

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) がん関連 RNA 結合タンパク質複合体を標的とした革新的治療法の開発
(英語) Development of innovative cancer therapy targeting tumor-associated RNA-binding protein complexes
- 研究開発担当者 (日本語) 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究所
老化制御研究チーム 研究部長 井上聡
- 所属 役職 氏名： (英語) Satoshi Inoue M. D., Ph. D. Leader, Functional Biogerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 研究の総括、がん関連 RNA 結合タンパク質複合体の同定とその作用メカニズム解明に基づく創薬
- 開発課題名： (英語) Identification and functional analyses of tumor-associated RNA-binding protein complexes and their application
- 研究開発代表者 (日本語) 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究所
老化制御研究チーム 研究部長 井上聡
- 所属 役職 氏名： (英語) Satoshi Inoue M. D., Ph. D. Leader, Functional Biogerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
- 分担研究 (日本語) RNA 結合タンパク質複合体を構成する因子・非コード RNA を標的とする核酸創薬
- 開発課題名： (英語) Nucleic acid-based drug discovery targeting factors comprising RNA-binding protein complexes and associated noncoding RNAs
- 研究開発分担者 (日本語) 学校法人 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門
講師 池田和博

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者（井上 聡、東京都健康長寿医療センター研究所）においては、研究の総括、がん関連 RNA 結合タンパク質複合体の同定とその作用メカニズム解明に基づく創薬を行った。本研究を統括し、新規治療法開発のため、既に保有する候補分子より最適化を進め、候補物質 Z の細胞と動物の系で治療効果と安全性を検討した。また、アルファスクリーニングで得られた候補物質の、RNA-タンパク質結合阻害活性を検証した。PSF/NONO、BClnc-Y を含む RNA 結合タンパク質複合体の構成要素を同定し、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオミクス統合解析を進めた。特に PSF 複合体については RIP-seq と CLIP-seq により、複合体中に多く含まれる RNA 群を見出した。BClnc-Y の詳細な作用メカニズムを明らかにする目的で、BClnc-Y の結合因子の同定をおこなった。RNA pull down assay に基づき、細胞を溶解した後、ビオチン標識した相補鎖 RNA プロブを用いて BClnc-Y を含む複合体を精製し、含まれる結合因子を質量分析にて網羅的に同定を行った。質量分析の結果、BClnc-Y に特異的に結合する候補因子群が検出された。これらの中で、RNA 結合因子である W に着目して解析を進めた。以上より、新しい RNA 結合タンパク質複合体構成要素が同定され、その作用メカニズムとがんにおける役割を示し、創薬標的を見出した。

研究開発分担者（池田 和博、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター）においては RNA 結合タンパク質複合体を構成する因子・非コード RNA を標的とする核酸創薬を担当した。核酸 DDS について、技術支援班ならびに研究協力者との連携を行った。DDS と治療抵抗性モデルを用いて核酸薬の動物レベルでの治療効果を明らかにし、著明な副次事象のないことを示した。RNA 結合タンパク質複合体構成要素に対する医薬シーズとしては、治療標的 W に対して、siRNA による核酸の治療効果を細胞レベルで検証した。

英文

We performed a screening analysis to identify small molecules binding to an RNA-binding protein by using chemical array and develop a new strategy to target the molecule for the treatment of prostate cancer. We then examined the effects of obtained molecules on the binding ability. We further analyzed the action of the analogous substances of them in cancer cells and tumor growth in mice model and focused on molecule Z. Moreover, we established an alpha screening system to evaluate the binding of a lncRNA with the RNA-binding protein and found candidate molecules to inhibit the bindings. We then validated the inhibitory effect of the bindings by the obtained molecules from the screening assay *in vitro*. We also investigated the action of the RNA-binding protein at DNA level (ChIP-seq) and post-transcriptional level (RNA-seq, RIP-seq and CLIP-seq) and demonstrated the genome wide function of the protein in cancer cells. In these analyses, the protein was found to target important signals for prostate cancer progression.

In order to clarify the precise mechanism of *BClnc-Y*, its binding factors were explored through a modified method based on RNA pull down assay. Briefly, the complex containing *BClnc-Y* was purified from cell lysates using a biotin-labeled complementary strand RNA probe, and *BClnc-Y* binding factors were comprehensively identified by mass spectrometry. As a result, candidate factors that specifically bind to *BClnc-Y* were dissected. Among them, we focused on *Gene-W*, which is categorized as an RNA-binding factor.

To investigate the effect of siRNAs targeting *BClnc-Y* (*siBClnc-Y*) on *in vivo* tumor growth, we performed xenograft experiments using nude mice. We investigated the effect of *siBClnc-Y* on the proliferation of tumors developed by drug-resistant breast cancer cells. The siRNA was administrated with DDS. The result revealed that *siBClnc-Y* significantly inhibited the growth of tumors. Furthermore, we developed several *Gene-W* targeting siRNAs that could suppress the proliferation of breast cancer cells. Based on the present results, we showed that the novel estrogen-responsive noncoding RNA *BClnc-Y* and its binding factor *Gene-W* have functions promoting tumor growth and both could be applied to the breast cancer management as potential molecular targets for diagnosis and therapies.

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 6 件）

1. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Edwin Cheung, Aburatani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T. Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1. *Mol Cell*. 2016, 64(1), 176-188.
2. Yamada Y, Nakagawa T*, Sugihara T, Horiuchi T, Yoshizaki U, Fujimura T, Fukuhara H, Urano T, Takayama K, Inoue S, Kume H, Homma Y. Prognostic value of CD66b positive tumor-infiltrating neutrophils in testicular germ cell tumor. *BMC Cancer*. 2016, 18,16(1), 898.
3. Misawa A, Takayama K, Fujimura T, Homma Y, Suzuki Y, Inoue S. Androgen-induced lncRNA POTEf-AS1 regulates apoptosis-related pathway to facilitate cell survival in prostate cancer cells. *Cancer Sci*. 2017,Mar,108(3), 373-379 and highlighted in “*In This Issue*”.
4. Yamada Y, Takayama K, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi T, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci*. 2017, 108(1), 32-41.
5. Takayama K, Inoue S. Investigation of androgen receptor signaling pathways with epigenetic machinery in prostate cancer. *Molecular Oncology. Underlying Mechanisms and Translational*, (edited by Farooqi A and Muhammad I) Springer International. 2017, pp.205-222.
6. Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S: Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers*. 28 February 2017 . 9(3), pii: E22 and **Cover**.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. アンドロゲン応答性 long non-coding RNA として同定した SOCS2-AS1 は前立腺癌におけるアンドロゲンシグナルを促進しアポトーシスを抑制する(SOCS2-AS1, an AR-regulated long non-coding RNA, promotes androgen signals and inhibits apoptosis in prostate cancer), ポスター, 高山賢一, 三沢彩, 井上聡, 第 75 日本癌学会学術集会, 2016/10/7, 国内.
2. [シンポジウム] Exploration of new therapeutic strategies for sex hormone dependent cancers. 口頭, 井上聡, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016.11.11, 国内.
3. [ワークショップ]shRNA スクリーニングとシーケンス技術によるホルモン不応性がん関連のコード・非コード RNA の同定 Functional shRNA library screening and sequencing-based identification of coding and non-coding RNAs that associate with the biology of hormone refractory cancers, 口頭, 堀江公仁子, 池田和博, 井上聡, 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/12/2, 国内.
4. [シンポジウム] アンドロゲン作用プログラムを制御する新しい分子機構の解明 ; CRPC モデルにおけるアンドロゲンシグナリングの解析, 口頭, 井上聡, 第 19 回 UTP シンポジウム, 2017/1/15, 国内.
5. [研究奨励賞受賞]エストロゲンによって誘導され乳がん細胞の増殖・生存を制御する長鎖非コード RNA の同定, ポスター, 水戸部悠一, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 第 17 回関東ホルモンと癌研究会, 2017/1/28, 国内.
6. Identification of growth-modulatory long noncoding RNA that activates estrogen receptor signaling in breast cancer, ポスター, Inoue S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Keystone Symposia Conference, Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics, 2017/02/05, 国外
7. [Symposium] Novel therapeutic strategy for castration-resistant prostate cancer by PI polyamide targeting Oct1, 口頭, Takayama K, Inoue S, 2017/2/24, International symposium for the drug-discovery of the pyrrole-imidazole polyamides as novel biomedicines, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし