

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26710006

研究課題名(和文) テロメラーゼ非依存的テロメア維持機構を標的としたがん治療法の確立

研究課題名(英文) Suppression of telomerase-independent telomere maintenance mechanism in cancer cells

研究代表者

定家 真人 (Sadaie, Mahito)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：70415173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の増殖には、染色体末端を保護するテロメアの維持が不可欠である。本研究では、肉腫などの難治性がんが利用する「テロメラーゼに依存しないテロメア維持機構(ALT機構と呼ばれる)」を標的としたがん抑制法の開発を行った。その結果、ALTがん細胞の染色体に特異的に結合する蛋白質を同定した。これらはALTタイプのがんの増殖を抑えるための分子標的になると期待される。また、ALTがん細胞の増殖を抑制し、正常細胞の増殖には影響しない化合物を同定し、本化合物がALT細胞内でDNA損傷活性を持つ形に変換され実際DNA損傷を与えることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Telomere maintenance is required for continuous proliferation of cancer cells. Many sarcoma cells maintain telomeres without telomerase. This telomerase-independent mechanism is known as ALT (alternative lengthening of telomeres). In the present study, we sought to develop method(s) by which proliferation of ALT cancer cells can be suppressed. We first isolated proteins that are specifically bind chromosomal DNA in ALT cells. These proteins can be a molecular target for suppressing ALT cell's growth. We also identified a compound that inhibit proliferation of ALT cells but not that of normal cells. The compound is converted to genotoxic form and induced DNA damage in ALT cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子 がん ゲノム トランスレショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

テロメアは、染色体の末端にある、一定の配列(ヒトではTTAGGG)が繰り返したDNAと、その繰り返しに結合する幾つものタンパク質からなる複合体で、染色体末端DNAを保護するキャップのような機能を持ち、染色体の維持に必須の構造体である。テロメアは細胞分裂のたびに徐々に短小化することが知られており、有意にテロメアが短小化し末端保護機能を喪失すると、染色体末端が切断されたDNAとして認識されることで、細胞は不可逆的に増殖を停止したり(細胞老化)、染色体末端同士が融合することで細胞死が誘導されたりする。正常体細胞では、このような増殖抑制効果が働くが、がん細胞では、この効果から逃れ、活発な増殖を維持するために、テロメア長を維持する機構が活性化している。そのテロメア維持機構は少なくとも二種類あり、第一はテロメア伸長酵素テロメラーゼによるもの、第二はテロメラーゼ非依存性の維持機構(ALT: Alternative Lengthening of Telomeres)と呼ばれ、DNA相同組換えによるものである(図1)。全臨床がん症例のうち、90%はテロメラーゼの活性化に、10%はALT機構の活性化に依存することが知られている。がんにおける活性化頻度の高さから、テロメラーゼはがん治療の格好の分子標的として注目され、その阻害剤の開発が進められてきた。一方で、ALT機構は、分子メカニズムの解明は進められているものの、がん治療を目的とした研究はほとんど行われておらず、本機構に注目した有効な治療薬は未だ存在しない。

これまでの研究により、ALT機構に特徴的なマーカーや、ALT依存性の細胞増殖に必要な因子が発見されている。その代表的なものは、正常細胞やテロメラーゼ陽性のがん細胞には認められない核内構造体APB(ALT-Associated PML Body)や、RAD51をはじめとするDNA相同組換えに直接関わる一連のタンパク質群である。APBはテロメアとPML(ProMyelocytic Leukemia)タンパク質が共局在する構造体として定義され、PMLが形成するカゴ状の構造体の中に、複数のテロメアと、DNA相同組換えに関わるタンパク質が集合し、効率的なテロメア相同組換えが実行されていると考えられている。つまり、テロメア繰り返し同士の相同組換え「反応」と、反応効率を上げる「場」が与えられていることが、ALT依存性ががん細胞の増殖には必要である。実際に、「反応」に関わるDNA組換え酵素、ヘリカーゼ、DNA修復因子、そして「場」を提供するPML、SUMO化酵素などをALT細胞でノックダウンすると、DNA相同組換えによるテロメア維持機構が失われ、細胞分裂のたびに徐々にテロメアが短小化することで、やがて細胞老化を迎えることが明らかにされている。しかし先行研究においては分子機序の解明に重点が置かれており、これらのALT関連因子の機能阻害が、腫瘍を

取り巻く正常細胞に影響を与えないかどうか、つまりALTがん細胞選択的であるかどうかは調べられていないため、治療方法として有効かどうか明らかでない。また、このような漸進的なテロメア短小化に依存した細胞増殖抑制のアプローチも有効ではあるが、より即効性があり、かつがん細胞に選択性を持つ治療法の開発が望まれている。

申請者が所属する研究室では、ALT細胞に特徴的なテロメア構造を見いだすために研究を進めた結果、ALT細胞ではテロメアDNAにニックやギャップ、複雑な二次元構造が含まれることを見いだした。相同組換えの過程で生み出されるこれらの不安定なDNA構造は、ALT細胞に特徴的な染色体脆弱性を与え、漸進的なテロメア短小化よりも早くがん細胞の増殖抑制を誘導するための治療標的になると期待されるが、未だそのような脆弱性を狙った手法の発見には至っていない。また、2009年にDejardinらが、ALT細胞とテロメラーゼ陽性細胞を比較して、ALT細胞のテロメアとのみ相互作用するタンパク質を、テロメアDNAを免疫沈降する方法により同定した報告以外に、網羅的にALT関連因子の取得を試みた例がないため、未だ同定されていない新規ALT特異的分子が存在する可能性が高い。そこで、ALT細胞の染色体にのみ作用するタンパク質分子の網羅的な探索を実施し、小分子化合物によるALT特異的分子とALT細胞増殖の阻害剤の開発をするという着想にいたった。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究経過をもとに、本研究では、より高い選択性や即効性のあるALT関連がんの治療を実現するための標的を見だし、その標的の阻害方法と、ALT細胞の増殖抑制作用機序を解明することを目指した。

3. 研究の方法

研究の目的を果たすために、以下に示す方法で研究を進めた。

(1) ALTがん細胞に特徴的な染色体結合性分子の探索

ALT細胞特異的な染色体脆弱性に関わる因子を見いだす目的で、ALT細胞とテロメラーゼ陽性細胞のクロマチンを抽出し、ALT細胞にのみ見いだされるタンパク質を分離・抽出し、質量分析器により同定した。

(2) ALTがん細胞に特徴的な染色体結合性分子の機能阻害剤の開発と作用機序の解明

上記(1)で取得された分子、さらにALT細胞の増殖に必要なことが知られている既知の分子の機能を、RNA干渉法により阻害し、ALTがん細胞の増殖がどのような仕組みで抑制されるか調べた。

(3) 遺伝学的手法を用いた ALT 特異的因子の単離

クロマチンから ALT 細胞特異的な因子の同定を試みる以外に、遺伝学的手法を用いた ALT 特異的因子の単離も試みた。CRISPR-Cas9 システムを用いた、遺伝子変異導入ガイド RNA ライブラリーを用いて、ALT 細胞の増殖を阻害だけを阻害するガイド RNA をスクリーニングにより取得する実験系の構築を行った。ここでは、1 万 9 千あまりの遺伝子に対するガイド RNA のプールライブラリーを用いた。

(4) ALT がん細胞に特異的な細胞増殖阻害化合物の単離

骨肉腫由来のがん細胞株には、ALT タイプのテロメア維持機構を利用するものと、テロメラーゼによりテロメア維持を行うものが存在する。この二つのタイプのがん細胞を用い、ALT がん細胞の増殖のみ抑制する化合物をスクリーニングにより取得し、その細胞増殖抑制の作用機序を明らかにする試みを行った。

(5) ALT がん細胞増殖を抑制するアプローチのがん選択性の精査

ヒト正常線維芽細胞と、ALT 細胞を比較することにより、(4)の方法で得られた化合物を細胞に作用させた場合、正常細胞には影響を与えず、ALT 細胞の増殖のみ抑制するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) ALT がん細胞に特徴的な染色体結合性分子の探索

研究代表者が所属する研究室で保有している複数の ALT 細胞株とテロメラーゼ陽性細胞株について、細胞抽出液からクロマチンを含む画分を得て、ALT 細胞にのみ共通して見出されるタンパク質を質量分析器で解析した結果、フィラミン A とアクチンが同定された。今後、同定されたタンパク質が、クロマチン免疫沈降法でテロメアやその他の領域に局在するか調べることが重要である。

(2) ALT がん細胞に特徴的な染色体結合性分子の機能阻害法の開発と作用機序の解明

同定されたタンパク質のうち、フィラミン A に対するノックダウン用の shRNA 発現ベクターをまず作成した。また、既に ALT 細胞の増殖に重要であることが知られているタンパク質のノックダウン用 shRNA 発現ベクターも作成した。これらのベクターを、テロメラーゼ陽性細胞と ALT 細胞に導入して、それぞれの細胞に増殖の違いがあるかどうかを検討したところ、フィラミン A のノックダウンに関しては、ALT 細胞への特異性は認められず、テロメラーゼ陽性細胞株でも増殖の抑制が認められた。既知因子である MUS81 のノックダウンは、HOS テロメラーゼ陽性細胞

に比べて、SaOS-2 ALT 細胞の増殖阻害率の低下の方が大きかった。

細胞抽出液のクロマチン画分から得られた、ALT 細胞特異的なタンパク質は、主に細胞質に局在し、複数の細胞機能を持つタンパク質であると考えられる。そのため、ノックダウンした場合にテロメラーゼ陽性細胞、ALT 細胞問わず増殖が抑制されたと考えられる。今後はタンパク質の核内機能のみを抑制するような変異体を作成し、注目する機能の範囲を絞った解析が必要であると考えられる。

(3) 遺伝学的手法を用いた ALT 特異的因子の単離

ALT 細胞株とテロメラーゼ陽性細胞株に、Cas9 スクレアーゼとガイド RNA を発現させるベクターを導入し、ベクターをゲノム上に保有する細胞のみ選択したのち、1 日後の細胞 (PS1) と、12 日後の細胞 (PS12) を回収した。ガイド RNA は、1 万 9 千あまりの遺伝子に対してそれぞれ 3 種類ずつ設計されたもののほか、miRNA に対するもの、ヒトゲノムにない配列に対するものを含む約 6 万 5 千種類が混合されたライブラリーである。PS1 と比較して PS12 細胞での全ガイド RNA ベクターに対するあるガイド RNA ベクターの存在比が減少していれば、そのガイド RNA のターゲット遺伝子は細胞増殖に必要であると考えられる。

回収した細胞からゲノム DNA を調製し、ガイド RNA をコードする部分の近傍を一度 PCR で増幅させた。この PCR 産物を鋳型として、まずは、ヒト細胞の増殖に必要であることが知られている RPS19 に対するガイド RNA に固有のプライマーを用いて、このガイド RNA ベクターの存在量を定量的 PCR で解析した。その結果、ALT 細胞株とテロメラーゼ陽性細胞株の両方において、PS1 に比べて PS12 での RPS19 ガイド RNA ベクターの存在比が減少していた。この結果は、本研究で行った CRISPR-Cas9 システムを利用した遺伝学的スクリーニングが順調に進んでいることを示唆する。

この CRISPR-Cas9 システムを利用した網羅的なガイド RNA スクリーニングは、異なる腫瘍由来の ALT がん細胞株とテロメラーゼ発現がん細胞株の比較に基づくものであった。両細胞株の間では、テロメア維持機構の違い以外にも、遺伝学的な差異がある可能性があり、たとえ ALT がん細胞の増殖を特異的に抑えるガイド RNA が得られたとしても、それが偽陽性ヒットである可能性を排除できない。そこで、ALT における ATR-X の機能不全に着目し、ATR-X 遺伝子変異を持つ細胞株と持たない細胞株 (同じ細胞株由来の) を比較することで、ATR-X 変異を持つ細胞の増殖を特異的に阻害するガイド RNA を見出すことを目指して、改めてガイド RNA のスクリーニングを実施する方が適切であ

ると考えた。

今後スクリーニングにより標的遺伝子が見つかった場合は、その遺伝子への変異導入、あるいは阻害剤により遺伝子機能の阻害を試みる。効果的に機能を阻害できる方法が見つかったら、ALT 細胞でこの阻害を実行し、細胞増殖の抑制（細胞死や細胞老化の誘導）が起こるかを調べる。また、標的タンパク質の機能阻害から、細胞増殖停止までに必要とされる期間に着目して、この期間ができるだけ短くなるような標的遺伝子を探す。

(4) ALT がん細胞に特異的な細胞増殖阻害化合物の単離

(5) ALT がん細胞増殖を抑制するアプローチのがん選択性の精査

ガイド RNA スクリーニングと並行して、ALT がん細胞とテロメラーゼ発現がん細胞を用いた、ALT 細胞特異的な増殖阻害剤の化合物スクリーニングを進めた。この化合物スクリーニングから得られた一つの有力なヒット化合物について、増殖阻害の細胞株特異性を調べたところ、少なくとも、正常細胞や骨肉腫由来のテロメラーゼ依存性がん細胞に比べ、骨肉腫由来の ALT 細胞は、本化合物 (AuD) に高い感受性を示すことがわかった。本化合物は、細胞内で代謝されて、DNA の塩基部分と共有結合しうる活性型に変化し、さらに、本化合物が付加された DNA は結果として DNA 二重鎖切断 (double strand break: DSB) を引き起こすと考えられている。そこで、本化合物で処理した ALT 細胞の核内の DNA-DSB を検出するために、抗 gamma-H2AX (γ -H2AX) 抗体や、抗 53BP1 抗体を用いた間接蛍光抗体染色を行ったところ、本化合物で処理した ALT 細胞では、AuD の濃度依存的に 53BP1 や γ -H2AX のシグナルが増加することがわかった。また、本化合物が示す ALT 細胞の増殖阻害活性は、本化合物を細胞内で代謝する酵素 CYP3A4 の阻害剤 (ケトコナゾール) を加えることにより軽減されることがわかった。これに対し、ケトコナゾールは非 ALT 細胞の増殖には影響を与えなかった。以上の結果から、ALT 細胞では AuD が CYP3A4 により遺伝毒性のある化合物に変換され、DNA 損傷を与えることが示唆された。このように、ガイド RNA スクリーニングについては、その方策に改善の必要性があることが判明したものの、化合物スクリーニングで一定の進展が見られた。

今後、骨肉腫由来の ALT 細胞が AuD に対して高感受性を示すメカニズムが明らかにされれば、マウスを用いた異種移植実験により、ALT がん細胞の腫瘍成長抑制、腫瘍退縮が見られるかどうか調べる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

〔その他〕

国内研究会口頭発表

(1) 定家真人 テロメラーゼ非依存性がんの脆弱性の探索とがん抑制手法の開発. 染色体研究の最前線 2018. 横浜 (2018 年 3 月)

(2) 定家真人 がんの脆弱性の探索とがん抑制手法の開発. 西東京クロマチン研究会. 東京 (2018 年 2 月)

学術総説

(1) 定家真人, 石川冬木 合成致死を利用したがん治療. 日本臨牀 72(増刊 2), 84-89 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定家 真人 (Mahito Sadaie)

東京理科大学・理工学部・准教授

研究者番号: 70415173

(4) 研究協力者

石川 冬木 (Fuyuki Ishikawa)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授