

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19382

研究課題名（和文）条件的遺伝子発現系の理論的構築による新規DNA修復欠損がん診断・治療戦略の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategies for DNA repair-deficient cancer

研究代表者

足立 典隆（Adachi, Noritaka）

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科（八景キャンパス）・教授

研究者番号：30264675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNA修復（相同組換えおよびミスマッチ修復）の状態を正しく判断するための新たな戦略を開発するべく、さまざまなDNAコンストラクトを系統的に構築し、その性能や効果に関する評価を幅広く行った。本研究で得られた成果は、正確で迅速なDNA修復能評価法の確立のみならず、条件的遺伝子発現を利用した副作用の小さいがん治療戦略の開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復機構の異常は悪性腫瘍全体の25%以上にみられる。本研究の成果は、特定の悪性腫瘍におけるDNA修復の状態を正確に判定するための基盤技術となり、適切な化学療法を選択するための正しい判断基準の提供につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, an extensive number of DNA constructs were systematically constructed to develop novel strategies for assessing the state of DNA repair in cultured cells and tumor tissues. Using these constructs, we have succeeded in rapidly detecting the cellular status of homologous recombination and mismatch repair, which act as guardians of the human genome.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 がん 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

DNAは決して安定な分子ではなく、さまざまな内的・外的要因により細胞内で絶えず損傷を受けている。とりわけ二本鎖切断は生体にとって最も脅威となるDNA損傷であり、相同組換え(homologous recombination; 以下HR)で修復されない限り、たとえ正しいプロセスで修復が行われてもほぼ必ずゲノムDNA中に変異が生じる。一方DNA塩基対のミスマッチは通常正しく修復されるが、ミスマッチ修復(mismatch repair; 以下MMR)機構に異常があると、ゲノムDNA中に変異が生じる頻度が著しく上昇する。したがって、HRとMMRはゲノム恒常性の維持に極めて重要なDNA修復機構である。実際、その異常や欠損は変異率の上昇やゲノムの不安定化を招き、多種多様な臓器においてがん化を引き起こす。HRやMMRの欠損は悪性腫瘍全体の25%以上にみられる。

近年、HR欠損がんの治療にはポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)阻害薬が、MMR欠損がんの治療には免疫チェックポイント阻害薬(PD-1阻害薬)が有効であることがわかってきており、それぞれ分子標的薬として確固たる地位を築いている。しかしながら副作用の問題や薬剤耐性の問題は未解決である。また、現行のコンパニオン診断は間接的な所見のみ(すなわち一部の遺伝子の変異の有無やゲノム変異の蓄積の解析)に依存しており、信頼性に欠けるという問題点がある。「効く患者さんだけに投与し、無駄な投薬は避ける」という観点から考えると、信頼度の高い(モレのない)診断法の開発が今後必須となる。最近、BRAF阻害薬やEGFR阻害薬などの分子標的薬に長期間暴露した腫瘍組織に出現する耐性がん細胞集団ではHRとMMRの活性がともに著しく低下していることが報告された(*Science*, 366:1473, 2019)。この知見は、DNA修復遺伝子に変異をもたない細胞においてもDNA修復活性が低下しうること、またDNA修復欠損がんを対象とした治療戦略がBRAF/EGFR阻害薬耐性を獲得した種々のがん種にも適用可能であることを意味する。したがって、従来よりも優れたDNA修復欠損がんの診断・治療戦略の開発は今後一層がん治療分野全般に有益となる。

2. 研究の目的

本研究では、二本鎖DNAをモダリティとした全く新しいアプローチにより、DNA修復(HRおよびMMR)欠損がんを対象とした新たな診断法・治療法を開発することを目的とする。

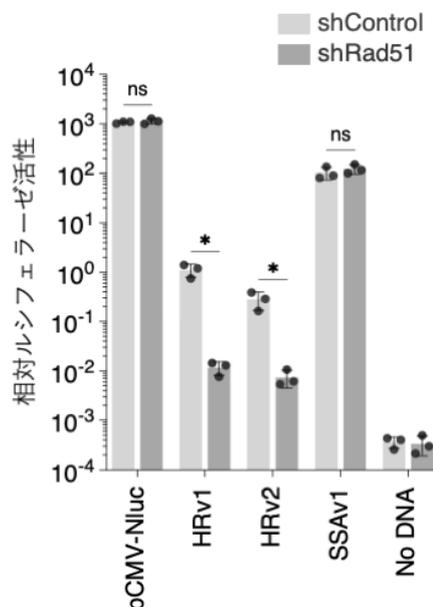
3. 研究の方法

DNA修復活性に依存して機能的な遺伝子を生成するDNAカセットを理論的に構築し、これを一過性に細胞に導入した際の効果、すなわち①DNA修復能の迅速評価における有効性と②選択的な殺細胞効果、についてさまざまなヒト細胞を用いて検討を行った。検出用の遺伝子としてはGFP遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子、およびそれらを改変したものを使用した。殺細胞用の遺伝子としてはDT-A遺伝子やHSV-tk遺伝子、およびそれらを改変したものを用いた。種々のヒト細胞株への遺伝子導入にはエレクトロポレーション法もしくはリポフェクション法を用いた。

4. 研究成果

(1)HR欠損細胞を検出できる系の開発とPARP阻害薬耐性がん治療への応用

さまざまなDNAカセットを構築し解析を行った結果、HRに依存した条件的遺伝子発現に最も有効なDNAカセットを2種類決定することができた。このうち1つ(HRv1)は比較的シンプルな構造であったが、もう一方(HRv2)は不完全な遺伝子を分割し別々のDNA上に搭載するというオリジナリティの高い構造であった。いずれのDNAカセットにおいてもBRCA1やBRCA2の欠損、RAD51(HRの必須因子)のノックダウンにより、マーカー遺伝子の発現の著しい低下が見られたことから、たしかに細胞内のHRを検出していることが立証された(右図参照)。(後述する類似のDNAカセット(SSAv1)ではこうした結果は得られず、BRCA1やBRCA2、RAD51に依存しない反応の観察に適していることがわかった)。なお、HRv1、SSAv1ともに細胞への導入後速やかに遺伝子発現が観察された(次ページの上図を参照; U2OS細胞での結果、横軸は時間(hr)を示す)。次に、検出用のマーカー遺伝子の代わりに殺細胞用遺伝子(を分割した断片)を搭載したDNAカセットを構築し、細胞に導入したところ、予想通りHR活性に依存した殺細胞効果が観察された。こうした戦略は、PARP阻害薬への耐性を獲得したBRCA1/2欠損がん(現時点では治療する術がない)の診断や治療に活用できる可能性がある。

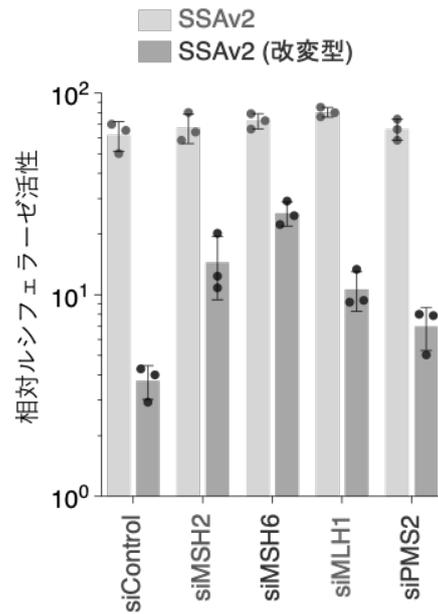
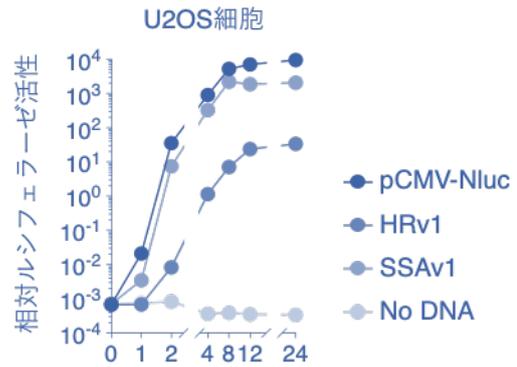


(2) MMR 欠損細胞を検出・殺傷できる系の開発

次に先述の DNA カセット SSAv2 を活用し、MMR がこの反応を抑制するという仮説に基づき、さまざまな改変型 DNA カセットを構築し解析を行った結果、組換え基質間の DNA 配列の相同性が一定数低下したところで MMR 活性の有無に応じて遺伝子発現に有意な差が生じることがわかった。しかし、この差は期待したほどではなかったため、新たな改変型 DNA カセットの構築を多数試みた。その結果、試行錯誤の末、条件的遺伝子発現に有効な DNA カセット (SSAv2、SSAv3) を決定するに至った。これらの DNA カセットでは MMR 活性の有無により最大で 100 倍以上の差が生じることがわかった (結果の一例として SSAv2 におけるノックダウン実験の結果を右下図に示した)。次に、検出用のマーカー遺伝子の代わりに殺細胞用遺伝子 (を分割した断片) を搭載したカセットを構築し細胞に導入したところ、期待通り MMR を欠損した細胞において強い殺細胞効果がみられることがわかった。デリバリーの課題は残るものの、こうした戦略は MMR 欠損がんを対象とした新たな遺伝子治療に有効活用できることが期待される。

(3) まとめと展望

最適な個別化医療の実現のためには、薬剤の腫瘍特異性の向上と副作用の低減を指向した研究に加え、信頼度の高い簡便なコンパニオン診断法の開発が重要と考えられる。特定の遺伝子変異のみで薬効を予測するのは容易ではなく、検査に「モレ」が生じているのが現状である。本研究では、これまでに自身が解明してきた DNA 組換えのメカニズム (*Nat. Commun.*, 2024 等) をベースとして、従来とは全く異なるアプローチ、すなわち「細胞内の DNA 修復活性を直接調べ、それを利用する」という全く新しいコンセプトに基づいた診断法と治療法を提案し、その有効性を実証した点に大きな意義がある。本研究の成果により臨床的に有効な分子標的薬の適応対象を拡大することができれば従来の治療体系を変革できる可能性がある。



その有効性を実証した点に大きな意義がある。本研究の成果により臨床的に有効な分子標的薬の適応対象を拡大することができれば従来の治療体系を変革できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito S, Adachi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization and regulation of cell cycle-independent noncanonical gene targeting	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-49385-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa A, Saito S, Sakurai M, Shinozuka M, Someya Y, Adachi N.	4. 巻 290
2. 論文標題 Arsenic affects homologous recombination and single-strand annealing but not end-joining pathways during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 5313-5321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16922.	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0件

〔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
---------	---------