

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07709

研究課題名(和文)新規癌抑制型miRNAによるMYC標的核酸抗癌薬の開発

研究課題名(英文)Oligonucleotide therapeutics using a novel tumor-suppressive microRNA targeting MYC pathway

研究代表者

玄 泰行 (Yasuyuki, Gen)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：80596156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MYCの活性を抑制するmiRNAをin vitroでスクリーニングし、miR-766-5pを同定した。miR-766-5pはMYCの発現の高い癌細胞において、その発現を抑制し、MYCの発現の低い非腫瘍細胞のMYC発現に影響を与えなかった。機能解析の結果、miR-766-5pはスーパーエンハンサーの活性を制御するCBPの3'UTRを、BRD4のコーディング領域を標的として抑制し、癌細胞特異的なMYCのスーパーエンハンサーを抑制した。マウスモデルの治療実験でmiR-766-5pの投与は複数の癌細胞の腫瘍成長を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新たな核酸抗癌薬のシーズとしてmiR-766-5pを同定した。miR-766-5pはBRD4とCBPを抑制することで、スーパーエンハンサーを制御し、癌細胞特異的にMYCの発現を抑制した。miR-766-5pを用いた核酸抗癌薬はMYCが活性化している癌に対する新たな治療戦略となる可能性がある。特に希少難治癌であるNUT正中線癌は、BRD4がドライバーとなってMYCが活性化しているため、miR-766-5pを用いた核酸抗癌薬は有効な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified miR-766-5p as a miRNA that downregulated MYC expression and inhibited tumor cell growth in vitro. We show that miR-766-5p directly targets CBP and BRD4. Concurrent suppression of CBP and BRD4 cooperatively downregulated MYC expression in cancer cells but not in normal cells. Chromatin immunoprecipitation analysis revealed that miR-766-5p reduced levels of H3K27ac at MYC super-enhancers (SEs) via CBP suppression. In vivo administration of miR-766-5p suppressed tumor growth in two xenograft models. Targeting SEs using miR-766-5p-based therapeutics may serve as an effective strategy for the treatment of MYC-driven cancers.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：miR-766-5p BRD4 CBP MYC 核酸抗癌薬 NUT正中線癌 スーパーエンハンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA は 25 塩基程度の non-coding RNA であり、標的 mRNA の翻訳阻害や分解を介して、遺伝子の発現を抑制する。一つの miRNA は多数の mRNA を標的としており、miRNA による遺伝子発現制御は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシス、代謝など広範な生物学的プロセスに深く関与することが知られている。癌においても多くの miRNA の発現異常が認められ、癌の発育進展を抑制する癌抑制型 miRNA は一般的に癌細胞内において発現が低い。miRNA mimic を用いて、癌細胞で消失した癌抑制型 miRNA の機能を回復させることにより、癌の悪性特性の改善や抗腫瘍効果が得られる可能性がある。

癌はしばしば癌細胞特異的なスーパーエンハンサーを獲得し、様々な癌遺伝子を活性化していることが知られている。その中でも代表的な癌遺伝子 MYC は多くの癌細胞においてスーパーエンハンサーが存在して高発現し、癌の性質を特徴づける一方、MYC を標的とする分子標的治療薬はいまだに開発されていない。MYC は全遺伝子の 15% のプロモーター領域に結合し、細胞全体の遺伝子発現を大きく調節することが報告されている (Walz S et al, Nature, 2014)。MYC には細胞周期促進による増殖促進作用だけでなく、ワールブルグ効果を含む解糖系を促進する作用や、さらには癌細胞表面に PD-L1 の発現を誘導することで T 細胞の攻撃を回避する作用があることも報告されている (Casey SC et al, Science, 2016)。このように MYC は癌細胞が生存するうえで多面的に関わっていることから、MYC をターゲットとする治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

miRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、MYC を著明に抑制する新規癌抑制型 miRNA を同定し、MYC をターゲットとする miRNA 核酸抗癌薬の開発を目指すことを目的とした。具体的には、以下の点を明らかにした。

MYC を強く抑制する候補 miRNA として *miR-766-5p* の同定

miR-766-5p の標的遺伝子の同定及び標的遺伝子の MYC 経路抑制効果の検証

miR-766-5p の MYC スーパーエンハンサー抑制効果の検証

miR-766-5p の *in vivo* 抗腫瘍効果

3. 研究の方法

MYC を強く抑制する候補 miRNA、*miR-766-5p* の同定

まず我々がこれまでに見出した 138 種類の抗腫瘍効果の強い腫瘍抑制型 miRNA (Mol. Ther. 28, 1494-1505. (2020)) を対象に、MYC の活性を抑制する miRNA を *in vitro* で MYC reporter assay を用いて、スクリーニングし、MYC 経路を強く抑制する miRNA を絞り込んだ。HCT116 p53^{-/-}細胞に対して、138 種類の腫瘍抑制型 miRNA (5 μ M) を導入し、Signal Myc Reporter Assay Kit (luc) (CCS-012L; QIAGEN) を用いて MYC 活性を評価した。次に得られた候補 miRNA である *miR-766-5p* の *in vitro* における MYC 発現抑制効果を多数の腫瘍細胞および非腫瘍細胞で検証した。

miR-766-5p の標的遺伝子の同定及び標的遺伝子の MYC 経路抑制効果の検証

miR-766-5p を腫瘍細胞に導入したのちに、RNA を回収し、遺伝子発現アレイ (the Agilent 8 x 60 K array (Agilent Technologies)) を行い、*miR-766-5p* により発現抑制された遺伝子網羅的に解析した。得られたデータは Gene-set enrichment analysis (GSEA) を行った。さらに miRNA 標的遺伝子予測データベース (TargetScan) と照合することで、*miR-766-5p* の標的遺伝子を同定した。*miR-766-5p* が標的遺伝子に直接結合しているかどうかはルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて検証した。

miR-766-5p の MYC スーパーエンハンサー抑制効果の検証

miR-766-5p あるいは *miR-766-5p* の標的遺伝子を抑制する siRNA を導入した後、スーパーエンハンサー活性の指標である H3K27Ac の抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、MYC 遺伝子のスーパーエンハンサー活性について検証した。

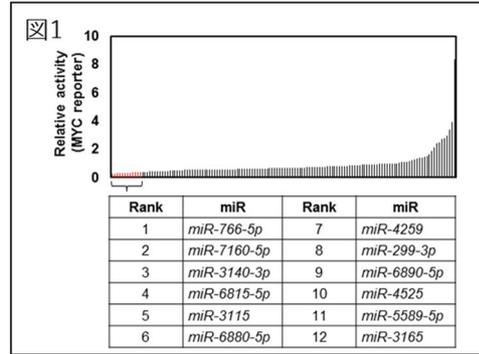
miR-766-5p の *in vivo* 抗腫瘍効果

HCT116 p53^{-/-}細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍を形成させたのち、AteloGene (KOKEN) を用いて *miR-NC* (コントロール) もしくは *miR-766-5p* を腫瘍周囲に週 2 回のペースで局所投与し、腫瘍成長抑制効果を検証した。さらに、最終的に腫瘍は回収し、RNA を抽出することで *miR-766-5p* が腫瘍内に導入されているかどうかを検証した。また、腫瘍サンプルからパラフィン包埋切片を作成し、免疫染色を行うことで *miR-766-5p* の標的遺伝子の蛋白発現が抑制されているかどうかを検証した。

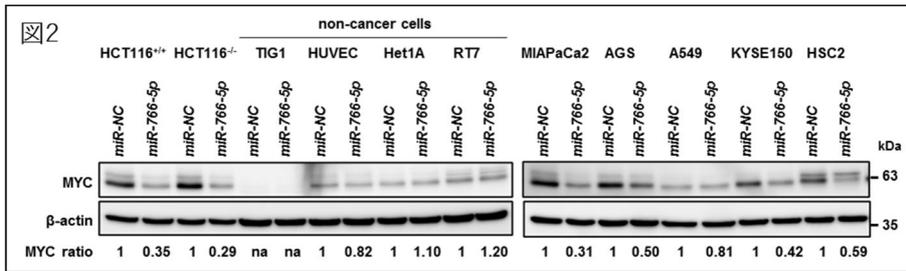
4. 研究成果

候補 miRNA の標的遺伝子の同定及び標的遺伝子の MYC 経路抑制効果の検証

138 種類の癌抑制型 miRNA を HCT116 p53^{-/-}細胞に導入し、MYC reporter assay (CCS-012L; QIAGEN)を行ったところ、最も MYC レポーター活性を抑制した miRNA は *miR-766-5p* であった (図 1)。これらのアッセイで得られた上位 3 種類の miRNA (*miR-766-5p*, *miR-7160-5p*, *miR-3140-3p*) を用いて、MYC mRNA 発現および MYC 蛋白発現を比較検討したところ、*miR-766-5p* が最も強く MYC 発現を mRNA レベルおよび蛋白レベルで抑制していることが確認できた。

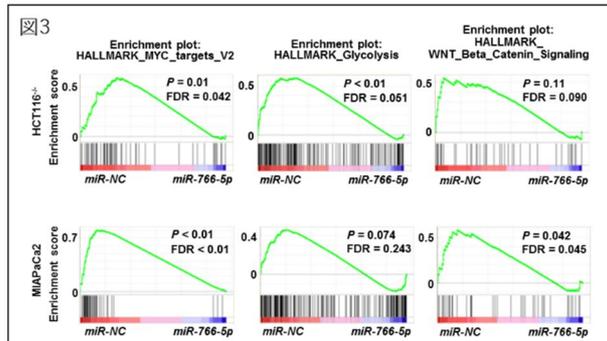


miR-766-5p を導入した後、ウエスタンブロッティングで MYC 発現レベルの変化を複数の癌細胞および非腫瘍細胞で確認したところ、興味深いことに、*miR-766-5p* は MYC の発現が高い癌細胞において特異的に MYC 発現を強く抑制し、非腫瘍細胞の MYC 発現に対してはほとんど影響を与えないことが分かった (図 2)。

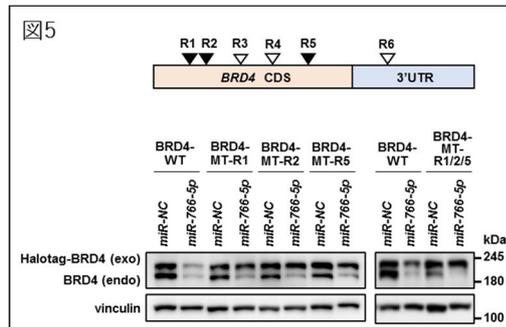
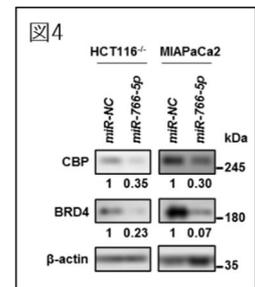


miR-766-5p の標的遺伝子の同定及び標的遺伝子の MYC 経路抑制効果の検証

miR-766-5p を HCT116 p53^{-/-} および MIAPaCa2 細胞に導入した後、発現アレイを行い、*miR-766-5p* による遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。Gene-set enrichment analysis (GSEA)を行うと、*miR-766-5p* の導入により、いずれに細胞においても MYC 経路、Glycolysis 経路、WNT/ β -catenin 経路が抑制されることが明らかとなった。Glycolysis 経路および WNT/ β -catenin 経路はいずれも MYC により活性化されることが知られていることから、これらの結果は、*miR-766-5p* が MYC 経路を強く抑制していることを示していると考えられた。

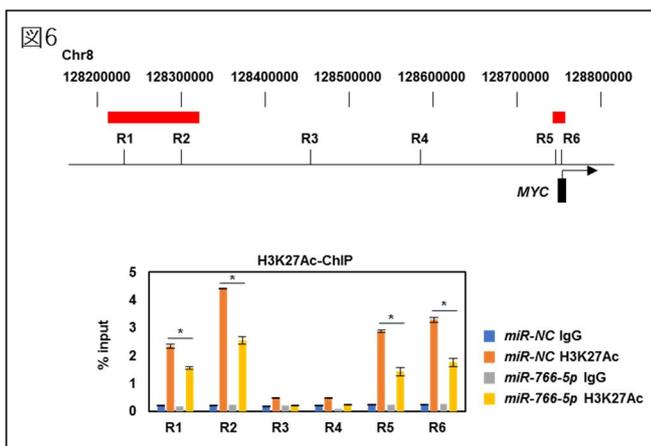


次に遺伝子発現アレイの結果と、miRNA の標的遺伝子予測データベース TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 及び SStarMirDB database (<http://sfold.wadsworth.org>) のデータを用いて、*miR-766-5p* の標的遺伝子の探索を行ったところ、MYC そのものは *miR-766-5p* の標的遺伝子候補にはならなかったが、スーパーエンハンサーを活性化させることで MYC 発現を大きく増強する CBP と BRD4 が *miR-766-5p* の標的遺伝子候補と考えられた。CBP、BRD4 いずれも *miR-766-5p* の導入によりその発現が抑制された (図 4)。CBP 遺伝子の 3'UTR を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイを行うと、*miR-766-5p* の導入により抑制され、*miR-766-5p* の結合配列に変異を導入すると、その抑制がレスキューされることから *miR-766-5p* は CBP の 3'UTR を直接の標的としていることが示された。また、BRD4 については、コーディング領域に *miR-766-5p* の標的配列が複数存在し、BRD4 発現ベクターを導入した後、*miR-766-5p* を導入すると、候補標的配列のうち、R1、R2、R5 の 3 カ所に変異を挿入した場合、BRD4 の発現抑制がレスキューされることから *miR-766-5p* は同領域を標的としていることが確認できた (図 5)。



miR-766-5p の MYC スーパーエンハンサー抑制効果の検証

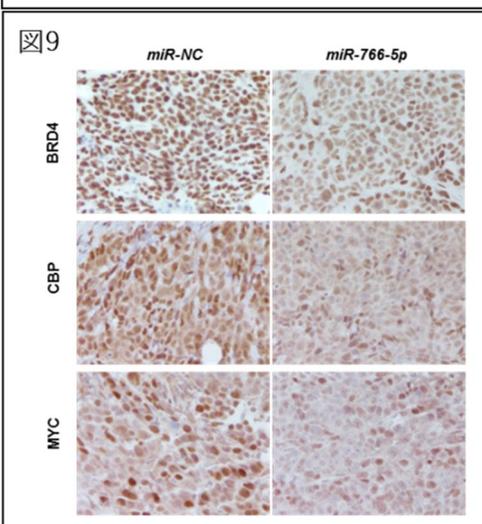
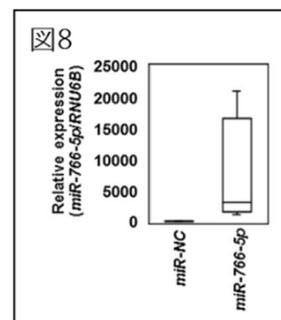
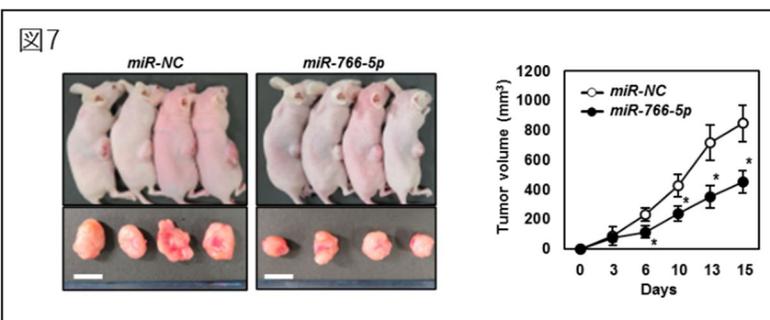
miR-766-5p を HCT116 p53^{-/-}細胞に導入した後、スーパーエンハンサー活性の指標である H3K27Ac の抗体を用いてクロマチン免疫沈降法(CHIP)を行った。HCT116 細胞の MYC 遺伝子領域のスーパーエンハンサーについては、これまでに詳細に検討され、報告されている (Cell 2013;155:934-47.) (図 6 上段、赤線)。これら MYC のスーパーエンハンサー領域で CHIP-qPCR を行うと、*miR-766-5p* の導入によりスーパーエンハンサー領域の H3K27Ac のレベルはコントロールと比較し、低下していることから、*miR-766-5p* は MYC のスーパーエンハンサー活性を抑制していることが示された (図 6 下段)。 *miR-766-5p* の標的遺伝子 CBP をノックダウンしても同様の結果が得られたことから、*miR-766-5p* は CBP を抑制し、その結果、MYC のスーパーエンハンサー活性を抑制し、癌細胞特異的に MYC 発現を抑制していると考えられた。



miR-766-5p の in vivo 抗腫瘍効果

最後に HCT116 p53^{-/-}細胞をヌードマウスの皮下に接種し、皮下腫瘍モデルを作成し、*miR-766-5p* による治療実験を行った。皮下腫瘍に対して *miR-766-5p* の局所投与を行うと、コントロールである *miR-NC* の投与を行った場合と比較して、腫瘍の成長が抑制される結果であった (図 7)。治療後の腫瘍を回収し、RNA を抽出して、PCR を行ったところ、*miR-766-5p* 導入群において、有意に *miR-766-5p* の発現レベルは高く、このことから、*miR-766-5p* は皮下腫瘍内に送達されていることが確認できた (図 8)。

さらに、パラフィン包埋切片を作成して、免疫染色を行うと、*miR-766-5p* の導入により、MYC の発現は有意に低下し、標的遺伝子である CBP、BRD4 の蛋白発現も抑制されていることが確認できた (図 9)。以上の結果から、*miR-766-5p* は in vivo の投与においても MYC 経路を強く抑制し、腫瘍成長を抑制したことが確認でき、新規核酸抗癌薬の可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagawa Y, Gen Y, Muramatsu T, Tanimoto K, Inoue J, Harada H, Inazawa J.	4. 巻 28
2. 論文標題 miR-1293, a Candidate for miRNA-Based Cancer Therapeutics, Simultaneously Targets BRD4 and the DNA Repair Pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther.	6. 最初と最後の頁 1494-1505.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.04.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terasaki K, Gen Y, Iwai N, Soda T, Kitaichi T, Dohi O, Taketani H, Seko Y, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Konishi H, Naito Y, Itoh Y, Yasui K.	4. 巻 21
2. 論文標題 SOX2 enhances cell survival and induces resistance to apoptosis under serum starvation conditions through the AKT/GSK-3 signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12530.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gen Y, Muramatsu T, Inoue J, Inazawa J	4. 巻 81
2. 論文標題 miR-766-5p Targets Super-Enhancers by Downregulating CBP and BRD4.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5190-5201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-0649.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu C, Gen Y, Tanimoto K, Muramatsu T, Inoue J, Inazawa J.	4. 巻 25
2. 論文標題 Concurrent targeting of MAP3K3 and BRD4 by miR-3140-3p overcomes acquired resistance to BET inhibitors in neuroblastoma cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids.	6. 最初と最後の頁 83-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.05.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玄泰行、稲澤譲治
2. 発表標題 MYC経路を標的とする新規腫瘍抑制型miRNAの同定
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玄泰行、稲澤譲治
2. 発表標題 MYC経路を標的とする新規腫瘍抑制型miRNAを用いた核酸抗癌薬の可能性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉暢、玄泰行、稲澤譲治
2. 発表標題 miR-3140iはBRD4-MYC経路を標的とし、神経芽腫細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玄 泰行、村松 智輝、井上 純、稲澤 譲治
2. 発表標題 核酸抗癌薬を目指した新規腫瘍抑制型miRNAの探索
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Gen, Tomoki Muramatsu, Jun Inoue, Johji Inazawa
2. 発表標題 Oligonucleotide therapeutics using a novel tumor-suppressive microRNA targeting MYC pathway
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Takagawa, Yasuyuki Gen, Tomoki Muramatsu, Hiroyuki Harada, Johji Inazawa
2. 発表標題 Function-based microRNA library screening identified novel tumor suppressive microRNAs targeting BRD4
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 miR-3140 suppressed tumor cell growth in neuroblastoma by targeting BRD4-MYCN pathway
2. 発表標題 Chang Liu, Yasuyuki Gen, Johji Inazawa
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玄泰行、稲澤讓治
2. 発表標題 Targeting super-enhancers by downregulating CBP and BRD4 using miR-766-5p-based cancer therapeutics
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉暢、玄泰行、稲澤謙治
2. 発表標題 Concurrent targeting of MAP3K3 and BRD4 by miR-3140-3p overcomes acquired resistance to BET inhibitors in neuroblastoma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玄 泰行、村松 智輝、井上 純、稲澤 謙治
2. 発表標題 スーパーエンハンサーを標的としたmiRNA核酸抗癌薬の開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マイクロRNA及びその誘導体を有効成分とする医薬組成物	発明者 稲澤 謙治、玄 泰行、井上 純、村松 智輝、高川 祐希	権利者 国立大学法人 東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-233250	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------