

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06190・19K21295

研究課題名(和文) 精巢・癌特異的長鎖非翻訳RNAであるTHORのプロモーター解析とその治療応用

研究課題名(英文) Promoter analysis of THOR, cancer-testis lncRNA

研究代表者

細野 祥之 (Hosono, Yasuyuki)

愛知県がんセンター(研究所)・がん標的治療TR分野・ユニット長

研究者番号：60820363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫沈降法と質量分析法を組み合わせ、THORの転写制御を調整している可能性のある2個の転写因子を同定し、これらの発現抑制による非小細胞肺癌細胞株の細胞増殖の低下も確認した。次に、THORの転写制御点を標的とした治療の可能性を検討するため、市販薬1200個の低分子化合物ライブラリーによる治療が、細胞増殖に与える影響、THORの発現に与える影響、THORの転写制御に与える影響をそれぞれ、IncuCyte、qRT-PCR、Luciferase Assayを用いて解析した。これら3つも網羅的な解析の結果はいずれの2つの組み合わせにおいても互いに相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

lncRNAの組織疾患特異的な発現パターンは、それを標的とした治療法の可能性を示唆するが、lncRNAは進化的保存性に乏しいため、機能に基づく論理的な治療法の確立と動物実験が困難であることが多い。一方でTHORはその発現のみでなく、作用点までもヒトからゼブラフィッシュに至るまで深く保存されているため、今回のようなその機能を元とした論理的な治療薬発見の戦略を立てることが可能であり、実際にTHOR高発現がんに対する新規化合物同定の一端を示すことが可能であった。これにより本研究はlncRNAをターゲットとした癌治療の新たな一歩となる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：First, we identified two candidates of transcription factors (TFs) which can regulate THOR's expression. We then found that knockdown of those TFs' expression suppressed cell proliferation, THOR's promoter activity and THOR's expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line which have high expression level of THOR. Finally, we treated the same cell line with small compound library and performed luciferase assays. Interestingly, a couple of drugs regulated the promoter activity of THOR indicating that they can be a novel drug candidates for the cancer with high expression of THOR.

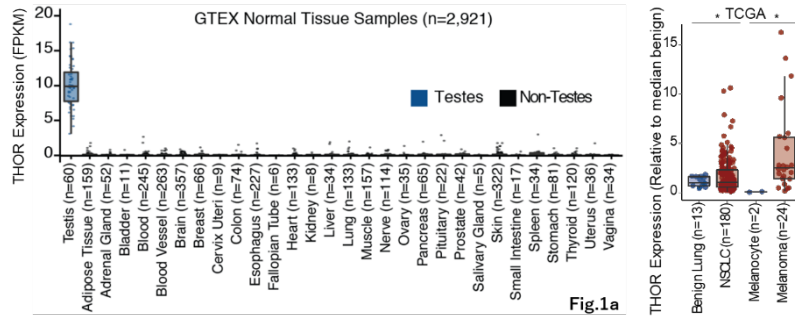
研究分野：がん分子生物学

キーワード：lncRNA 転写因子 動物モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

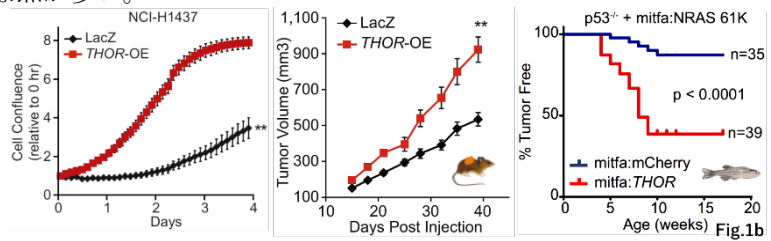
1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでの研究で、大規模な RNA シークエンシングのデータセットを用い、正常組織では精巢でのみ発現を認めるにもかかわらず、ほぼすべての癌種で再発現を示す非常に進化的に保存された lncRNA を同定し、THOR と命名した (Fig.1a)。また THOR の癌細胞増殖への関与を細胞株、マウス異種細胞移植モデル、さらにゼブラフィッシュメラノーマモデルを用いて示した (Fig.1b)。しかしその特異的な発現パターンの制御機構、またその制御点をターゲットとした治療法の確立については不明な点が多い。



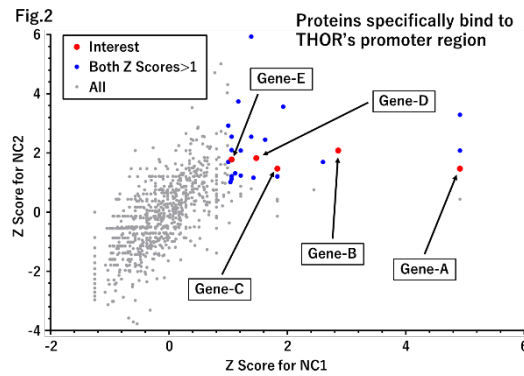
2. 研究の目的

今回の研究は THOR の発現機構を転写制御レベルで解明し、転写調節点をターゲットとした治療法の確立を目的としている。



3. 研究の方法

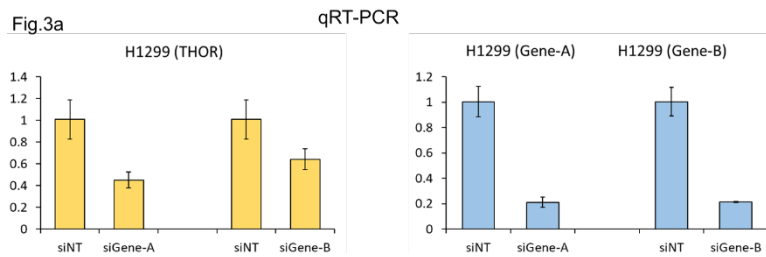
研究方法として、以下の4段階に分けて実験を遂行する。1) Luciferase assay を用いた、THOR のプロモーターにおける最小転写責任領域の同定。2) 免疫沈降法と質量分析法を組み合わせた、THOR プロモーターに結合する転写因子の網羅的な解析。3) Luciferase assay と低分子化合物ライブラリーを併用した、THOR の転写調節点をターゲットとした低分子化合物の同定。4) 動物モデルを用いた低分子化合物の効果判定。



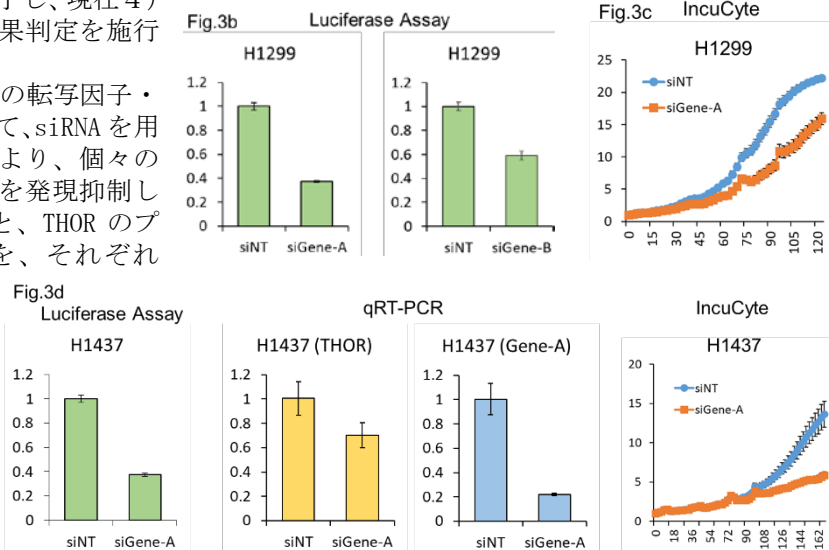
4. 研究成果

本研究開始前までに申請者らは既に1)と2)の途中までを終えており、THOR の転写制御に関わる転写因子・転写関連因子の候補を既に5個同定していた (Fig. 2)。本研究期間内の成果として、それらの転写因子・転写関連因子の絞り込みと、3)の低分子化合物の同定までを終了し、現在4)の動物モデルを用いた効果判定を施行中である。

具体的には、まず5個の転写因子・転写関連因子候補について、siRNAを用いた遺伝子発現抑制法により、個々の転写因子・転写関連因子を発現抑制した際の THOR の発現変化と、THOR のプロモーター活性の変化を、それぞれ



qRT-PCR 法と Luciferase assay 法により確認した。その結果、5個中2個の転写因子について、それらの発現抑制による、THOR の発現低下と (Fig. 3a)、THOR のプロモーター活性の低下が

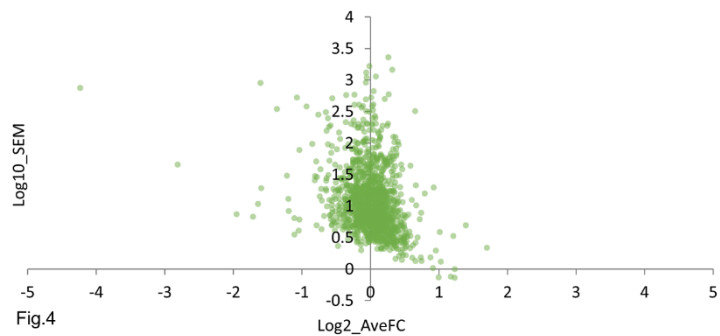


確認できた (Fig. 3b)。これらの
またこれらの転写因子の発現抑制
による細胞増殖の低下も確認
できた (Fig. 3c)。以上の表現型
の変化は、THOR を高発現してい
る別の肺非小細胞がん細胞株に
おいても確認することが出来た
(Fig. 3d)。

次に、化合物の THOR の転写制
御点への直接的あるいは間接的
な影響を調べるため、市販薬

1200 個の低分子化合物ライブラリー治療時における THOR のプロモーターの luciferase activity を見る luciferase assay を行い、THOR の転写制御点に作用する可能性のある化合物候補を抽出した (Fig. 4)。

現在は、個々の化合物の効果判定を行っており、その結果をもとに THOR 高発現がんに対する新規治療薬の開発に繋げていきたいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細野祥之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたがん研究
3. 学会等名 第三回学際的がん研究夏の学校
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----