

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18465

研究課題名(和文) DNA損傷応答を誘導するmiRNA阻害剤を用いた新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular-targeted therapy with miRNA inhibitors modifying DNA-Damage-Response

研究代表者

岡本 有加 (Okamoto, Yuka)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：50625217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miR)は遺伝子発現制御を介して、がんの発症、進展に深く関与する。本研究では、miRを分子標的としたがんの新たな治療法開発の基盤を築くために、標的候補として見出したmiR-197阻害剤について特異性・細胞選択性及び妥当性の評価を実施するとともに細胞増殖抑制効果について詳細な検討を行った。その結果、miR-197阻害剤により細胞内のDNA損傷修復因子の発現が低下することが細胞増殖抑制のメカニズムの一端であることが明らかとなった。また、miR-197阻害剤と相乗的な細胞増殖抑制効果を示す既存の抗がん剤を見出した。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRs) are involved in generation and progression of tumor through modifying expression of target genes. This study aimed to obtain basic information and proof of concept in development of new molecular-targeted therapy using miR inhibitors. To this end, cytostatic effects brought by miR-197 inhibitor, found as a target candidate, was analyzed in detail. Evaluation of cell-line selectivity of miR-197 revealed that the cytostatic effects depended on cellular-context but not on the organ of origin. Mechanistically, miR-197 inhibitor suppressed expression of several genes that are crucial for DNA damage repair. In addition, we searched and determined anti-cancer drug that show synergistic effect with miR-197 inhibitor.

研究分野：腫瘍治療学、腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：miRNA阻害剤 がん細胞 DNA損傷応答 抗がん治療

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA (microRNA, miR) は、20塩基前後の低分子非コードRNAである。miRは主に標的のmRNAの3' UTRに作用し、遺伝子発現調節を介して細胞増殖、発生や分化といった多岐にわたる生命現象に関与することが知られており、これまでにヒトでは約1900種のmiRが同定されている (miRBase version21 Jul 2014)。また、miRはがんを中心とした疾患の発生、進展の原因であることも明らかとなってきており、特にがんにおいて、miRの発現亢進や抑制が顕著に認められ、これらのmiRの機能について近年積極的に研究が進んでいる。こうした発現プロファイルの情報から、miRにも、原がん遺伝子に区分されるもの (OncomiR) があると考えられるようになってきた。代表的なOncomiRとしては、miR-21やmiR-17-92クラスター、miR-34などが挙げられ、こうしたOncomiRを標的とした治療法の開発に注目が集まっている (Li Z, *et al* Nat.Rev.Drug Discov. 2014)。

一方で、核酸医薬の改良が進んでおり、導入の困難さや生体内での分解の早さといった問題点の克服に向けて大きく進展しつつある。miRに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤も、治療薬としての開発がすすみ、LNA (locked nucleic acid) を骨格としたmiR-122阻害剤 miravirsen はC型肝炎に対する臨床試験でも好成績を収めている (Janssen HL, *et al* N.Engl.J. Med.2013)。

これらの事から、OncomiRを標的としたがんの分子標的治療は現在非常に重要な課題であるとともに今後大きな躍進が見込まれると考えられる。上記のように、miRはがんとの関わりが深く、miR-17-92, miR-21, miR-34などに対する阻害剤による、がん細胞の増殖の抑制や、マウスにおける腫瘍増殖の抑制が報告されている。しかしながら、申請者らの予備的な検討では、miR-21やmiR-17の抑制によるがん細胞増殖抑制効果は必ずしも強くない事も明らかになって来た。従来OncomiRの同定は、臨床サンプルを用いた発現解析を元に、がん部で発現の上昇しているものを候補とし、検証する方法が主である。そこで、我々は、がん細胞の生存増殖に重要であるかという観点でOncomiR候補を得る事を考え、アンチセンスmiR阻害剤ライブラリを用いて、がん細胞の増殖を指標とした機能的スクリーニングを行い、強い細胞増殖抑制効果を有するmiR阻害剤として、miR-197阻害剤を見出した。OncomiRとしてのmiR-197の可能性は別のグループからも示唆されており、p53野生型の小細胞肺がんではmiR-197の発現・機能抑制による細胞増殖抑制効果が報告されている。(Fiori ME *et al*, Cell Death Differ. 2014)。しかし、申請者らの検討から、miR-197阻害による増殖抑制効果は、p53変異型の細胞株でも見られる事が明らかとなり、報告と異なる作用機序の存在が示唆された。そこで、miR-197阻害剤を処理した細

胞の遺伝子発現変動解析を行った。その結果、阻害剤導入後6時間において、既存のDNA損傷効果を有する抗がん剤と類似した遺伝子発現パターンを示す事が明らかとなった。また、実際にDNA2本鎖切断マーカーであるH2AXのリン酸化がmiR-197阻害剤を処理したPC3細胞で認められた。ここから、miR-197の機能阻害により、DNA損傷応答が異常に誘導され、その下流で起こる細胞周期停止やアポトーシスにより細胞増殖が抑制されている可能性が考えられた。がん細胞では、正常細胞よりも増殖速度が速く、高頻度でDNA損傷が起こるため、適応機構として、損傷修復経路の活性化が存在すると考えられる。実際にDNA損傷を誘導する抗がん剤は多数存在し、DNA修復経路を阻害するような抗がん剤も開発が進んでいるように、抗がん治療のターゲットとしてDNA損傷応答、及び修復経路は妥当かつ有望であると考えられる。

### 2. 研究の目的

上記のような背景に基づき、本研究では、miR-197阻害剤によるがん細胞増殖抑制効果の作用メカニズムを詳細に明らかにすることで、miRの関与する細胞内現象について新たな知見を得るとともに、miR-197を分子標的とした新たながん治療への基盤となる知見を得ることを目指す。

そこで、予備的検討で得られたmiR-197阻害剤 (miR-197アンチセンスLNA阻害剤) によるがん細胞の増殖抑制効果について、細胞特異性・妥当性の検証、増殖抑制効果の分子機構解析、及びmiR-197阻害剤と合成致死を誘導する既存の抗がん剤の探索を目的として研究を展開する。

### 3. 研究の方法

本研究では、miR阻害剤を用いた抗がん治療の開発を目指した基盤研究を展開するために、ターゲット候補であるmiR-197阻害剤についてがん増殖抑制効果の作用機序の詳細等を明らかにすることを基軸として研究を展開・推進した。以下に、具体的実施内容及び方法を項目別に記す。

#### miR-197阻害剤の特異性の確認

miR-197阻害剤により、標的であるmiR-197が細胞内で機能阻害を受けていることを確認するために、ルシフェラーゼ遺伝子の3'末側にmiR-197結合配列を有するレポータープラスミドを細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。この際、特異性を確認するために、miR-17やmiR-21など、他のmiR結合配列を持つレポータープラスミドも作成、導入しmiR-197阻害剤が選択的であるかの確認を行った。さらに、細胞増殖抑制効果が、miR-197の阻害によることの確認として、miR-197の強制発現により、増殖抑制効果の中和が認められるかの検討を行った。

#### miR-197阻害剤の細胞選択性の検討

予備的検討において、miR-197阻害剤によ

る増殖抑制効果感受性が低い細胞株が存在した。そこで、より多くの細胞株を用いて、miR-197 阻害剤による増殖抑制感受性ががん種選択的であるのかどうかを検討するため、がん研究会において樹立されたヒトがん細胞パネル JFCR39 内の全ての細胞について miR-197 阻害剤による増殖抑制効果を検討した。さらに、感受性の異なる細胞株を5株選び、miR-197 の細胞内での基底状態および miR-197 阻害剤処理時の発現について miR 及び低分子 RNA 発現解析用のマイクロアレイチップを用いて検討した。

#### miR-197 阻害剤処理による細胞増殖阻害の詳細な検討

miR-197 阻害剤による細胞増殖抑制をより詳細に検討するため、PI 染色した細胞のフローサイトメトリーにより細胞周期を検討した。また、アポトーシスが誘導されているかを検討するため、(1)ウエスタンブロットによる PARP の切断の検出、(2)発光検出法による Caspase 活性化の検出の二点を行った。

#### miR-197 阻害による DNA 損傷応答誘導機構の解析

予備的検討で miR-197 阻害剤を処理した PC3 細胞の遺伝子発現変動解析を行った際、阻害剤導入後6時間において、既存の DNA 損傷効果を有する抗がん剤と類似した遺伝子発現パターンを示した。また、阻害剤処理24時間後に、DNA2本鎖切断マーカーであるリン酸化 H2AX( $\gamma$ H2AX)が PC3 細胞で認められた。この2点から、DNA 損傷応答に着目して検討を行った。PC3 細胞と同様に miR-197 阻害剤により強い増殖抑制効果を示した U251 細胞および増殖抑制効果をほぼ示さなかった HT29 細胞も併せて用い、 $\gamma$ H2AX の免疫染色を行った。更に、損傷応答の活性化の機構が、シグナル経路の活性化なのか、修復系の異常による損傷の蓄積なのかを明らかにするため、損傷応答時にリン酸化され、下流のシグナルを制御する ATM,ATR,CHK1,CHK2 等の分子の発現、活性化についてウエスタンブロットにより確認した。活性化の指標はリン酸化抗体を用いた。更に、DNA 修復系に関わる分子: DNA-PK, Ku70, Ku80, 53BP1 (非相同末端結合修復; Non Homologous End Joining 経路) RAD51, CHK1, RAD52, BRCA1, BRCA2 (相同組換え修復; Homologous Recombination 経路) の発現について、ウエスタンブロットにより解析した。

#### miR-197 阻害剤と相乗的な細胞増殖抑制効果を示す既存の抗がん剤の探索

miR-197 阻害剤処理により DNA 損傷を誘導する既知の抗がん剤と類似した遺伝子発現パターンを示すことから、PARP 阻害剤、TopoI 阻害剤、DNA アルキル化剤等の DNA 損傷誘導性抗がん剤11種を用いて、miR-197 阻害剤によりこれらの抗がん剤感受性が変化するかを PC3 細胞において検討した。

#### miR-197 阻害剤の標的候補の探索

miR-197 阻害剤処理時、および miR-197 の

強制発現時の細胞内遺伝子発現変動データを取得し、公共データベースや解析ソフトウェアを用いて、miR-197 の標的 mRNA 候補の選定を試みた。miR の標的予測は主にそのシード配列を mRNA の3'末側にもつことが基準となっているが、一般的に標的候補は膨大な数となるので、DIANA や miRanda といった複数のアルゴリズムで重複していること、及び、miR-197 阻害あるいは強制発現による発現変動の向きに一貫性があること、を基準にした。また、最近の知見から、miR 以外の非翻訳 RNA である、長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) が遺伝子発現、タンパク質の局在やタンパク質-タンパク質間の相互作用等に深く関与し得ることが明らかとなってきたため、lncRNA の網羅的な解析が可能なアレイチップを用いて miR-197 阻害剤処理時の網羅的発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

成果について、項目ごとに分けて以下に述べる。

##### miR-197 阻害剤の特異性の確認

miR-197 アンチセンス LNA 阻害剤が、標的の miR-197 を特異的に機能抑制しているかの確認を行った結果、miR-197 特異的なレポーター活性を阻害したが miR-21 等の他のレポーター活性に影響を与えないことが確認出来た。さらに、miR-197 阻害剤処理時の miR の網羅的な発現解析を PC3 細胞において実施した結果、有意な発現低下を示した miR は、発現が測定できた 600 プローブ中、miR-197 を含む4遺伝子のみであった。同様の結果は他の3細胞株で確認済みである。更に、PC3 細胞において、miR-197 阻害剤処理による細胞増殖抑制効果が miR-197 の過剰発現によって、量依存的に回復したことから、miR-197 阻害剤による細胞増殖抑制効果は miR-197 の発現抑制を介した特異的なものであると考えられた。

##### miR-197 阻害剤の細胞選択性の検討

まず、昨年度まで主として用いていた PC3 細胞(前立腺がん由来)に加えて、がん研究会において樹立されたヒトがん細胞パネル JFCR39(9癌種計39株)内の全ての細胞について miR-197 阻害剤による増殖抑制効果を検討した結果、PC3 細胞株の他に U251(脳腫瘍由来)細胞株等17株で80%以上の強い増殖抑制活性を認めた。一方で、HT29(大腸がん由来)、SF539(脳腫瘍由来)細胞株等6株においては顕著な増殖抑制活性を認めなかった。また、miR-197 阻害剤による細胞増殖抑制活性は、癌種ではなく細胞株特異的に出ることが明らかとなった。

##### miR-197 阻害による細胞増殖抑制機構・DNA 損傷応答誘導機構の解析

miR-197 阻害剤による細胞増殖抑制をより詳細に検討するため、細胞のフローサイトメトリーにより細胞周期を検討した。その結果、細胞周期に顕著な変化を認めなかった。また、

アポトーシスが誘導されているかを PARP 切断および Caspase の活性化検出により検討した結果、どちらも顕著な活性を示さなかった。続いて、DNA 損傷応答について検討を行った。miR-197 阻害剤による増殖抑制感受性の高いを示した PC3 細胞・U251 細胞および増殖抑制感受性の低い HT29 細胞も併せて用い、 $\gamma$ H2AX の免疫染色を行った結果、PC3 および U251 細胞において核内の  $\gamma$ H2AX の集積を認めたが、HT29 細胞においてはみとめなかった。 $\gamma$ H2AX の集積が認められたことから、DNA 損傷応答シグナル経路が活性化している可能性を考え、損傷応答時にリン酸化され、下流のシグナルを制御する ATM,ATR,CHK1,CHK2 等の分子の発現、活性化についてウエスタンブロットにより確認した。しかしながら、予想に反し、活性化の指標であるリン酸化 ATR, リン酸化 CHK1 等は誘導されていなかった。続いて、DNA 修復系に関わる分子: DNA-PK, Ku70, Ku80, 53BP1( NHEJ 経路 )RAD51, CHK1, RAD52, BRCA1, BRCA2 ( HR 経路 ) の発現について、ウエスタンブロットにより解析した結果、BRCA1, BRCA2, RAD51 等の複数の HR 修復因子の発現の顕著な低下を認めた。qRT-PCR の結果、これらの修復因子の発現低下は、多くの場合 mRNA 発現レベルの低下によるものと考えられた。一方で、DNA-PK, Ku70, Ku80 等の発現には顕著な変化を認めなかった。更に miR-197 阻害剤存在下では、DNA 損傷誘導性の薬剤処理時の修復シグナルの活性化も抑制されていることが明らかとなった。また、HT29 細胞のような、miR-197 阻害剤による増殖抑制感受性の弱い細胞株においては DNA 修復因子の発現への影響も低かった。

これらの結果から、miR-197 阻害剤による増殖抑制感受性の高い細胞においては、HR 修復経路にクリティカルな遺伝子の発現低下により、DNA2 本鎖切断が蓄積することが増殖抑制の一因であると考えられた。

miR-197 阻害剤と相乗的な細胞増殖抑制効果を示す既存の抗がん剤の探索

PARP 阻害剤、TopoI 阻害剤、Topo II 阻害剤、DNA アルキル化剤等の DNA 損傷誘導性抗がん剤 11 種を用いて、miR-197 阻害剤によりこれらの抗がん剤感受性が変化するかを PC3 細胞において検討した。その結果、TopoI 阻害剤 (SN38, Topotecan) への感受性が特異的に上昇することを見出した。

miR-197 阻害剤の標的候補探索

miR-197 阻害剤処理時、および miR-197 の強制発現時の細胞内遺伝子発現変動データを取得し、公共データベースを用いて、miR-197 の標的 mRNA 候補の選定を試みたが、miR-197 阻害剤処理時と対照的に、miR-197 の強制発現時には、細胞内における遺伝子発現変動が殆どみられず、当初予定していた、miR-197 の標的候補を絞り込むことがかなり困難となった。一方で、mRNA 末端に miR-197 結合配列をもち、miR-197 阻害剤処理時に大きく発現変動した遺伝子も複数存在した。そ

の内 1 つが、がんで発現が上昇していることが知られている lncRNA 遺伝子であった。近年、多岐にわたる lncRNA の機能が報告されはじめ、それらの内容などから miR-197 阻害剤が lncRNA の機能調節を介して HR 修復因子の発現調節に関与している可能性を考え、ヒトで同定されている lncRNA 遺伝子プロンプを広く含むアレイチップを用いて miR-197 阻害剤処理時の網羅的発現解析を行った。その結果、miR-197 阻害剤の作用に関与している可能性のある lncRNA 遺伝子の候補を 20 遺伝子程度得た。

以上の成果をまとめると、本研究では、miR を分子標的とした新たな治療法の開発を目指し、予備的検討で得られた miR-197 阻害剤による細胞増殖抑制効果について、細胞特異性・妥当性の検証、増殖抑制効果の分子機構解析、及び miR-197 阻害剤と合成致死を誘導する既存の抗がん剤の探索を目的として研究を展開した結果、miR-197 阻害剤により、BRCA1, BRCA2 等の HR 修復因子の発現が低下することで、DNA 損傷修復の機能欠損が起こり、修復されない DNA 損傷が蓄積することが細胞増殖抑制の作用機序の一端であることが明らかとなった。また、この細胞増殖抑制効果は選択的であり、選択性は臓器によるものではなく、miR-197 の発現強度といった、それぞれの細胞株間の違いによるものであることが明らかとなった。

HR 修復因子の機能欠損は、がん化のマーカーであると同時に、がん治療の標的でもあり、実際に BRCA1/2 の変異がんにおける PARP 阻害剤による合成致死効果は臨床における有効な治療法である。本研究で得られた結果は、miR-197 阻害剤によって、がん細胞に HR 修復機能欠損が誘導され得るという新たなコンセプトを示しており、今後メカニズムがより詳細に明らかになることにより、新規がん治療法の開発に向けた有用な情報が得られると期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 岡本有加、永澤生久子、富田章弘 「小胞体ストレス下におけるがん幹細胞マーカー分子 LGR5 の発現制御に対する PERK の関与」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (2016 年 別府)
- (2) 岡本有加、小井土大、永澤生久子、富田章弘 “Involvement of PERK in metabolic stress-induced down-regulation of cancer stem marker LGR5” 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 横浜)
- (3) 岡本有加、小井土大、富田章弘 「小

胞体ストレス下に置ける PERK 活性依存的な LGR5 生合成の制御」第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会(2017 年福岡)

- (4) 小井土大、岡本有加、富田章弘 「抗がん剤作用において影響力のある遺伝子を推定するための遺伝子発現データの統合解析アルゴリズム」第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会(2017 年福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡本 有加 ( OKAMOTO, Yuka )

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員  
研究者番号：50625217

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし

(4) 研究協力者  
小井土 大 ( KOIDO, Masaru )  
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・協力研究員