

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) がんの特性を制御するマイクロRNAの探索と核酸抗がん薬DDSの開発  
(英語) Exploration of novel cancer-related microRNAs  
and development of DDS for microRNA therapeutics

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 教授 稲澤譲治  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University, Professor, Johji Inazawa

実施期間： 平成28年 9月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 教授 稲澤 譲治  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University, Professor, Johji Inazawa

分担研究 (日本語) : がんの特性を制御するマイクロRNAの探索と核酸抗がん薬に最適な  
DDSの開発研究の総括と実施

開発課題名： (英語) : Organization and promotion of the research for exploration of  
novel microRNAs and development of DDS for microRNA therapeutics

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 講師 井上 純  
所属 役職 氏名 (英語) Tokyo Medical and Dental University,  
Junior Associate Professor, Jun Inoue

分担研究 (日本語) がん細胞浸潤・転移を制御するmiRNAの同定および核酸抗がん剤の  
開発

開発課題名： (英語) Exploration of invasion/metastasis-related microRNAs  
for microRNA therapeutics in cancer

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 助教 玄泰行  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University,  
Assistant Professor, Yasuyuki Gen

分担研究 (日本語) in silico 解析を用いた BRD4 標的遺伝子の探索と miR-X の腫瘍抑制  
メカニズムの解明  
開発課題名: (英語) Functional assessment of BRD4-related microRNAs including miR-X

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 助教 谷本幸介  
所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical and Dental University, Assistant Professor,  
Kousuke Tanimoto

分担研究 (日本語) miRNA オミクス解析のためのビッグデータ数理科学の確立と実データ  
解析  
開発課題名: (英語) Big data analysis of microRNA omics in cancers

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 教授・角田 達彦  
所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical and Dental University, Professor, Tatuhiro Tunoda

分担研究 (日本語) マウス皮膚化学発がんモデルを用いた候補マイクロ RNA のデリバリー  
システムの評価研究および抗腫瘍効果の検討  
開発課題名: (英語) Assessment of therapeutic efficacy of novel delivery system  
for tumor-suppressor microRNAs in mouse skin carcinoma

研究開発分担者 (日本語) 学校法人日本大学医学部 助教 藤原 恭子  
所属 役職 氏名: (英語) Nihon University School of Medicine, Assistant Professor, Kyoko  
Fujiwara

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

核酸抗がん薬に応用可能な、がんの増殖、浸潤、転移などの悪性特性を制御する miRNA を同定し、核酸抗がん薬としての可能性を追究するために以下の研究を推進した。1) miRNA ライブラリー機能的スクリーニング法を確立し、これを用いて新規のがん関連 miRNA を同定した。さらに、2) これらがん関連 miRNA に関して *in vitro/in vivo* オミクス解析を実施して機能を明らかにした。3) オミクスデータの数理科学解析では、がん特性ネットワークとハブ分子を予測のためのオミクス情報解析ツールを開発し miRNA 創薬情報基盤を構築した。4) miRNA 核酸薬に応用可能な DDS 技術の改良を行った。以上によって得られたデータをもとに miRNA 抗がん核酸薬を実用化レベルへの到達させるための研究を実施した。特に、miRNA 核酸の DDS として LNP やイオン液体などの有効性を各種ヒトがん細胞株のマウス皮下移植腫瘍 (Cell line-Derived Xenograft, CDX) を用いたがん抑制型 miRNA 投与実験により *in vivo* CDX 抗腫瘍効果を確認することにより、核酸抗がん薬に最適な DDS や応用技術の開発と臨床応用に向けた proof-of-concept (POC) の取得を目指した。

具体的には、マウス *in vivo* 選択法により口腔扁平上皮がん細胞株 HOC313 の親株からリンパ節高転移性亜株 HOC313-LM を樹立し、さらに、HOC313-LM が放出する exosome に包含された exosomal miRNA として *miR-342-3p* と *miR-1246* を同定した。*miR-1246* は DENND2D を標的とすることで口腔扁平上皮がん細胞の移動および浸潤に深く関与する可能性が見出され、口腔扁平上皮がんの浸潤転移バイオマーカーとしての可能性が示された。(Sakha S et al. Scientific Report 2016)。

また、膵臓がん細胞株 Panc1 を用いて上皮間葉転換 (EMT) 可視化システムを構築し、1090 種類の miRNA ライブラリースクリーニングから、EMT 抑制性 miRNA として *miR-MCG1* と *miR-MCG2* を同定した。*miR-MCG1* は、EMT 促進性遺伝子として知られている HMGA2 や間葉系マーカーの vimentin を直接標的とし、その発現により MET の誘導が確認された。一方、*miR-MCG2* は、EMT 誘導経路の代表と知られる TGF- $\beta$  経路の重要な構成因子である SMAD2, 4 を直接的標的にして MET を惹起することが判明した。さらに、これら 2 つの miRNA を膵臓がん細胞株に導入により、ゲムシタビンの腫瘍抑制効果の増強が確認された。ゲムシタビンは膵臓がん標準治療の第 1 選択薬剤であり、その併用療法の核酸抗がん薬として *miR-MCG1* と *miR-MCG2* に期待できる可能性がある。

さらに、様々な機能的スクリーニング法を構築し、これを用いた miRNA ライブラリースクリーニングによる新規がん関連 miRNA 探索を進め、新たに酸化ストレス制御遺伝子 KEAP1 標的 miRNA や BET ファミリー・エピジェネティックリーダー分子である BRD4 遺伝子を標的とする miRNA などを同定した。

細胞死誘導効果のある *miR-634* (PCT/JP2014/053594 出願済) の核酸抗がん薬応用を目的に脂質ナノ粒子 (LNP) (エーザイ株式会社) やイオン液体 (ILTS ; メドレックス社) などとの組み合わせにより、miRNA 核酸抗がん薬応用の DDS 最適化を検討した。マウス皮膚化学発がんモデルを使用した実験を進めた。

## 英文

MicroRNAs (miRNA) are endogenous small noncoding RNAs that can negatively regulate gene expression by interfering with the translation or stability of target transcripts. The expression of miRNAs is deregulated in cancer, and experimental data indicate that cancer phenotypes can be modified by targeting miRNA expression. We recently identified several tumor-suppressive miRNAs (*TS-miR*) which were silenced through CpG-island hyper-methylation near or around their putative promoter regions in various types of cancer, suggesting the potential of miRNA replacement therapy for cancers using double-stranded RNA mimicking *TS-miRNAs*. Circulating miRNAs and exosomal miRNAs have also been proposed as being useful for diagnostics as biomarkers for different types of cancer. In our project, we have extensively explored cancer-related miRNAs, especially *TS-miRNAs*, which are closely associated with malignant phenotypes, such as rapid growth, invasion/metastasis, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and drug resistance, using cell-based reporter systems with various types of cancer cell lines.

Exosomes, which are packed with RNA and proteins and are released in all biological fluids, and now emerge as an important mediator of intercellular communication. However, we identified two oncogenic miRNAs, *miR-342-3p* and *miR-1246*, that were highly expressed in exosomes released from a highly metastatic human oral cancer cell line, HOC313-LM which we established. These miRNAs were transferred to poorly metastatic cells by exosomes, which resulted in increased cell motility and invasive ability. Moreover, *miR-1246* increased cell motility by directly targeting *DENN/MADD Domain Containing 2D (DENND2D)*. Taken together, our findings support the metastatic role of exosomes and exosomal miRNAs, which highlights their potential for applications in miRNA-based therapeutics.

We next established a cell-based reporter system for identifying EMT-suppressive miRNAs in the pancreatic cancer cell line Panc1, we performed a function-based screening assay by combining this reporter system and a miRNA library composed of 1,090 miRNAs. As a result, we identified *miR-MCG1* (lab. name) and *miR-MCG2* (lab. name) as EMT-suppressive miRNAs. Overexpression of *miR-MCG1* and *miR-MCG2* increased the expression of E-cadherin through the suppression of EMT-related gene expression and that drug sensitivity increased with a combination of each of these miRNAs and gemcitabine. Moreover, *miR-MCG1* was associated with worse overall survival in patients with pancreatic cancer and was identified as an independently selected predictor of mortality. Our findings suggest that *miR-MCG1* and *miR-MCG2* might be novel chemotherapeutic targets and serve as biomarkers in pancreatic cancer.

Moreover, using function-based screening with 1090 human miRNAs in Panc1 cell line, *miR-MCG3* (lab. name) has been identified a novel *TS-miR*. Transfection of *miR-MCG3* markedly reduced *in vitro* proliferation of triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231 and other cell lines. Interestingly, *miR-MCG3* directly targets *BRD3* and *BRD4*, leading to remarkable down-regulation of MYC, phosphorylated STAT3 and phosphorylated AKT1. These results suggest that *miR-MCG3* may be a promising candidate for the development of a miRNA-based cancer therapeutics.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 11件)

1. Nagata H, Kozaki K, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Fujiwara N, Imoto S, Ichikawa D, Otsuji E, Miyano S, Kawano T, Inazawa J: Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* (in press)
2. Okuda M, Inoue J, Fujiwara N, Kawano T, Inazawa J\*: Subcloning and characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by in vivo selection. *Oncotarget* (in press)
3. Takahashi H, Inoue J\*, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J\*. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* (in press), \*corresponding authors
4. Sakha S, Muramatsu T, Ueda K, Inazawa J\*: Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 6:38750. 2016
5. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H: Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 108:256-266. 2016
6. Shiraishi K, Okada Y, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kunitoh H, Matsumoto S, Takano A, Shimizu K, Goto A, Tsuta K, Watanabe S, Ohe Y, Watanabe Y, Goto Y, Nokihara H, Furuta K, Yoshida A, Goto K, Hishida T, Tsuboi M, Tsuchihara K, Miyagi Y, Nakayama H, Yokose T, Tanaka K, Nagashima T, Ohtaki Y, Maeda D, Imai K, Minamiya Y, Sakamoto H, Saito A, Shimada Y, Sunami K, Saito M, Inazawa J, Nakamura Y, Yoshida T, Yokota J, Matsuda F, Matsuo K, Daigo Y, Kubo M, Kohno T: Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Nat Commun.* 7:12451. 2016
7. Nuylan M, Kawano T, Inazawa J\*, Inoue J\*: Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. *Oncotarget* 2016 (in press)
8. Muramatsu T, Kozaki K-I, Imoto S, Ymaguchi R, Tsuda T, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J\*: The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. *Oncogene* (in press)
9. Okada Y, Muramatsu T, Suita N, Kanai M, Kawakami E, Iotchkova V, Soranzo N, Inazawa J, Tanaka T: Significant impact of miRNA-target gene networks on genetics of human complex traits. *Sci Rep.* 6:22223. 2016
10. Morishita M, Muramatsu T, Suto Y, Hirai M, Konishi T, Hayashi S, Shigemizu D, Tsunoda T, Moriyama K, Inazawa J\*. Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam irradiation system. *Oncotarget* 7:10182-92. 2016
11. Sudo G, Kagawa T, Kokubu Y, Inazawa J, Taga T: Increase in GFAP-positive astrocytes in histone demethylase GASC1/KDM4C/JMJD2C hypomorphic mutant mice. *Genes Cells.* 21:218-25 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Inazawa J: Autophagy, p62-NRF2-Keap1-ARE Pathway and Micro RNAs in Ovarian Cancer. The 4th Annual Meeting of the International Ovarian Cancer Consortium on Tumor Microenvironment and Drug Discovery. Seoul, Korea. 23-25/February/2017. 口頭、国外
2. Inazawa J: Autophagy, Nutrition and Cancer. Wellness Symposium with NAPA2016. Seoul National University, Korea. 3-5/Nov/2016. 口頭、国外
3. 稲澤譲治: がん抑制マイクロ RNA の探索と診断・治療への応用. 第 75 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 6 日. 口頭、国内
4. 村松智輝、小崎健一、稲澤譲治: がん転移におけるマイクロ RNA と WNT 経路の役割. 第 75 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 6 日. 口頭、国内
5. 井上純: 細胞生存システムを標的としたがん治療戦略・第 14 回 Tokushima Young Investigators Conference. 徳島大学病院西病棟 11 階 日亜メディカルホール 徳島. 2016 年 9 月 15 日、口頭、国内
6. 稲澤譲治: 頭頸部・食道がん精密医療 (Precision Medicine) 拠点形成への期待. お茶の水 SC クラブ 第 4 回学術集会. お茶の水医学会館. 東京. 2016 年 9 月 9 日. 口頭、国内
7. 玄泰行、稲澤譲治: スキルスがんゲノムプロジェクト. 機能的スクリーニング法による胃がん浸潤転移関連マイクロ RNA の探索. 平成 28 年度日本医療研究開発機構 (AMED) 委託費 (革新的がん医療実用化研究事業) 「スキルスがんにおけるがん幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究」総会プログラム. 東京医科歯科大学 M&D タワー 14 階セミナー室 7. 東京. 2016 年 11 月 30 日. 国内、口頭
8. 高橋寛吉、井上純、坂口公祥、高木正稔、水谷修紀、稲澤譲治: Essential role of oxaloacetate and autophagy in L-asparaginase-treated leukemia cells. 第 78 回日本血液学会学術集会. 神奈川県. 2016 年 10 月 13 日. 国内、口頭
9. 外内えり奈、村松智輝、平本秀一、稲澤譲治: MicroRNA を介した BET family と mTOR 経路阻害によるがん細胞増殖抑制機構. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 8 日. 国内、口頭
10. 平本秀一、村松智輝、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治: 細胞ベースのレポーターシステムと miRNA ライブラリーを用いての EMT 抑制 miRNA の探索. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 8 日. 国内、口頭
11. 井上純、稲澤譲治: ヒト癌におけるオートファジー経路の障害. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 7 日. 国内、口頭
12. 古澤啓子、井上純、久保田俊郎、稲澤譲治: 卵巣癌細胞株の細胞生存におけるアミノ酸要求性. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 7 日. 国内、口頭
13. 奥田将史、井上純、河野辰幸、稲澤譲治: 食道扁平上皮癌の転移における Lipocalin2 の関与. 第 75 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 6 日. 国内、ポスター
14. 高橋寛吉、井上純、坂口公祥、高木正稔、水谷修紀、稲澤譲治: 急性リンパ性白血病細胞における L-asparaginase 投与時のオキサロ酢酸とオートファジーの役割. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川県. 2016 年 10 月 6 日. 国内、ポスター

15. 及川悠、森田圭一、栢森高、坂本啓、石川俊平、稲澤讓治、原田浩之：口腔がんにおける cell-free DNA の臨床応用. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2016 年 10 月 6 日. 国内、ポスター

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 稲澤讓治：「がんの増殖を抑える小さな分子、マイクロ RNA」東京医科歯科大学難治疾患研究所第 15 回市民公開講座、文京シビックホール 東京医科歯科大学難治疾患研究所. 平成 28 年 6 月 17 日

(4) 特許出願

- ・特願 2017-036122
- ・PCT/JP2016/87989