

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15293

研究課題名(和文) IncRNA機能阻害を介したDNA相同組換え修復の脆弱化とその治療応用

研究課題名(英文) Perturbation of homologous recombination repair in tumor through inhibition of IncRNA function

研究代表者

岡本 有加 (Okamoto, Yuka)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：50625217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA相同組換え(homologous recombination; HR)修復は腫瘍治療にあたり重要な分子標的であると考えられているが、有効な分子標的薬の開発は発展途上であり、腫瘍特異性の高い標的候補が求められている。本研究では、長鎖非翻訳RNA(long non-coding RNA; lncRNA)を標的とし、HR修復不全を誘導することを目指し、候補lncRNAの候補の同定を目指した。その結果、培養がん細胞を用いた発現解析実験などから、機能不全により、HR修復欠損誘導を介したがん細胞の増殖抑制、抗癌剤感受性増強を誘導可能なlncRNAを複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HR修復を標的とし、RAD51のDNA結合阻害剤、HR応答の上流であるATM・ATR・CHK1阻害剤といった化合物がこれまでに報告され、臨床開発に進んでいるが、必ずしも特異性が高くない。本研究で、HR修復機能維持に關与するlncRNAを複数同定できたことにより、HR修復を標的とした新たな分子標的候補を見出せた。また現在までに、5-60,000遺伝子存在すると考えられているが、その殆どについては機能未知であるlncRNAについて、新たな生物学的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination (HR) repair is considered to be an intriguing target for tumor therapy. However, development of effective molecular-targeted therapy is still in progress and target candidates with high tumor-specificity is required. This research was aimed to identify long non-coding (lnc) RNA target involved in HR repair in tumor. As a result of several screening and transcriptome analysis, multiple lncRNA targets were identified. Inhibition of these targets by knockdown in cultured human tumor cells resulted in deficiency of HR repair, growth inhibition and sensitization to cisplatin.

研究分野：腫瘍治療学、細胞生物学

キーワード：lncRNA 相同組換え修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

相同組換え(homologous recombination)修復は、DNA二本鎖切断に対する確度の高い修復機構である。腫瘍細胞においては、増殖能の亢進および細胞周期チェックポイントの破綻等によりDNA切断が多く生じ、HR修復への依存が高まっていることが知られている。実際に、組換え酵素RAD51の発現亢進が多くのがんで認められる。また、修復されずにDNA切断が蓄積することにより遺伝子変異や染色体異常を生じ、がんの悪性化の原因となる。その一方で、乳がんや卵巣がんではHR修復制御に係るがん抑制遺伝子BRCA1/2の変異によるHR修復異常が認められ、PARP阻害剤による合成致死誘導が治療戦略として有効であることから、HR修復は腫瘍治療に置ける重要な標的である。しかしながら、HRは正常細胞の生存・増殖においても重要であること等から治療標的化が充分進んでおらず、高い腫瘍特異性を呈する新規標的候補を見出す事が重要な課題である。興味深いことに、がんにおけるゲノム変異の多くが非翻訳RNA(non coding RNA; ncRNA)にも存在し、遺伝子発現制御等に関与することが近年のトランスクリプトーム解析等の進展により明らかとなってきた。また、腫瘍特異的に発現が亢進し、腫瘍増殖・悪性化に関与するmicroRNA(miR)や長鎖非翻訳RNA(long non coding RNA; lncRNA)の同定、機能解析が進みつつある。中でも、lncRNAは現在ヒトにおいて約30,000種同定されているものの、機能や作用機序については大半が未知である。発現変動解析からおよそ種のlncRNAががんを始めとする疾患に関与している可能性が報告されており、HR修復に関与するlncRNAとしては、DNA損傷応答時に誘導されるANRILやDDSR1などが報告されている。

2. 研究の目的

こうした背景のもと、申請者は、これまでに、HR因子の発現制御に関与するlncRNAの候補を複数見出していた。そこで、本研究では、lncRNAの機能抑制によるHR修復異常の誘導を利用したがんの分子標的治療の可能性に焦点を据えて、標的lncRNA候補の探索とその作用機序解明を通じて、『lncRNAによるHR制御の新たなメカニズムの解明』を目的とする。標的lncRNAの機能阻害でがん細胞にHR修復欠損を誘導した際の、増殖抑制活性や、PARP阻害剤やシスプラチンといった抗がん剤との併用効果による合成致死といった腫瘍増殖抑制活性のスペクトラムを解析し、『治療戦略のストラテジーの立案』を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、長鎖非翻訳RNA(long non-coding RNA; lncRNA)を標的とし、HR修復不全を誘導することによる抗腫瘍法の開発を目指し、その基盤を築くことを目的として、1.候補lncRNAの阻害によるHR修復不全の確認とその作用機序の解析、2.HR修復制御に関わる新たなlncRNAの探索、3.lncRNA阻害によるHR修復不全の誘導を基盤とした腫瘍治療への展開という3項目に大別して研究を推進した。

1については、候補lncRNAのノックダウンによるHR因子の発現への影響について、ウエスタンブロット法により検討した。この際、オフターゲット効果で無いことを確認するため、ノックダウンには複数の独立した配列のsiRNAを用いた。また、ノックダウン効率をqRT-PCRにより確認した。また、HR修復活性を直接的に測るために、本来GFPが分断されているプラスミドを導入し、2本鎖切断のHRによる修復時のみGFPの発光が見られるアッセイ系(DR-GFP)を採用した。GFP発現細胞の定量には、

イメージサイトメーターや FACS を用いた。また、細胞内で、残存 2 本鎖切断の マーカーである γ H2AX の核内集積の免疫染色による評価も実施した。

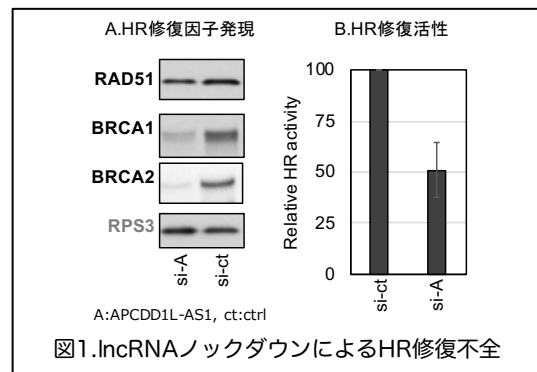
2 については、公共データベース (TCGA、LNCipedia、COSMIC、The Cancer dependency Map 等) や文献を活用し、腫瘍内で発現が高いと考えられる lncRNA 候補を探索した。さらに、申請者らが独自に見出していた、HR 活性を阻害すると考えられる代謝阻害剤があったため、この代謝阻害剤 2 種を細胞に処理した際の発現変動解析を、マイクロアレイ (Agilent Sureprint G3 Human GE microarray) により実施した。発現解析で有望だった候補については、細胞内で上記 1 に記した実験を実施し、HR への影響を調べた。

3 については、細胞内で標的 lncRNA 候補をノックダウンした際の細胞増殖への影響、および DNA 損傷性抗癌剤シスプラチンに対する感受性について検討した。

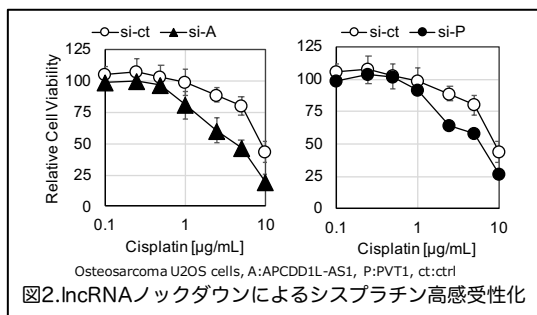
4. 研究成果

まず、研究開始までに、HR 修復因子である BRCA1 や RRAD51 の発現への影響が認められた lncRNA 2 種 (MALAT1 および CKMT2-AS1) について、ノックダウン時のがん細胞への効果をさらに検討した結果、細胞増殖抑制および細胞内における他の HR 因子のタンパク質発現低下を認めた。続いて DR-GFP アッセイによる HR 活性への影響を検討した結果、MALAT1 のみ、ノックダウン時に HR 活性が 60% 程度に低下した。しかしながら、MALAT1 について複数の siRNA を用いて検討を続けた結果、HR 活性への影響が全く見られないものもあったが、これはノックダウン効率と関連していた。

次に、腫瘍内で発現が高いと考えられる lncRNA 候補をデータベース等を用いて探索した。また、申請者らは以前の研究において、miR の機能阻害時に、HR 機能が強く阻害されることを見出していたために、この際に、lncRNA が関与しているのではないかと考え、発現変動解析を実施した。その結果、腫瘍細胞選択的に、HR 修復制御に関与すると考えられた lncRNA 候補を約 20 種選



択し、DR-GFP アッセイにより HR 活性への影響で絞り込みを行った。その結果、3 種類 (APCDD1L-AS1、PVT1、miR4435HG) において、ノックダウン時に HR 活性が 40-60% 程度に低下した。さらに、これらの lncRNA ノックダウン時には、RAD51、BRCA1、BRCA2 等の HR 修復因子の発現が細胞内で低下していた。(図 1 に APCDD1L-AS1 での例を示す。) また、HR 活性の低下は、配列の異なる複数の siRNA で検討し、ノックダウン効率と活性低下とが概ね 相関することを確認した。さらに、これらの lncRNA について、ヒト肺癌細胞株 A549 及びヒト骨肉腫細胞株 U2OS において、ノックダウン時の細胞増殖抑制活性を検討した結果、一定の増殖抑制活性 (20-30% 程度の減少) を認めた。続いて、DNA 損傷性抗癌剤シス



プラチンの感受性について確認した、その結果、APCDD1L-AS1 および PVT1 のノッ

クダウンにより、シスプラチン感受性化することを見出した(図 2)。

最後に、HR 機能維持に関与する lncRNA を異なった観点からさらに探索するために、申請者らが独自に見出していた、HR 活性に関与すると考えられる代謝阻害剤 2 種を細胞に処理した際の発現変動解析を、マイクロアレイ (Agilent Sureprint G3 Human GE microarray) により実施した。その結果、化合物処理時に 3 倍以上発現変動する lncRNA を 10 種(発現低下 3 種、発現上昇 7 種)見出した。興味深いことに、化合物処理時に発現が上昇した GAS5 については、がん抑制遺伝子であり、放射線治療やシスプラチンへの感受性に関与すると既に報告のあるものであった。研究期間内には検証が間に合わなかったが、代謝阻害時において、GAS5 の発現が上昇することにより、腫瘍細胞内における HR 機能調節が破綻する可能性が考えられ、今後検討することによって新たな知見が得られることが期待される。

以上のことから、本研究により HR 機能の維持に関与する lncRNA を複数見出した。また、培養細胞を用いた実験から、機能不全により、HR 修復欠損誘導を介したがん細胞の増殖抑制、抗癌剤感受性増強を誘導可能な lncRNA(MALAT1、PVT1、APCDDL1-AS1)を同定した (図 3)

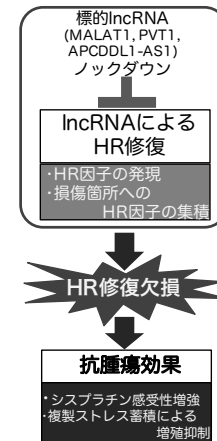


図3. 本研究による成果まとめ

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okamoto Yuka, Saito Takuya, Tani Yuri, Toki Tamami, Hasebe Akiko, Koido Masaru, Tomida Akihiro	4. 巻 295
2. 論文標題 The kinase PERK represses translation of the G-protein-coupled receptor LGR5 and receptor tyrosine kinase ERBB3 during ER stress in cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4591 ~ 4603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.RA119.010655	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡本有加、小井土大、富田章弘
2. 発表標題 解糖系阻害剤2-Deoxy-D-glucoseによるシスプラチン高感受性化
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本有加、富田章弘
2. 発表標題 PERKによる小胞体ストレス下に置けるLGR5不良タンパク質蓄積の防止
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Okamoto, Masaru Koido, and Akihiro Tomida
2. 発表標題 Involvement of PERK in LGR5 depletion under endoplasmic reticulum stress condition
3. 学会等名 the 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本有加、富田章弘
2. 発表標題 解糖系阻害剤2DGによるcisplatin高感受性化へのDNA2本鎖切断の蓄積の関与
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Okamoto, Akihiro Tomida
2. 発表標題 Involvement of homologous recombination repair deficiency in cisplatin sensitization by 2-deoxy-D-glucose
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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