

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390077

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子型microRNAの統合的スクリーニングと核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Integrated approach for identification of tumor-suppressive microRNAs and clinical application to miRNA-based therapy for cancers

研究代表者

小崎 健一 (Kozaki, Ken-ichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50270715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、内在性の機能性低分子RNAであるmicroRNA(miRNA)に着目し、合成二本鎖miRNAライブラリーの機能的スクリーニングと腫瘍特異的CpG island過剰メチル化を指標とした網羅的DNAメチル化スクリーニングを基盤とする統合的解析(Functional genomics)によって、新たな癌RNA創薬に寄与する癌抑制遺伝子型miRNAを同定する事を目的とする。本研究課題によって、3種類の新規癌抑制遺伝子型miRNA、1種類の新規EMT抑制性miRNA、ならびにそれらのmiRNAの直接的標的分子を同定し、癌抑制遺伝子型miRNAの核酸医薬としての有効性をも実証した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify tumor-suppressive microRNAs(miRNAs) and their direct targets, which potentially contribute to the development of clinical application to miRNA-based therapy for cancers. Actually, in this study, three tumor-suppressive miRNAs, one EMT-suppressive miRNA, and their direct targets were identified through our integrated approach using function- and methylation-based screenings. Moreover, we demonstrated here the great potential of double-stranded RNAs(dsRNA) mimicking sequences of tumor-suppressive miRNAs to be applied to miRNA-based therapy for cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌 microRNA 癌抑制遺伝子 DNAメチル化異常 分子腫瘍学 治療ゲノム学

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子や癌抑制遺伝子に関する研究の飛躍的な進展により、「癌は遺伝子の病気」として発癌に関するメカニズムが徐々に解明され、予防・診断・治療に臨床応用されつつある。特に、癌細胞の増殖に関わる分子を直接的に阻害する「分子標的治療薬」に関しては、Bcr-Abl チロシンキナーゼおよび KIT チロシンキナーゼを標的とするイマチニブメシル酸塩(グリベック®)や変異 EGFR を標的とするゲフィチニブ(イレッサ®)等での有効性の実証によって、分子標的治療薬が狙い撃ちする標的分子、即ち「がん遺伝子中毒(Oncogene addiction)」を惹起する Driver oncogene の臨床的な重要性が再認識された。現在、臨床応用されている主な分子標的治療薬は低分子化合物とモノクローナル抗体であるが、今や基礎医学生物学には不可欠となった short interfering RNA (siRNA)も核酸医薬としての応用が期待されている。遺伝子から転写される mRNA を直接的な標的とする siRNA は、off-target 効果等の安全性や生体内での安定性、あるいはデリバリーシステム等、解決すべき課題も多いものの、全ての遺伝子に対しての適応が可能である優れた利点を持つ事から、癌を含む様々な疾患においてそれら責任遺伝子を標的とする RNA 創薬を目指した基礎研究が進められている。

一方、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目されている microRNA (miRNA) は、蛋白質へは翻訳されない non-coding RNA であるが、標的分子の蛋白発現を転写後の配列特異的な RNA サイレンシングによって抑制する機能性低分子 RNA である。研究開始当初には、数十種類の miRNA について、蛋白質をコードする既知の癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同様に、発癌・進展過程の分子機序への関与が報告されていた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ゲノム情報発現系の内在性制御機序を担う新たな機能性低分子 RNA として注目されている miRNA に着目し、合成二本鎖 miRNA (ds-miRNA)ライブラリーの機能的スクリーニングと CpG island における腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化を指標とした網羅的 DNA メチル化スクリーニングを基盤とする統合的解析(Functional genomics)を進め、癌治療体系における新たな RNA 創薬に寄与する癌抑制遺伝子型 miRNA (TS-miRNA)とその標的分子を単離・同定し、さらには、癌抑制遺伝子型 miRNA による癌の新規治療法の開発をも試みる事である。

3. 研究の方法

複数の癌腫において、1) 癌抑制遺伝子活性を指標とした ds-miRNA ライブラリーの機能的スクリーニング、ならびに 2) 腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化の検出に特化した網羅的スクリーニングを展開し、これらに 3) 定量的発現解析等を組み合わせた統合的解析を強力に推進す

る事によって、TS-miRNA とその(癌遺伝子様)標的分子における分子機序の解明を行う。さらに、TS-miRNA による新たな癌治療体系の構築に寄与すべく、4) ds-miRNA ならびに標的分子の siRNA デリバリーシステムの詳細な検討を試み、抗癌剤としてのアンチセンス核酸医薬への応用や分子標的治療等の新たなテーラード医療の実現を目指す。

4. 研究成果

平成 23 年度は、*in vitro* 細胞増殖抑制効果を指標とした 327 種類の miRNA 配列を搭載した ds-miRNA ライブラリーの機能的スクリーニングを行い、さらに、癌細胞株と臨床検体における DNA メチル化解析ならびに発現解析を組み合わせた統合的解析によって、口腔扁平上皮癌(OSCC)あるいは子宮体癌(EC)において DNA メチル化異常により発現抑制される新規 TS-miRNA として *miR-218* と *miR-152* を同定した。また、これらの TS-miRNA に共通する新規標的分子 *Rictor* を同定した。一方、詳細な *in vitro* 解析から、*miR-218* は *Rictor* を標的分子とする事によって TOR-Akt シグナル経路を負に制御する事を明らかにした(Uesugi, et al. *Cancer Res.*, 2011)。加えて、*miR-152* 配列を有する ds-miRNA を用いた *in vivo* 解析を施行し、TS-miRNA による miRNA replacement therapy の癌治療における有効性を示した(Tsuruta, et al. *Cancer Res.*, 2011)。

平成 24 年度は、OSCC 細胞株における CpG island 5'側近傍に座位する miRNA を対象とした網羅的 DNA メチル化スクリーニングと定量的発現解析を組み合わせた絞り込みを施行し、新規 TS-miRNA として *miR-596* を同定した。また、OSCC 症例における DNA 過剰メチル化と臨床病理学的悪性度との相関性、ならびに *in vivo* 実験系における新規抗癌剤としての有用性等をも明らかにした。一方、*miR-596* の細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導による事、さらに、*miR-596* の直接的な標的分子として *LGALS3BP* を同定し、*miR-596* が *LGALS3BP* の発現・翻訳阻害を介して ERK1/2 のリン酸化を抑制し、細胞増殖を負に制御する事を明らかにした(Endo et al., *Carcinogenesis*, 2013)。

近年、上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)は、正常の発生過程に加え、がん等の疾患への関与が注目されている。平成 25 年度は、EMT 抑制性 miRNA を探索すべく、E-カドヘリンのプロモーター活性を蛍光値として検出可能な独自の *in vitro* 機能的探索モデル系を確立し、同モデル系を用いた 470 種類の ds-miRNA ライブラリーの機能的探索によって、新規 EMT 抑制性 miRNA である *miR-655* を同定した。*miR-655* の強制発現系では、E-カドヘリンの発現上昇や典型的な EMT 誘導遺伝子の発現低下のみならず、間葉系細胞の上皮系細胞への形態変化を伴った運動能と浸潤能の抑制を認めた。加えて、食道扁平上皮癌(ESCC)においては、*miR-655* 発現と予後に有意に相関を認めた。さらに、TGF-β シグナル経路において

重要な遺伝子である *ZEB1* と *TGFBR2* が *miR-655* の直接的な標的遺伝子である事を明らかにした。これらの結果から、*miR-655* の発現低下が TGF- β -ZEB1-E-カドヘリン経路を活性化し、がん細胞の悪性形質獲得を促進する事が示唆された(Harazono et al., *PLOS ONE*, 2013).

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 11 件、全て査読あり)

1. Yamamoto, S., Inoue, J., Kawano, T., Kozaki, K., Omura, K. and Inazawa, J.: The Impact of miRNA-Based Molecular Diagnostics and Treatment of NRF2-Stabilized Tumors. *Mol. Cancer Res.*, 12: 58-68, 2014.
2. Harazono, Y., Muramatsu, T., Endo, H., Uzawa, N., Kawano, T., Harada, K., Inazawa, J. and Kozaki, K.: *miR-655* is an EMT-suppressive microRNA targeting *ZEB1* and *TGFBR2*. *PLOS ONE*, 8: e62757, 2013.
3. Furuta, M., Kozaki, K., Tanimoto, K., Tanaka, S., Arii, S., Shimamura, T., Niida, A., Miyano, S. and Inazawa, J.: The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLOS ONE*, 8: e60155, 2013.
4. Endo, H., Muramatsu, T., Furuta, M., Uzawa, N., Pimkhaokham, A., Amagasa, T., Inazawa, J. and Kozaki, K.: Potential of tumor-suppressive *miR-596* targeting *LGALS3BP* as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis*, 34: 560-569, 2013.
5. Kozaki, K. and Inazawa, J.: Tumor-suppressive microRNA silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Cancer Sci.*, 103: 837-845, 2012.
6. Matsumura, S., Imoto, I., Kozaki, K., Matsui, T., Muramatsu, T., Furuta, M., Tanaka, S., Sakamoto, M., Arii, S. and Inazawa, J.: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 18: 3541-3551, 2012.
7. Ono, H., Imoto, I., Kozaki, K., Tsuda, H., Matsui, T., Kurasawa, Y., Muramatsu, T., Sugihara, K. and Inazawa, J.: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*, 31: 4923-4934, 2012.
8. Kurasawa, Y., Kozaki, K., Pimkhaokham, A., Muramatsu, T., Ono, H., Ishihara, T.,

Uzawa, N., Imoto, I., Amagasa, T. and Inazawa, J.: Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene*, 31: 1963-1974, 2012.

9. Ishihara, T., Inoue, J., Kozaki, K., Imoto, I. and Inazawa, J.: The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J. Biol. Chem.*, 286: 44086-44094, 2011.
10. Tsuruta, T., Kozaki, K., Uesugi, A., Furuta, M., Hirasawa, A., Imoto, I., Susumu, N., Aoki, D. and Inazawa, J.: miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res.*, 71: 6450-6462, 2011.
11. Uesugi, A., Kozaki, K., Tsuruta, T., Furuta, M., Morita, K., Imoto, I., Omura, K. and Inazawa, J.: The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.*, 71: 5765-5778, 2011.

(学会発表) (計 5 件)

1. Kozaki, K. and Inazawa, J.: Function-based screening of EMT-suppressive microRNA by CDH1/E-cadherin-promoter activity. *Symposia* "MicroRNA for cancer therapy and diagnosis", *72st Annual Meeting of Japanese Cancer Association* (Yokohama), 2013.
2. Kozaki, K.: Function-based screening of EMT-suppressive microRNA in cancer cells. Symposium X "Targeting Cancer Stem Cells and EMT", *2013 SNUCRI & SNUCH Cancer Symposium* (Jeju, Korea), May 4 (Sat), 2013. (招待講演)
3. Kozaki, K., Endo, H. and Inazawa, J.: Methylation-based screening of tumor-suppressive microRNAs in cancer cells. *Symposia* "Recent progress of non-coding RNA and cancer", *71st Annual Meeting of Japanese Cancer Association* (Sapporo), 2012.
4. 小崎健一、稲澤譲治: DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の機能的スクリーニング. シンポジウム 1 「small RNA と疾患」, *日本人類遺伝学会 第 56 回大会・第 11 回 東アジア人類遺伝学会* (幕張), 2011.
5. Kozaki, K. and Inazawa, J.: Function-based screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer cells. *Symposia* "Cancer epigenetics:

Breakthroughs in basic research and clinical applications”, *70th Annual Meeting of Japanese Cancer Association* (Nagoya), 2011.

(図書)(計 1 件)

1. 小崎健一、古田繭子、井本逸勢、稲澤譲治: 肝細胞癌関連 microRNA. 肝細胞癌の早期診断; 画像と分子マーカー. (株) アークメディア社, 肝細胞癌の早期診断; 画像と分子マーカー, (監: 編集) 有井滋樹, 松井 修, 241-249, 2012.

(産業財産権)

○取得状況(計 3 件)

名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 富士フィルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学
種類: 特許権
番号: 特許第 5116026 号
取得年月日: 2012 年 10 月 26 日
国内外の別: 国内

名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 富士フィルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学
種類: 特許権
番号: US 8183223 B2
取得年月日: 2012 年 5 月 22 日
国内外の別: US (米国)

名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 富士フィルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学
種類: 特許権
番号: EP 2 088 208 B1 (独: 60 2009 001 116.2-08)
取得年月日: 2011 年 4 月 27 日
国内外の別: EP (ヨーロッパ)

(その他)

ホームページ等

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝分野:

http://aqua.tmd.ac.jp/ResDB/DispRsch/dsp_resdata.php?id=1694&la=ja

KALEN:

<http://kaken.nii.ac.jp/d/r/50270715>

ReaD&Researchmap:

<http://researchmap.jp/read0203939/>

(1)研究代表者

小崎健一 (東京医科歯科大学 難治疾患研究 准教授)

研究者番号: 50270715

(2)研究分担者

稲澤譲治 (東京医科歯科大学 難治疾患研究 教授)

研究者番号: 30193551