

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19403

研究課題名（和文）乳がん幹細胞をRNA階層で制御する分子メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）RNA regulator in breast cancer stem cells and its application to therapy

研究代表者

浅原 弘嗣（Asahara, Hiroshi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

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）：難治性の乳癌subtypeであるトリプルネガティブ乳癌の治療抵抗性を特徴付ける細胞集団として癌幹細胞が知られている。我々は乳癌幹細胞集団に特異的に発現しRNA階層で癌幹細胞性を特徴づけるRNA結合タンパク質としてRBD24を同定した。RBD24は各種遺伝子mRNAの3' UTRのcis-elementsを介して標的mRNAを安定化し、腫瘍形成能や薬剤抵抗性の獲得に寄与することを明らかにした。また、RBD24の発現を制御する転写因子としてZEB1が同定され、RBD24とZEB1がRNA階層と転写階層とを結びつけるポジティブフィードバックを形成することが腫瘍形成に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性で知られるトリプルネガティブ乳癌は抗癌剤に対して治療抵抗性を有し、有効な治療標的を持たないことから新規治療標的の探索が求められてきた。今回の研究成果はRBD24がトリプルネガティブ乳癌治療における新規治療標的となりうることを示唆するものである。また、RNA階層における癌の進展の制御の重要性を示しており、今後RNA階層を標的とした核酸医薬等による新規治療戦略の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：The presence of cancer stem cells characterizes the treatment resistance of triple-negative breast cancer, a subtype of breast cancer known for its treatment resistance and low survival rate. We identified RBD24 as an RNA-binding protein specifically expressed in the breast cancer stem cell population, thereby characterizing its cancer stem cell properties at the post-transcriptional layer. RBD24 stabilizes target mRNAs by binding to cis-elements in the 3' UTR of various gene mRNAs, and contributes to tumorigenic potential and acquisition of drug resistance. We found ZEB1 as an upstream transcription factor that regulates RBD24 expression and serves as a target of RBD24, forming a positive feedback loop linking RNA layer and transcriptional layer. We showed that the RBD24-ZEB1 axis contributes to treatment resistance and tumorigenicity in vitro and in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA binding protein breast cancer cancer stem cell

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは、日本で年間9万人以上が罹患する、女性において最も頻度が高いがんである。中でもトリプルネガティブ乳がんは乳がん全体の約20%を占め、他のタイプの乳がんと異なり、十分な治療法が確立されていないため、予後不良な疾患である。本研究では、このトリプルネガティブ乳がんの病態をあらたな切り口から解明し、その知見に基づく新しい治療法の開発を行うものである。

### 2. 研究の目的

トリプルネガティブ乳がん (Triple Negative Breast Cancer : TNBC) は、悪性度が高く有効な治療法がないため、その分子病態の解明とそれに基づく新しい治療法の開発は急務である。我々は、予備実験において、TNBCのがん幹細胞において特異的に高発現するRNA結合タンパク (RBD24) を同定し、RBD24がRNA階層において、乳がん幹細胞を規定する可能性を見出した。これらを基に、本研究においてはRBD24によるTNBCにおけるがん幹細胞の機能維持機構と創薬ターゲットとしての可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) RBD24のTNBC癌幹細胞の遺伝子発現プロファイルにおける機能解析：

既報のscRNAseqデータの再解析を行い、RBD24の発現が乳がん幹細胞において強くみられることを確認した。さらに、scRNAseqデータの再解析よりRBD24と共局在する遺伝子群の同定を行い、病理検体に対して免疫染色をおこなった。患者由来検体を免疫不全マウスに対して皮下移植を行い、限界希釈の系で腫瘍形成能の変化を解析した。さらに、これらの形成された腫瘍に対してsingle cell RNA sequence解析を行い、RBD24の標的の下流遺伝子群の発現変化を1細胞レベルで解析した。また、RBD24の上流制御因子を探索するため、MDAMB231に対するHi-C解析のデータを再解析し、RBD24のエンハンサー候補領域を同定した。エンハンサー候補領域において結合する転写因子候補を同定し、ChIP Seqの再解析等を施行し、上流転写因子の詳細な解析を行った。

#### 2) RBD24のTNBC癌幹細胞の遺伝子発現プロファイルにおける機能解析：

RBD24を発現するMDAMB231細胞を用いてPAR-CLIP解析を行うことで、RBD24が結合する標的遺伝子および塩基配列をtranscriptome wideに1塩基レベルの解像度で同定した。標的遺伝子の3' UTRを搭載したレポーターを用いてレポーターアッセイを行った。ActD試験やBRIC-Seqを用いてRBD24による標的mRNAの安定性への寄与を評価した。

#### 3) 化合物スクリーニング：

High Contentsタグがノックインされた細胞を用いて、LOPAC library (Sigma Aldrich社)内の化合物1280種に対して化合物スクリーニングを行った。特に発現上昇・下降させる化合物についてはRBD24の発現制御メカニズムの同定を試みた。さらに、RBD24に対するsiRNAと同定化合物を併用投与し、MDAMB231細胞株などを移植した腫瘍皮下移植モデルに対して治療実験を行うことで治療効果増強の有無を検証した。

#### 4. 研究成果

1) RBD24 の TNBC 癌幹細胞の遺伝子発現プロファイルにおける機能解析：

RBD24TNBC 患者の手術検体に対して

RBD24 および ZEB1 に対する免疫染色

を施行した。その結果として、

RBD24 発現細胞の多くに ZEB1 が共局在して発現している様子が確認され、ZEB1 と RBD24 とが共通して腫瘍組織内で発現する傾向があることを明らかにした。

実際に RBD24 の発現をノックダウン

させた細胞について免疫不全マウス

に皮下移植した生体モデルにおいて

は腫瘍形成能が明らかに減少すること

が明らかとなった。さらに、患者由来検体に対して RBD24 をノックダウンし免疫不全マウスに皮下移植した腫瘍について、single cell RNA seq 解析を施行したところ、乳癌幹細胞分画が著しく減少し ZEB1 をはじめとした RBD24 の標的遺伝子群の発現が減少していることを明らかにした。これらの結果は RBD24 が転写因子 ZEB1 とともに共発現し機能することによって乳癌幹細胞性を維持し腫瘍形成能を特徴付けることを示唆する。

2) RBD24 の TNBC 癌幹細胞の遺伝子発現プロファイルにおける機能解析：

RBD24 を発現する MDAMB231 細胞を用いて PAR-CLIP 解析

を施行した。その結果として、RBD24 が ZEB1、NOTCH2、

NRP1、CD44 の cis-element 配列 (UGUAHAUA) に結合して

いることが明らかになった (図 2)。実際に MDAMB231 細胞株

に対して RBD24 をノックダウンしたサンプルに対する RNA-Seq

解析と共に照らし合わせると、RBD24 の mRNA 上の結合箇所が多ければ多いほど、該当遺伝子の発現が減少する傾向にあることが明らかとなった。さらに、標的遺伝子の 3' UTR を搭載したレポーターを用いてレポーターアッセイを行ったところ、RBD24 が cis-elements

配列特異的にレポーター活性を上昇させることを強制発現および siRNA を用いたノックダウンの系にて明らかに

した。

次に RBD24 の mRNA の安定性への寄与を評価するために、ActD 試験を行なった。その結果として、RBD24 に対する siRNA を用いてノックダウンすると CD44, NOTCH2, NRP1, ZEB1 の mRNA の安定性が減少することが明らかとなった。さらに transcriptome wide に RBD24 によって発現制御される遺伝子群を評価するために核酸アナログであるプロモウリジンを用いて BRIC-Seq を施行した。その結果として RBD24 に対する siRNA によるノックダウンによって、乳癌幹細胞性を特徴づける遺伝子群の mRNA の半減期が減少することが明らかとなった。これらの結果は、RBD24 が標的遺伝子 mRNA の 3' UTR 上の cis-elements への結合を介して、標的遺伝子 mRNA を安定化させることを強く示唆する。

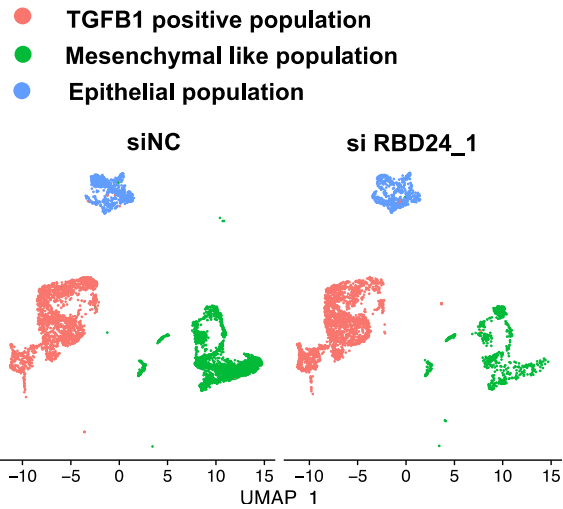
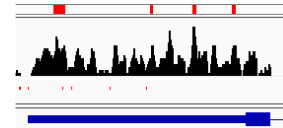


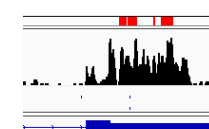
図 1 皮下移植腫瘍に対する single cell 解析

#### MDAMB231 PAR-CLIP

NRP1 [0-110]



ZEB1 [0-151]



Cis-element motif



図 2 PAR-CLIP 解析

### 3) 化合物スクリーニング :

High Contents タグがノックインされた細胞を用いて、LOPAC library (Sigma Aldrich 社)内の化合物 1280 種に対して化合物スクリーニングを行った。その結果として TNBC に対する標準治療化合物であるアントラサイクリン系の化合物や BET inhibitor が RBD24 の発現を上昇させることを明らかにした。これらの化合物と RBD24 に対する siRNA を共に使用することによって相乗的に TNBC に対する治療効果が得られることを *in vitro* および *in vivo* の系において明らかにした (図 3)。これらの結果は、化学療法に対して治療抵抗性を示す TNBC に対して RBD24 を標的とした治療が効果的である可能性を強く示唆する。

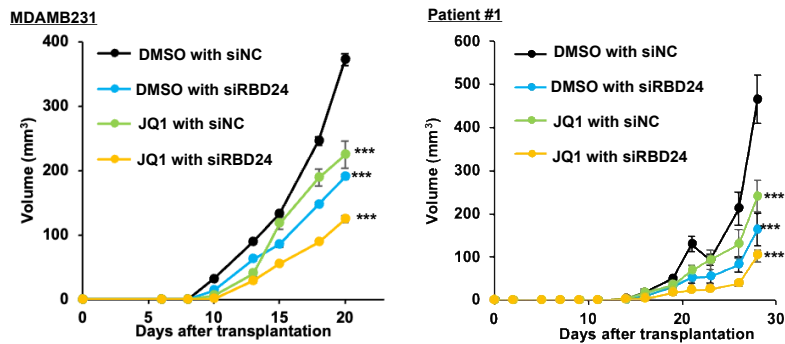


図 3 BET inhibitor と siRBD24 の併用には相乗効果がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hiroto, Uchida Yutaro, Kurimoto Ryota, Chiba Tomoki, Matsushima Takahide, Ito Yoshiaki, Inotsume Maiko, Miyata Kohei, Watanabe Kenta, Inada Masaki, Goshima Naoki, Uchida Tokujiro, Asahara Hiroshi	4. 巻 299
2. 論文標題 RNA-binding protein LIN28A upregulates transcription factor HIF1 by posttranscriptional regulation via direct binding to UGAU motifs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102791 - 102791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102791	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 Inotsume Maiko, Chiba Tomoki, Matsushima Takahide, Kurimoto Ryota, Nakajima Mitsuyo, Kato Tomomi, Shishido Kana, Liu Lin, Kawakami Koichi, Asahara Hiroshi	4. 巻 597
2. 論文標題 One step generation of mice with gene editing by <i>Tol2</i> transposon dependent <i>gRNA</i> delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 975 - 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14605	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17件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yutaro Uchida, Ryota Kurimoto, Tomoki Chiba, Yasuto Takeuchi, Noriko Gotoh, Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation of breast cancer stemness by the novel RNA binding protein
3. 学会等名 RNA2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉朋希, 浅原弘嗣
2. 発表標題 Hippo経路によるmRNA転写後調節を介した炎症性サイトカインの発現制御機構の解明
3. 学会等名 第13回 Orthopedic Research Club
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉朋希、浅原弘嗣
2. 発表標題 Escort1による炎症性サイトカインの転写後調節
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片桐未琴、千葉朋希、浅原弘嗣
2. 発表標題 長鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaro Uchida, Ryota Kurimoto, Tomoki Chiba, Yasuto Takeuchi, Noriko Gotoh, Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Targeting novel RNA binding protein for overcoming treatment resistance of triple negative breast cancer
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Kurimoto, Waka Miyamoto, Maiko Inotsume, Reiji Hirai, Tomoki Chiba, Takahide Matsushima, Yutaro Uchida, Yuta Fujii, Yuki Naito, Yuichi Shichino, Mari Mito, Shintaro Iwasaki, Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Regulation of lung cancer metastasis by the RNA-modifying enzyme
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗本遼太、浅原弘嗣
2. 発表標題 新規RNA修飾酵素による肺がん転移能の制御
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本和佳、栗本遼太、錦織杏樹、志村大旗、猪爪舞子、千葉朋希、松島隆英、内田雄太郎、藤井 雄太、浅原 弘嗣
2. 発表標題 新規RNA修飾酵素による肺がん転移能の制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaro Uchida, Ryota Kurimoto, Tomoki Chiba, Yasuto Takeuchi, Noriko Gotoh, Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation of breast cancer stemness by the novel RNA binding protein
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Kurimoto, Waka Miyamoto, Maiko Inotsume, Tomoki Chiba, Takahide Matsushima, YutaroUchida, Yuta Fujii, Hiroshi Asahara.
2. 発表標題 Regulation of lung cancer metastasis by the RNA-modifying enzyme
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 整形外科学・発生物学からみたリウマチ学の用と美
3. 学会等名 2022年度日本リウマチ学会 学会賞授賞式（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅原弘嗣、中道亮、堤大樹、栗本遼太
2. 発表標題 脊椎椎間板におけるMkxの機能解析、シンポジウム講演（脊椎関節炎の経時的病態を探究する）
3. 学会等名 日本脊椎関節炎学会第31回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 雄太郎、松島 隆英、栗本 遼太、千葉 朋希、浅原 弘嗣
2. 発表標題 HiBiT タグノックイン細胞を用いた PDL1 制御化合物スクリーニング
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 骨格筋における遺伝子発現制御機構の最前線
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 腱の研究であなたの健康を堅持する、
3. 学会等名 2021年度東京医科歯科大学公開講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 RNA階層における軟骨組織発生と恒常性制御機構と治療への応用Cartilage development and homeostasis via RNA regulation、シンポジウム25（運動器疾患における再生医療の最前線）
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 メカノ刺激と運動能力の制御、シンポジウム講演（メカノトランスフォーメーション（MX） - 力学刺激と細胞・組織制御への展開）
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 がんまたは炎症性疾患の治療に用いるための組成物およびその使用	発明者 浅原 弘嗣、内田 雄 太郎、栗本 遼太、千 葉 朋希	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2022-021824	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がん，炎症性疾患，または肥満の治療に用いるための組成物およびその使用	発明者 浅原 弘嗣、内田 雄 太郎、栗本 遼太、千 葉 朋希	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、PCT/JP2023/005320	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京医科歯科大学 システム発生・再生医学分野  
<https://www.tmdusystemsbiomedicine.com/>

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	内田 雄太郎  (Uchida Yutaro)		

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