

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15504

研究課題名（和文）Regnase-1による転写後制御が創出するがん悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of cancer malignant transformation created by Regnase-1.

研究代表者

岡崎 慶斗（Keito, Okazaki）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70826289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Regnase-1の非小細胞肺癌（NSCLCs）における機能は不明な点が多い。私はRegnase-1ノックアウト細胞を作成し、RNAシーケンス解析、Oncosphere形成能の評価、少量の細胞を用いた異種移植実験や連続実験を通して、Regnase-1がNSCLCsにおいて、腫瘍幹細胞性に貢献していることを明らかにした。また、Regnase-1の一時的なノックダウン（KD）実験を15種類ものNSCLC細胞株で行うことでその概念が普遍的であること、Regnase-1の薬剤誘導的KD実験を介してRegnase-1の機能抑制による腫瘍の増殖抑制効果を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、Regnase-1はNSCLCsにおいて、普遍的を以て腫瘍幹細胞性の維持を支えていることが証明された。このことは、特に、有望な治療標的の探索に難渋している扁平上皮がんや大細胞がんにおいて臨床的価値が高いと考えられる。また、CD8(+)T細胞でRegnase-1を抑制すると抗腫瘍免疫が増強することが報告されていることから、Regnase-1の阻害はがん細胞、がん微小環境両者に有効な治療と考えられ、今後Regnase-1阻害剤の獲得が期待される。

研究成果の概要（英文）：The function of Regnase-1 in non-small cell lung cancers (NSCLCs) remains to be unclear. To solve that problem, I generated Regnase-1 knockout cells, and demonstrated that Regnase-1 contributes to tumor stem-like phenotype in NSCLCs through RNA sequencing analysis, evaluation of oncosphere-formation, and xenograft and serial transplantation. In addition, by performing transient knockdown (KD) experiments of Regnase-1 in 15 different NSCLC cell lines, I demonstrated that the concept is universal. Finally, I performed drug-induced KD experiments of Regnase-1, which showed that inhibition of Regnase-1 function also suppresses tumor growth.

研究分野：癌研究

キーワード：Regnase-1 腫瘍幹細胞性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Regnase-1 (遺伝子名: **ZC3H12A**) は炎症性サイトカインの mRNA を分解することで炎症を抑制する RNA 分解酵素である。転写因子 **NRF2** が恒常的に活性化している **NRF2** 活性化がんは極めて予後が不良であることが知られている。私は **NRF2** 活性化がんにおける治療候補を探索し、興味深い標的遺伝子として **Regnase-1** を特定した。そこで、**TCGA** データベースを用いた解析を実施したところ、**NRF2** の活性化と **ZC3H12A** の発現の相関は認めなかったものの、興味深いことに **ZC3H12A** の発現が高い非小細胞肺癌 (**NSCLCs**) 患者は予後が不良であった。さらに、がん部の **ZC3H12A** の発現は正常部より高いことがわかった。現在まで **Regnase-1** の **NSCLCs** における機能は明らかになっていないが、近年、**CD8(+)**T 細胞で **Regnase-1** を抑制すると抗腫瘍免疫が増強するとの報告がなされている。そこで、**NSCLCs** において **Regnase-1** ががんの悪性化に貢献する場合、**Regnase-1** の抑制は腫瘍と腫瘍微小環境両者に有効な治療になると考え、**Regnase-1** の **NSCLCs** における機能を調べることにした。

2. 研究の目的

NSCLCs における **Regnase-1** の機能について、幅広く検証することを目的とした。

3. 研究の方法

複数の **NSCLC** 細胞株において、**ZC3H12A** を **CRISPR-CAS9** システムを用いてノックアウトした細胞を樹立し (ΔZ 細胞) その機能について RNA シーケンス解析を用いて検証した。解析を通して **Regnase-1** が腫瘍幹性維持に貢献する可能性が考えられたため、 ΔZ 細胞を用いて低接着培養皿にてオンコスフェア形成能の評価、異種移植実験や連続移植実験を行った。さらに、**siRNA** を用いた一時的な **ZC3H12A** ノックダウン (**KD**) 細胞で、**Regnase-1** による腫瘍幹細胞性維持を幅広く検証した。また、一連の表現型が **Regnase-1** の RNA 分解酵素活性に依存するかを検証するため、**Regnase-1** の RNA 分解酵素を欠失した変異型の構築を ΔZ 細胞に導入して、メカニズムを探求した。最後に、薬剤誘導性 **ZC3H12AKD** の細胞を樹立することで、**Regnase-1** の細胞増殖への貢献についても検証した。

4. 研究成果

Regnase-1 のがん悪性化に貢献する可能性を考えて、**A549** と **H2023** という 2 種類の **NSCLC** 細胞株において ΔZ 細胞を樹立後、RNA シーケンスを行った。2 種類の細胞に共通して、野生型 (**WT**) と比較し ΔZ 細胞において腫瘍幹細胞性のマーカーとして知られる **SOX2** の発現が低下

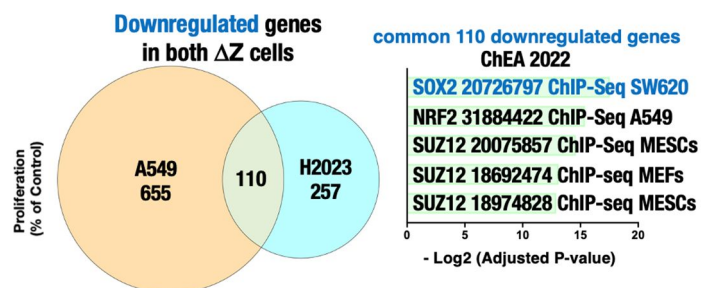


図1 A549細胞、H2023細胞の両者で共通して、WTと比較して Z で有意に低下する遺伝子は 110 個認められた。110 個の遺伝子を Enrichr にて解析した結果、腫瘍幹細胞性に貢献する **SOX2** 経路が有意に低下することが明らかになった。

していることが判明した (図 1)。そこで、腫瘍幹細胞性を調べるため、超低接着培養皿にて **oncosphere** 形成能を評価したところ、確かに ΔZ 細胞ではその低下を認められた。さらに少量の細胞の異種移植実験、連続移植実験を介して **Regnase-1** の腫瘍幹細胞性へ

の貢献を明らかにした。次に、**Regnase-1** の腫瘍幹細胞性維持が **NSCLCs** において普遍的な現象かについて検証するため、**15** 種類に及ぶ **NSCLC** 細胞株を用いて、**siRNA** で一時的な **ZC3H12A KD** 細胞を作成し、**oncosphere** 形成能を調べたところ、**12** 種類の細胞で **sphere** 形成能の低下を認めた。中でも、有望な分子標的の探索に難渋している扁平上皮がんや大細胞がんの細胞株は計 **4** 種類調べ、その全てにおいて **sphere** 形成能の低下を認めた (図 2)。

続いて、**Regnase-1** が担う腫瘍幹細胞性の維持機構が **RNA** 分解酵素活性依存的かを検証するため、**A549 ΔZ** 細胞にマウ

スの **Regnase-1** の **WT**、**RNA** 分解酵素活性化能を欠失した **D141N** 変異体を導入した細胞を作成した。なお、**ZC3H12A** の 3'UTR には複数の **miRNA** が結合し、その発現を負に制御していることが知られている。そこで、本研究では **WT** と **D141N** 変異体とも **ZC3H12A** のコーディング領域のみの構築 (**CDS**) またコーディング領域に 3'非翻訳領域を接続した構築 (**CDS+3'UTR**) を作成し、**ΔZ** 細胞に導入した。**Regnase-1** 発現量を調べたところ、狙い通り **CDS** においては **WT**、**D141N** 変異体レスキュー細胞とも **WT A549** 細胞より発現が亢進した状態になっており、**CDS+3'UTR** では両者とも **WT A549** 細胞と同程度の発現となっていた。興味深いことに、**oncosphere** 形成能は **CDS** では **WT**、**D141N** 共回復しなかったが、**CDS+3'UTR** では両者において回復を示した。すなわち、腫瘍幹細胞性は、**RNA** 分解酵素活性の如何に関わらず、かつ、**WT A549** 細胞程度の **Regnase-1** 発現量が必要であることが示された。私は、以上の検証をさらに **in vivo** にて試みたが、残念ながら実験系の確立には至らなかった。

最後に、ドキシサイクリン (**DOX**) 誘導的な **ZC3H12A KD** 細胞を **H460** 細胞にて樹立し、超低接着培養皿に細胞を播種 **3** 日後、すなわち **oncosphere** が形成されてから **DOX** を投与したところ、**KD** 群では **control** 群と比較して **oncosphere** 形成能の低下を認めた。さらに、異種移植実験においても、腫瘍形成後に **Regnase-1** の誘導的 **KD** を行ったところ、**KD** 群 **control** 群と比較して著明な腫瘍増殖の抑制効果を示した (図 3)。

異常の研究結果から、**Regnase-1** は **NSCLCs** において、普遍性を以て腫瘍幹細胞性に貢献することが明らかになった。このことは、治療標的の探索に難渋している扁平上皮がんや大細胞がんにおいて、特に臨床的価値が高い発見と考えられる。

図 2 大細胞がん細胞株の H460、扁平上皮がん細胞株の LK-2、EBC-1、SKMES-1 細胞で一時的に **ZC3H12A** を KD して **oncosphere** を形成させ、生細胞数を数えた。全ての細胞株で、control 群と比較して **ZC3H12A KD** 群で生細胞数の低下を認めた。

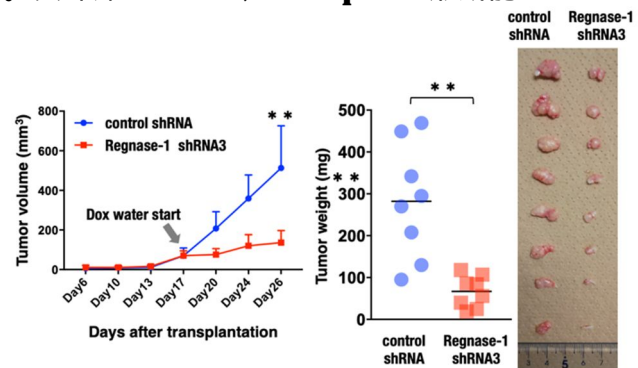


図 3 大細胞がん細胞株である **H460** 細胞で **DOX** 誘導的 **ZC3H12A KD** 細胞を樹立し、移植 17 日後に **DOX** を投与したところ、**KD** 群で **Control** 群と比較して有意に腫瘍の増大が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡崎慶斗
2. 発表標題 Newly-discovered ZC3H12A 3' UTR Function Promotes Cancer Malignancy in NRF2-activated NSCLC
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 岡崎慶斗
2. 発表標題 NRF2活性化がんにおけるRNA分解酵素Regnase-1の機能解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 岡崎慶斗
2. 発表標題 Regnase-1は非小細胞肺がんの腫瘍幹細胞性に貢献する
3. 学会等名 第83回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2024年～2025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
---------------------------	-----------------------	----

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