

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 癌・精巣 lncRNA の転写制御点を標的とした抗癌剤創出  
(英語) Drug Discovery Targeting at the transcriptional Regulation of Cancer/Testis lncRNA

研究開発実施期間: 令和元年8月1日～令和3年12月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 細野 祥之  
(英語) Yasuyuki Hosono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人岡山大学 学術研究院医歯薬学域 教授  
(英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences  
Department of Pharmacology, Professor

## II 研究開発の概要

### 研究開発の目的

長鎖非翻訳 RNA(lncRNA)はタンパク質に翻訳されずそれ自体が機能を持つ 200 塩基以上の RNA で、癌の発生や進展への関与が近年明らかになっている。研究開発代表者はこれまで、正常組織における精巣と、様々ながん種でのみ発現を示す lncRNA の一群として、癌・精巣 lncRNA (Cancer-Testis lncRNAs; CT-lncRNAs)という新カテゴリーを創出し、その中で THOR (testis-associated highly conserved oncogenic long non-coding RNA)を同定し、癌の発生と進展への関与を見出してきた。本研究開発においては、以下の3点を目的とし研究開発を行った。①THOR の発現機構を転写制御レベルで解明し、その発現を調節している転写因子を同定すると同時に、転写制御点をターゲットとした化合物を同定する。②新規癌・精巣 lncRNA を CRISPR スクリーニング法により同定し、その結合タンパク質を網羅的に同定する。③化合物が精子形成に与える影響についての評価系を確立する。

### 研究開発の概要

#### ① THOR の発現機構解明と転写制御点を標的とした化合物の同定

事前検討で行った網羅的な転写因子の解析結果が得られていた 5 個の転写因子・転写関連因子に対して、個々の転写因子・転写関連因子の発現抑制により THOR のプロモーター活性と発現を見ることで、THOR の発現を制御する転写因子 A を同定した。この転写因子 A の発現抑制により細胞株の増殖が抑制され、また臨床検体と細胞株において転写因子 A と THOR の発現は緩やかに相関する傾向があることを見出した。次に本研究開発で用いる *in silico prediction* の妥当性を検討するため、市販薬 1,200 化合物ライブラリーを用いて luciferase assay を施行し、*in silico prediction* の結果と比較した。結合親和性を表す pKd 予測値の高いものに、luciferase assay の fold change の低い、あるいは高いものが見られ、*in silico prediction* は実験結果で差のある化合物をある程度拾い上げることが出来ると言えた。そこで HTS100,000 化合物ライブラリーに対しても同様に *in silico prediction* を施行して pKd を算出し、cut off を 6 として約 7,500 化合物に絞りこんだ。その後これらの 7,500 化合物をさらに 350 にクラスタリングし、各クラスタから化合物を 1 つずつ選択し、最終的に選択された約 300 の化合物に対して細胞株を用いた一次スクリーニングを施行した。その結果、1 個の化合物 (化合物 A) が 1 $\mu$ M\_72 時間処理により「プロモーター活性<50%, 細胞増殖<50%」の基準を満たし、かつ、THOR の発現も低下させた。さらに細胞株を用いたゼブラフィッシュ Xenograft モデルと、臨床検体を用いたゼブラフィッシュ PDX モデルを用いて効果判定を行ったところ、ヒット化合物 A の処理により腫瘍のサイズ縮小を認めた。

#### ② カスタム CRISPR スクリーニングを用いた新規癌・精巣 lncRNA の同定

The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録された RNA-seq データを再解析し、新規の標的となりうる癌・精巣 lncRNA を 約 1,000 個の抽出し、それらに対してカスタム CRISPR ライブラリーを作成した。次にこのライブラリーを用いて、4 種類の細胞株に対して CRISPR スクリーニングを施行し、7 個の標的となりうる新規癌・精巣 lncRNA をリストアップした。その後 siRNA を用いた確認実験により最終的に 5 個の新規癌・精巣 lncRNA を同定した。次に質量分析計による各 lncRNA に結合する RNA 結合タンパク質の網羅的解析を行ったところ、2 個の RNA 結合タンパク質が結合パートナーとして同定された。さらにこれまでの結果と合わせて、がん細胞と生殖細胞には lncRNA の発現、機能をめぐる癌・精巣特異的なネットワークが形成されている可能性が見いだされた。

#### ③ 化合物が精子形成に与える影響についての評価

精母細胞に影響を与えることがわかっている化合物をマウスに腹腔内投与し、精巢を用いた HE 染色法と免疫組織染色法により生殖細胞への影響を検証する系の確立を行った。HE 染色法と免疫組織染色法による組織解析では、精母細胞のアポトーシスが起きているという先行知見と一致した結果が得られ、本実験系が今後の精巢解析に適用可能と考えられた。

## 研究開発の成果

### ① THOR の発現機構解明と転写制御点を標的とした化合物の同定

- ・ THOR の発現制御機構を解明した。
- ・ 市販薬 1,200 化合物ライブラリーを用いて *in silico prediction* の妥当性を証明した。
- ・ HTS100,000 化合物ライブラリーに対して *in silico prediction* と、細胞株を用いた一次スクリーニングを施行し、ヒット化合物（化合物 A）を 1 個同定した。
- ・ ヒット化合物 A 処理により、ゼブラフィッシュ Xenograft モデルと、臨床検体を用いたゼブラフィッシュ PDX モデルの腫瘍サイズが縮小することを見出した。

### ② カスタム CRISPR スクリーニングを用いた新規癌・精巢 lncRNA の同定

- ・ RNA-seq データの再解析により、新規の標的となりうる癌・精巢 lncRNA を抽出し、カスタム CRISPR ライブラリーを作成した。
- ・ CRISPR スクリーニングと、siRNA を用いた確証実験により 5 個の新規癌・精巢 lncRNA を同定した。
- ・ 質量分析計による各 lncRNA に結合する RNA 結合タンパク質の網羅的解析を行い、2 個の RNA 結合タンパク質を結合パートナーとして同定した。
- ・ これまでの結果と合わせて、癌・精巢特異的な lncRNA ネットワークが形成されている可能性を見出した。

### ④ 化合物が精子形成に与える影響についての評価

- ・ 化合物が精子形成に与える影響についての HE 染色法と免疫組織染色法を用いた評価系を確立した。

## **Purpose**

Long non-coding RNAs (lncRNAs) have emerged as an abundant and functionally diverse species of non-coding RNAs (ncRNA). In our previous study, we re-analyzed a large-scale transcriptome sequencing data and functionally characterized a novel ultraconserved cancer testis (CT) lncRNA that we named THOR (testis-associated highly conserved oncogenic long non-coding RNA), which is exclusively expressed both in testis and a broad range of human cancers.

The purpose of this study both in terms of technology development and products are; (1) to elucidate the transcriptional mechanism that regulate the expression of THOR, and identify drugs that target transcriptional regulatory points of THOR. (2) to identify new targetable CT-lncRNAs by performing a systematic CT-lncRNA CRISPR screen, and find protein partners that binds to the newly identified CT-lncRNAs. (3) to establish new evaluation methods that can be used to assess the drug effects on testis in mice.

## **Results**

We identified the transcription factor (TF) that regulates THOR's expression. We next evaluated the validity of the *in silico* prediction method (DeepDTE) using the results of luciferase assay in FDA-approved 1,200 drug library treated cells. Then we applied it to the HTS100,000 drug library and chose candidate drugs. By treating the cell line which expresses THOR, we successfully identified a hit drug that suppresses the promoter activity of THOR and cell proliferation. We next showed that the hit drug treatment sharply suppressed the growth of tumors generated from the cell line (xenograft) or surgical sample (patient derived xenograft) in zebrafish.

We also identified new CT lncRNAs candidates using comprehensive bioinformatics analysis. We then conducted CRISPR screening using custom-made CT lncRNA CRISPR library and discovered the targetable CT lncRNAs that affect cancer cell proliferation. We also identified protein binding partners that bind to the newly identified targetable CT lncRNAs using comprehensive mass spectrometry.

We finally established the evaluation methods that can be used to assess the drug effects on testis in mice using H&E staining and immunohistostaining.

### III 事後評価総合所見

課題リーダーが見いだした新規がん・精巣 lncRNA THOR の転写を抑制する化合物のスクリーニングで、細胞増殖抑制活性を示す化合物を見つけだし、ゼブラフィッシュの PDX モデルで腫瘍縮小活性を確認したことは、lncRNA の転写抑制を標的にした新しい概念の抗がん剤開発につながる可能性を示したとして評価される。また、さらに新規 lncRNA を同定し、それぞれに結合する結合タンパク質を発見したことも、大きな成果と言える。

一方、THOR 発現抑制化合物の探索における化合物の活性相関の解析が不十分であり、得られた唯一の活性化合物と THOR との相互作用に関する解析も未実施であり、低分子創薬に向けた分子設計の考え方が明確でない。また、目標とした特許出願の未達は残念である。

低分子化合物による RPI 制御や転写因子制御は独自性の高い研究であるので、機序解明および標的とする lncRNA の絞り込みなど、今後の進捗に期待する。また、この機序による抗がん活性の *in vivo* における検証を早く確認して頂きたい。

今後に向けて、Hit / Lead 化合物探索から開発化合物への進展に向けて、開発経験のある製薬企業との連携も検討して頂きたい。