

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22576

研究課題名（和文）がん関連遺伝子の3'UTRを介した新たな発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying gene expression mediated by 3'UTR of cancer-related gene

研究代表者

小根山 千歳（Oneyama, Chitose）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍制御学分野・分野長

研究者番号：90373208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、がん関連遺伝子の3'UTRを介した新たな発現制御機構の解明である。これまでの研究により、がん細胞の生存・運動に重要なRictor遺伝子の発現を3'UTRを介して抑制する低分子化合物を見出した。そこで化合物の標的蛋白質候補の同定を行うため、分子プローブ法に加え、独自に開発した”プロテアーゼ感受性の変化を利用した標的特定法”によって、スプライシング・転写・翻訳制御に関わることが知られている3つの蛋白質を同定した。詳細な解析から、1つのRNA結合蛋白質が化合物の標的蛋白質であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究内容にあるmiRNAの作用を低分子化合物により代替するというアイデアは極めて斬新なものである。元来miRNAは遺伝子の主に3'UTRを介し核酸配列の相補性に基づいて作用するため、核酸医薬を用いずに低分子を用いて代替できるとは考えられていなかった。しかし、私は3'UTRを標的とするスクリーニングに挑戦し、Rictor遺伝子の発現調節過程を低分子化合物によって制御することに成功した。本研究によってその分子基盤解明に挑戦することは、特定の遺伝子発現を3'UTRを介して制御する新しい原理の発見につながる点で、これまでの遺伝子発現制御機構の研究及び対がん創薬研究を大きく変革させる潜在性を有する。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate a new mechanism of expression regulation via the 3'UTR of cancer-related genes. Through our previous studies, we found a small molecule compound that suppresses the expression of Rictor gene, which is important for the survival and motility of cancer cells, via the 3'UTR. In order to identify candidate target proteins of the compounds, we identified three proteins known to be involved in the regulation of splicing, transcription, and translation by using the originally developed "target identification method using changes in protease sensitivity" in addition to the molecular probe method. We identified three proteins known to be involved in splicing, transcription, and translation regulation. Detailed analysis revealed that one RNA-binding protein was the target protein of the compound.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん関連遺伝子 3'UTR 発現制御機構 Rictor 化合物

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで代表的ながん原遺伝子産物 c-Src によるがん化メカニズムの解明に取り組んできた。その過程で Src シグナル依存的に発現変化する microRNA 群から新たなシグナルネットワークを明らかにした(Oneyama et al., *J Biochem* 2015: Review)。その一つが miR-424/503 クラスター及びその標的遺伝子 Rictor である。Rictor は細胞の生存・運動の制御に重要な mTOR 複合体 2 (mTORC2)の必須構成因子であり、miR-424/503 は結果として mTORC2 活性を制御する機能を持つ (Oneyama et al., *PLoS One* 2013)。miR-424/503 は Src 活性が高い大腸・前立腺がん細胞及び組織で Rictor 発現と逆相関を示し、がん細胞に miRNA クラスターを導入して Rictor 発現を抑制すると、そのがん形質を顕著に抑制することがわかった。

私は、この microRNA の作用を低分子化合物により代替できれば、革新的な抗がん剤候補分子となると着想した。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR 領域に rictor 3' UTR 領域を挿入したレポータースクリーニング系を構築した。理研にて東大コアラライブラリー及び理研 NPDepo ライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、ヒット化合物の検証の結果、選択的ながん形質抑制能と Rictor 蛋白質の発現低下を示す化合物を得た。うち安定性・合成容易性から選択した 1 化合物は 10 μ M で大腸がん細胞のがん形質(足場非依存的増殖能)を 90%以上抑制した。つまり、microRNA の作用を、低分子化合物により代替できる可能性が実現化しつつあり、今後さらなる化合物最適化と作用メカニズム解明を急ぐべき段階にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん関連遺伝子の 3' UTR を介した新たな発現制御機構の解明である。遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR)は、microRNA との相互作用などを通じて、翻訳産物の発現を調節する重要な機能を持つ。私は Rictor 遺伝子の 3' UTR を介した制御機構が、低分子化合物によって選択的に抑制できることを発見した。この知見は、特定の遺伝子発現をその転写後に制御する未知のメカニズムが存在し、低分子化合物によりそこに干渉できることを示唆する。本研究では、化合物の作用機序解明を通じその正体を明らかにすることを目指す。また本研究により、3' UTR を介した制御を標的とした低分子化合物探索の有用性を検証する。そのため以下の目標に向け取り組むこととした。

- 1) 化合物の標的候補蛋白質の同定
- 2) 標的蛋白質の Rictor 発現に対する作用
- 3) 標的蛋白質のがん形質に対する役割

3. 研究の方法

- (1) 化合物の標的候補蛋白質の同定

成功率を上げるため、二つの手法を用いて標的候補蛋白質を探索した。

- (a) 分子プローブ法

ビオチンを付加した化合物 (研究協力者の名古屋大学創薬科学研究科の兒玉哲也准教

授にて合成)を準備し、大腸がん細胞の抽出液を加えて、化合物と標的候補分子を反応させる。化合物にはビオチンが付加しているため、ストレプトアビジンビーズにより特異的に回収できる。化合物のビオチンを付加する部位については、いくつか適当と思われる部位に付加後、大腸がん細胞におけるがん形質抑制と Rictor 蛋白質の発現低下を解析し、活性を失わない部位を選択した。

(b) “プロテアーゼ感受性の変化を利用した標的特定法”

この手法は、化合物が結合した蛋白質では、細胞内プロテアーゼに対する感受性が変化することを利用する。大腸がん細胞抽出液に本化合物あるいは対照化合物(Rictor 発現・がん形質抑制作用がない誘導体)を反応させ、反応液を電気泳動し検出する。この際、本化合物と対照化合物間で特定の蛋白質量の変化が見られる反応条件(化合物/蛋白質濃度・温度・時間)を決定する。この方法では、化合物添加により標的蛋白質のコンフォメーションが変化し、それによって細胞内在性のプロテアーゼによる分解が起こりやすくなることを利用するため、化合物間で染色された蛋白質量の変化が見られたものが標的候補分子となる。

(a), (b)いずれも反応条件の最適化後スケールアップし、回収した標的候補分子を LC-MS/MS 解析により同定した。同定後は、各候補分子の特異的抗体を用いて確認した。

(2) 標的蛋白質の Rictor 発現に対する作用

(1) で同定した化合物の標的候補蛋白質は、この時点では化合物と相互作用が確認されているだけであり、直接/間接的に作用するのか、また化合物がその機能を促進/抑制するのかは明らかでない。そこで機能的意義を検証するため、大腸がん細胞において標的候補分子の過剰発現及びノックダウンを行い、Rictor 発現及び下流シグナルの活性化を調べた。

またその分子のドメイン構造や既知の機能、局在、及び相互作用する分子の機能を手がかりに、同定した標的蛋白質がどのような分子機構で 3' UTR 依存的な発現制御に関与しているか検討した。

(3) 標的蛋白質のがん形質に対する役割

(2) で作製した化合物標的分子のがん細胞におけるノックダウン細胞について、Rictor 依存的ながん形質を調べた。具体的にはがん形質の指標である足場非依存性増殖能を軟寒天コロニーアッセイによって解析した。

4. 研究成果

(1) 化合物の標的候補蛋白質の同定

(a) まず化合物のビオチン付加体を作製し、その活性を大腸がん細胞におけるがん形質抑制と Rictor 蛋白質の発現低下について解析したところ、元の化合物と比べ 70%程度活性が保持されていたことから、結合蛋白質の同定に用いることとした。具体的には、ビオチンタグを付加した化合物 (RU009) に Rictor 発現の高い大腸がん細胞 HCT116 の

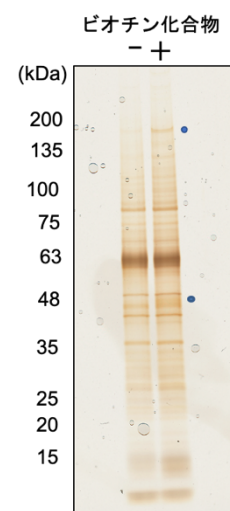


図1. 分子プローブ法による標的蛋白質の探索

抽出液を加えストレプトアビジンビーズにより結合蛋白質を回収した (図 1)。結合蛋白質の捕捉を SDS-PAGE 後銀染色を行うことで確認し、LC-MS/MS 解析に供した。

(b) 独自に開発した化合物依存的プロテオリシスを検出する”プロテアーゼ感受性の変化を利用した標的特定法”によって、化合物が結合する標的蛋白質の同定を試みた。大腸がん細胞抽出液に本化合物 (RU001)あるいは対照化合物 (より活性の高い RU004、活性が失われた RU005)をいくつかの濃度で反応させ、特定の蛋白質量の変化がみられる反応条件を検討・至適化した。その結果、37°C, 0/N の条件において化合物と反応させた細胞抽出液を LC-MS/MS 解析に供した。

(a) (b) の方法において得られた結果から、本化合物の標的蛋白質候補として、これまでスプライシング・転写・翻訳制御に関わることが知られている 3 つの蛋白質 (蛋白質 A, B, C) を同定した (図 2)。

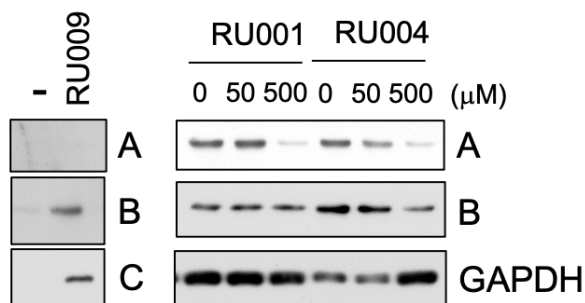


図2. 標的候補蛋白質の同定

左：分子プローブ法
右：プロテアーゼ感受性変化法

(2) 標的蛋白質の Rictor 発現に対する作用

(1) で同定された標的蛋白質候補の機能的意義を検証するため、大腸がん細胞 HCT116 において標的候補分子の siRNA を用いてノックダウンを行い、ウエスタンブロット解析により Rictor 発現及び下流シグナルである AKT の活性化を調べた。その結果、3 つの候補蛋白質のうち、2 つの候補分子をノックダウンしても Rictor の発現に変化はみられなかったが、1 つの候補 (蛋白質 B) においてノックダウンにより Rictor 発現低下とそれに伴い mTORC2 下流シグナルである AKT のリン酸化低下がみられた。この蛋白質 B は (1) の標的蛋白質同定のための両方の方法で同定された分子であった。

さらにノックダウンした上に蛋白質 B の発現をレスキューすると、Rictor の発現もそれに応じてレスキューされた。一方、蛋白質 B を細胞に過剰発現すると、Rictor の発現も増加することがわかった。これらのことから、化合物の標的候補分子として同定された蛋白質 B は、Rictor の発現を制御していることが明らかとなった。

そこで、Rictor の 3' UTR に蛋白質 B が結合しているか、RIP (RNA immunoprecipitation) 法により検証した。HCT116 細胞の細胞抽出液に蛋白質 B の抗体あるいはコントロール抗体を加え免疫沈降を行い、Rictor 3' UTR のいくつかの箇所をプローブとしてリアルタイム PCR により解析したところ、蛋白質 B が Rictor 3' UTR に直接結合していることが明らかとなった。またこの結合は化合物により弱くなることから、化合物は標的蛋白質の RNA 結合を介した機能を抑制し、Rictor 発現減少を介したがん抑制活性を発揮することが示唆された。

現在、どのような分子機構で蛋白質 B が Rictor 3' UTR を介して Rictor の発現を制御するのかについて詳細な解析を行っている。

(3) 標的蛋白質のがん形質に対する役割

蛋白質 B のがん形質に対する作用を調べるため、Rictor の発現の高いいくつかの細胞種（大腸癌、肺癌、膵癌、トリプルネガティブ乳癌）において蛋白質 B をノックダウンし、足場非依存性増殖能を解析した。その結果、どの細胞においても顕著な足場非依存性増殖の抑制が見られた。一方、足場依存性増殖については抑制がみられず、蛋白質 B は cell proliferation には作用しないことが明らかとなった。この結果は、Rictor ノックダウンの結果と同様であった。これらのことから、蛋白質 B は Rictor 発現を制御することにより、がん細胞増殖を特異的に抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Daisuke Okuzaki, Tomoe Yamauchi, Fumie Mitani, Mamiko Miyata, Risayo Watanabe, Chitose Oneyama	4. 巻 111
2. 論文標題 c-Src promotes tumor progression through downregulation of microRNA-129-1-3p	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 418-428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14269.	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 Misako Yajima, Mamiko Miyata, Kazufumi Ikuta, Yasuhisa Hasegawa, Chitose Oneyama, Teru Kanda	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficient Epstein-Barr Virus Progeny Production Mediated by Cancer-Derived LMP1 and Virally-Encoded microRNAs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 E119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7050119	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 Watanabe R, Miyata M, Oneyama C.	4. 巻 531
2. 論文標題 Rictor promotes tumor progression of rapamycin-insensitive triple-negative breast cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun,	6. 最初と最後の頁 636-642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.012.	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 Hikita T, Miyata M, Watanabe R, Oneyama C	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo imaging of long-term accumulated cancer-derived exosomes by CD63-fused BRET reporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73580-5	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 Nishimura T, Oyama T, Hu HT, Fujioka T, Hanawa-Suetsugu K, Ikeda K, Yamada S, Kawana H, Saigusa D, Ikeda H, Kurata R, Oono-Yakura K, Kitamata M, Kida K, Hikita T, Mizutani K, Yasuhara K, Mimori-Kiyosue Y, Oneyama C, Kurimoto K, Hosokawa Y, Aoki J, Takai Y, Arita M, Suetsugu S.	4. 巻 56
2. 論文標題 Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Cell	6. 最初と最後の頁 842-859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.02.029	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小根山千歳、山内友恵、奥崎大介
2. 発表標題 MicroRNA-mediated SFK signaling network in tumor progression
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内友恵、小根山千歳、
2. 発表標題 Srcがん化初期シグナルを制御するmicroRNAの役割
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小根山千歳
2. 発表標題 がんにおけるエクソソームの分泌亢進メカニズム
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 疋田智也、小根山千歳
2. 発表標題 がん細胞由来エクソソームのin vivoイメージング
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三谷文美絵、小根山千歳
2. 発表標題 Src依存的エクソソーム分泌亢進におけるSNAREタンパク質の機能
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Hikita, Chitose Oneyama
2. 発表標題 In vivo imaging of long-term accumulated cancer-derived exosomes by CD63-fused BRET reporter
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 Fumie Mitani, Chitose Oneyama
2. 発表標題 The role of SNARE-protein on the Src-mediated upregulation of exosome secretion
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 小根山千歳
2. 発表標題 がん細胞のエクソソームの分泌亢進機構とその意義
3. 学会等名 第93回生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小根山千歳
2. 発表標題 Molecular mechanisms governing exosome biogenesis in cancer cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 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
研究協力者	兒玉 哲也 (Kodama Tetsuya)		

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
---------	---------