

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06885

研究課題名(和文) 乳癌悪性転化の予防・治療を標的とする革新的核酸医薬の創出

研究課題名(英文) Innovative nucleic acid medicine targeted for prevention and treatment of malignant transformation of breast cancer

研究代表者

吉田 徳之(Yoshida, Noriyuki)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：10363996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトEphA2アンチセンスRNA(AS)に関して次のことを明らかにした。1. ヒトEphA2 ASの同定、発現。2. ヒトEphA2 AS発現を抑制するセンスデオキシヌクレオチド(seODN)の設計と同mRNAに対する作用効果及び作用領域。3. ヒトEphA2 ASの乳癌培養細胞を用いた生理的機能。以上の結果から、ヒトEphA2 ASは限定された領域を介して同mRNAを安定化させ、細胞増殖及び細胞遊走に参与することを示唆した。更に、ヒトEphA2 AS及び同mRNAを標的とするmiRNAを同定し、上記seODNとの併用による相乗効果の可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the following was clarified with respect to human EphA2 antisense RNA (AS). 1. Identification and expression of human EphA2 AS. 2. Design of sense deoxynucleotide (seODN) to inhibit human EphA2 AS expression and effects and interacting region on mRNA. 3. Physiological functions of breast cancer cells of human EphA2 AS. These results suggested that human EphA2 AS stabilizes the mRNA through the limited region and is involved in cell proliferation and cell migration. Furthermore, miRNAs targeting human EphA2 AS and mRNA were identified, and the possibility of a synergistic effect by combination with seODN was proposed.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：非コード性RNA 乳癌 核酸医療

## 1. 研究開始当初の背景

EphA2 の過剰発現が乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、食道癌、腎臓癌、子宮頸癌及び黒色腫で報告され、さらに EphA2 が癌の転移に関与することが実験的に数多く報告されている (Zelinski *et al.*, *Cancer Res.*, 2001)。その遺伝子発現調節機構、中でも転写後性制御については、miR-26b、miR-200a、miR-520d-3p が EphA2 mRNA の発現を抑制することが知られている (Nishimura *et al.*, *Cancer Discov.*, 2013)。しかしながら、miRNA 以外の非コード性 RNA、特に逆鎖から転写されるアンチセンス RNA による制御は知られていない。

報告者は、臨床試験及びトランスレショナルリサーチに従事し、乳癌治療や予後予測に興味を持ち、研究実績を積んできた (Qian *et al.*, *Cancer Sci.*, 2011, Ohno *et al.*, *Breast Cancer Res. Tr.*, 2013)。また、所属研究室では、宿主自然免疫領域における転写後性の遺伝子発現制御メカニズムを調べており、実用化に向けて POC (Proof of concept) まで済ませている。これを基礎とした創薬シーズ開発を、乳癌治療に適用範囲を拡大できないかと計画するに至った。すなわち、動物実験まで進行している所属研究室の知見を生かし、EphA2 mRNA の同アンチセンス RNA 及び miRNA を介した調節機構を解明し、乳癌をモデルとする癌治療開発における創薬シーズ発掘へと発展させることを着想した。

## 2. 研究の目的

報告者は、乳癌、前立腺癌、肺癌、食道癌、大腸癌などに高発現し、癌の進展、腫瘍血管形成、浸潤・転移、薬剤耐性などの癌における様々な悪性化に関わるとの報告がある EphA2 について創薬シーズとして注目した。EphA2 発現とその活性制御は、癌患者における予後や治療という点からも重要と考えられるが、その転写後性制御については異なる癌ではあるが、3 つの miRNA によって発現が抑制されることが分かっている。しかしながら、miRNA 以外の非コード性 RNA、特に逆鎖から転写されるアンチセンス RNA による制御は知られていない。そこで、上記の非コード性 RNA による EphA2 の転写後性発現調節機構を解明し、その人為的な発現調節を検討することにより、癌悪性化防止を目的とする核酸医薬開発のためのシーズ創出を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト EphA2 アンチセンス RNA の構造・機能・発現解析

ノーザンブロッティング、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法、定量的 PCR を用いて、ヒト EphA2 アンチセンス RNA の同定と発現解析を行った。

### (2) ヒト EphA2 アンチセンス RNA の生理的機能の検証

細胞数カウント、Wound healing アッセイにより、細胞増殖、細胞遊走に関して評価した。

### (3) ヒト EphA2 アンチセンス RNA を標的とする miRNA の探索

ヒト EphA2 アンチセンス RNA を標的とする miRNA を miRDB、Targetscan、miRWalk、RNA22、RNA hybrid などの miRNA 標的検索ウェブサイトを用いて検索した。絞り込んだ miRNA に関して、ヒト EphA2 アンチセンス RNA との相互作用を合成 miRNA 及び AntimiR を用いて検証した。

## 4. 研究成果

### 研究の主な成果

#### (1) ヒト EphA2 アンチセンス RNA の構造・機能・発現解析

ヒト EphA2 アンチセンス RNA はポリ A 鎖を有し、全長 1.9 kb 及び 5 kb と推定された。RACE の結果から、ポリ A 鎖を除くと、全長 990 b 及び 1282 b の 3' 端が異なる 2 種類のヒト EphA2 アンチセンス RNA が存在することが示唆された。また、1282 b のヒト EphA2 アンチセンス RNA は、同 mRNA とは異なるスプライシングを有していた。

申請前までの研究から、ヒト EphA2 アンチセンス RNA の制御機能中心を予測し、その機能を抑制するオリゴ (seODN) を設計し、これらの seODN は EphA2 アンチセンス RNA 発現抑制を介して同 mRNA の発現を抑制することが推測されていた。しかしながら、結果が不安定なことから、ヒト EphA2 アンチセンス RNA、同 mRNA 共に 1 本鎖であり、かつ種間で保存されている領域に seODN を再設計し、seODN 安定化のための LNA 化、トランスフェクション試薬の再検討を行ったところ結果が安定するようになった。

ヒト乳癌培養細胞において、ヒト EphA2 アンチセンス RNA 過剰発現によって同 mRNA の発現量が増大した。また、特定の seODN を用いた時にのみ、ヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA の発現を減少させた。更に、この特定の seODN 領域に関して、変異型ヒト EphA2 アンチセンス RNA を作製して過剰発現させたところ、同 mRNA に対する発現減少効果は見られなくなった。これらの結果から、ヒト EphA2 アンチセンス RNA と同 mRNA とは発現に関して正の相関関係があることを示唆したのみならず、ヒト EphA2 アンチセンス RNA の同 mRNA に対する限定された作用部位を同定することができた。

更に、AHCC(活性化糖類関連化合物)はヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA の発現を減少させた。この結果をゲノムワイドなトランスクリプトーム解析により検証し、ヒト EphA2 mRNA は NFkappaB を介して細胞増殖に、Rac1 を介して細胞遊走に関与していることが推測された。

(2) ヒト EphA2 アンチセンス RNA の生理的機能の検証

上記(1)の結果から、細胞増殖と細胞遊走における EphA2 アンチセンス RNA の生理的機能を検証するために、seODN または AHCC によりヒト EphA2 アンチセンス RNA を抑制した。その結果、同 mRNA の発現量低下を伴って細胞増殖及び細胞遊走が抑制された。更にレポーターアッセイにより、seODN または AHCC でヒト EphA2 アンチセンス RNA を抑制すると NFkappaB 及び Rac1 転写活性が抑制された。

以上の結果より、ヒト EphA2 アンチセンス RNA は同 mRNA に直接的に作用して安定化させ、最終的に NFkappaB を介して細胞増殖に、Rac1 を介して細胞遊走に関与することが示唆された。

(3) ヒト EphA2 アンチセンス RNA を標的とする miRNA の探索

ヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA を標的とする miRNA を miRNA 標的検索ウェブサイトを検索した。その結果、miR-126, miR-335, miR-4267 がヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA を標的とすることが推測された。これら 3 種の miRNA に関して、ヒト EphA2 アンチセンス RNA 又は/及び同 mRNA との相互作用を合成 miRNA (miRNA の機能領域のみ) 及び miRNA 発現を抑制する antimiR を用いて検証した。前述 3 種の miRNA に関して合成 miRNA を乳癌培養細胞内に導入すると、特に miR-335 に関して、ヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA の発現量が減少した。一方、AntimiR により前述 3 種の miRNA に関して機能を抑制すると、ヒト EphA2 アンチセンス RNA 及び同 mRNA の発現量が増大した。以上の結果から、miR-126, miR-335, miR-4267 はヒト EphA2 アンチセンス RNA、同 mRNA の両方又は前者を標的とすることが示唆された。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでに EphA2 mRNA の発現を調節する miRNA 以外の非コード性 RNA、特に逆鎖から転写されるアンチセンス RNA による制御は知られていなかった。今回の報告によ

り、ヒト EphA2 mRNA 発現を調節する同アンチセンス RNA を発見し、さらに mRNA とアンチセンス RNA を(同時に)発現抑制する miRNA を探索、検証するに至った。これら 2 点に関して、新規性と応用面でのインパクトがあると考えられる。

今後の展望

上記 1 で創出した seODN と上記 3 で探索・検証した miRNA とを併用することでヒト EphA2 mRNA 発現抑制を相乗的に発揮させることができると期待される(図)。

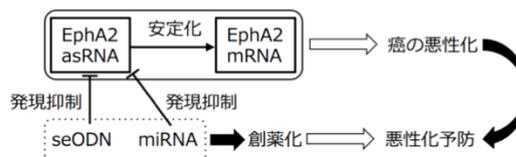


図 本研究で見出された創薬シーズの臨床応用構想

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 14 件)

- ① Noriyuki Yoshida, Tominori Kimura (2017) Pathogen-associated regulatory non-coding RNAs and oncogenesis. *Front. Biosci.*, 22:1599-1621., 査読有, <https://www.bioscience.org/2017/v22/af/4560/fulltext.htm>
- ② Tominori Kimura, Shiwen Jiang, Noriyuki Yoshida, Ryou Sakamoto, Mikio Nishizawa (2015) Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72: 2749-2761., 査読有, DOI: 10.1007/s00018-015-1875-5.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 内在性インターフェロン- $\alpha$ 1 アンチセンス RNA はネットワークを形成し、miR-1270 に拮抗するアクセシビリティの高い ceRNA として機能する、吉田徳之、蔣時文、坂本凌、尾川原彩、近藤芽衣、道淵真史、木村富紀、第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年度生命科学系合同年次大会、平成 29 年
- ② ヒト乳がん細胞増殖に関わる EphA2 遺伝子発現に対する Active Hexose Correlated Compound の効果検討、坂本凌、大高時文、吉田徳之、木村富紀、第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年度生命科学系合同年次大会、平成 29 年
- ③ AHCC によるヒト乳がん培養細胞増殖抑制機作の検討、坂本凌、吉田徳之、蔣時文、木村富紀、統合医療機能性食品国際学会第 25 回年会、平成 29 年
- ④ ヒト乳がん培養細胞増殖と EphA2 遺伝子発現に及ぼす Active Hexose

- Correlated Compound の効果、坂本凌、大高時文、吉田徳之、木村富紀、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年
- ⑤ 担子菌菌糸体抽出物に由来する Active Hexose Correlated Compound が示すヒト乳がん培養細胞増殖と *EphA2* 遺伝子発現に及ぼす抑制効果の検討、坂本凌、大高時文、吉田徳之、木村富紀、第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 28 年
  - ⑥ 転移性乳がん由来 MDA-MB-231 細胞増殖と悪性転化関連遺伝子 *EphA2* の発現に対する AHCC の効果、大高時文、坂本凌、吉田徳之、木村富紀、統合医療機能性食品国際学会第 24 回年会、平成 28 年
  - ⑦ 乳癌培養細胞並びに組織で同定した *EphA2* アンチセンス RNA 機能解析の試み、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会、吉田徳之、西澤幹雄、杉江知治、奥村忠芳、木村富紀、平成 27 年
  - ⑧ Characterization of *EphA2* antisense RNA in breast cancer: Creation of innovative nucleic acid drugs that are targeted to the malignancies of breast cancer. 吉田徳之、西澤幹雄、杉江知治、奥村忠芳、木村富紀、27 年度がん若手研究者ワークショップ（平成 27 年度 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」）、平成 27 年
  - ⑨ 乳癌培養細胞並びに組織で同定した *EphA2* アンチセンス RNA の解析、吉田徳之、西澤幹雄、杉江知治、奥村忠芳、木村富紀、第 17 回日本 RNA 学会年会（第 17 回 RNA ミーティング）、平成 27 年
  - ⑩ 乳癌培養細胞並びに組織における *EphA2* アンチセンス RNA の発現解析、吉田徳之、西澤幹雄、杉江知治、奥村忠芳、木村富紀、第 62 回日本生化学会近畿支部例会、平成 27 年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 徳之 (YOSHIDA, Noriyuki)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：10363996

### (2)研究分担者

木村 富紀 (KIMURA, Tominori)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：40186325

杉江 知治 (Sugie, Tomoharu)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70335264