると考えられている [10]。実際には多くのマイクロRNAと遺伝子群は、膨大な制御ネットワークを形成していると考えられ、このネットワークの破綻が、癌を含む様々な疾患を引き起こすと考えられている。そこで、疾患のキープレイヤーとなるマイクロRNAを探索し、その標的分子を同定することで、その疾患のメカニズム解明の一助となる可能性がある。

治療抵抗性前立腺癌において発現低下し、癌抑制型マイクロRNAとして機能しているマイクロRNAは、図1Aのように、癌遺伝子を標的とする可能性が高い。そこで、まず、①データベースを用いた解析により、マイクロRNAの配列を基に、標的としうる遺伝子群を探索、次に、②前立腺癌細胞株に癌抑制型マイクロRNAを実際に核酸導入した状態で網羅的に遺伝子解析を行ない、発現低下した遺伝子群を抽出、さらに、③前立腺癌臨床検体で発現亢進する遺伝子を抽出した。図3に*microRNA-221/222*により制御される前立腺癌における癌遺伝子の探索例を示す。

これら前立腺癌における癌遺伝子の候補について、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用い

て、直接、癌抑制型マイクロRNAが標的分子を制御することを証明し、マイクロRNAの核酸導入後に標的分子を測定、標的分子の発現が低下することを確認した。さらに、si-RNAを用いたノックダウン解析、in silico解析や、臨床検体における発現確認を行うことで、前立腺癌における癌遺伝子としての機能を確認し、前立腺癌進展の新規メカニズム解明を試みた。解析の結果、癌細胞の浸潤・遊走を抑制する*microRNA-221/222*は、これまで癌における機能不明であった*Ecm29*を直接制御し、治療抵抗性前立腺癌臨床検体では*Ecm29*高発現を認める検体が複数認められた [8]。

### Ⅳ. おわりに

本研究から、癌抑制型マイクロRNAを介した治療抵抗性前立腺癌進展のメカニズムの一端が明らかとなった。現在、次世代シーケンサーを用いた更なる臨床検体の解析と、癌抑制型マイクロRNAが発現抑制される機序について、検討を継続している。

### 謝 辞

本研究においてご指導を頂きました千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学 関 直彦准教授、千葉大学大学院医学研究院泌尿器科学 市川智彦教授に深く感謝申し上げます。

### SUMMARY

Although androgen receptor targeted novel therapeutic agents have been developed to treat castration-resistant prostate cancer (CRPC), they show limited effects. The prognosis of CRPC patients are still poor, and effective treatment measures to cure castration-resistant prostate cancer is urgently needed. In this study, we have constructed novel microRNA expression signature from CRPC clinical specimen and revealed novel mechanisms of CRPC metastasis based on the signature.

### 文 献

- 1) Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly

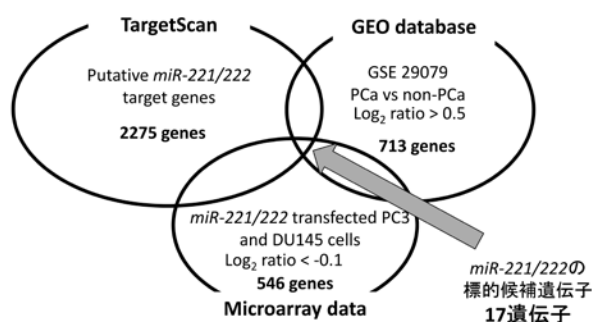


図3 癌抑制型*microRNA-221/222*により制御される遺伝子の探索

データベースを用いた解析と、癌細胞株を用いた網羅的遺伝子解析により、マイクロRNAにより制御される遺伝子群を絞り込む。



- expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol* 2015; 22: 242-52.
- 2) Fuse M, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Yoshino H, Nohata N, Kinoshita T, Sakamoto S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N. Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer. *J Hum Genet* 2012; 57: 691-9.
  - 3) 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; 5: 7748-59.
  - 4) Goto Y, Kojima S, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Matsushita R, Ichikawa T, Seki N. Regulation of E3 ubiquitin ligase-1 (WWP1) by microRNA-452 inhibits cancer cell migration and invasion in prostate cancer. *Br J Cancer* 2016; 114: 1135-44.
  - 5) 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; 107: 84-94.
  - 6) Okato A, Goto Y, Kurozumi A, Kato M, Kojima S, Matsushita R, Yonemori M, Miyamoto K, Ichikawa T, Seki N. Direct regulation of LAMP1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer. *Int J Oncol* 2016; 49: 111-22.
  - 7) 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; 47: 710-8.
  - 8) 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; 113: 1055-65.
  - 9) 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; 45: 401-10.
  - 10) Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.
-