

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19469

研究課題名（和文）グアニン四重鎖による翻訳制御に潜むがん細胞選択的な脆弱性

研究課題名（英文）Cancer cell-specific vulnerability hidden in G-quadruplex-regulated translation

研究代表者

清宮 啓之（SEIMIYA, Hiroyuki）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

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）：グアニン四重鎖（G4）安定化化合物（G4リガンド）による翻訳抑制の標的特異性と制がん分子機構の解明を目指し、以下の成果を得た。まず、G4リガンド感受性がん細胞にG4リガンドを処理したときに絶対量が減少または翻訳効率が低下するタンパク質群は、遺伝子コード鎖の5'非翻訳領域におけるG4形成配列密度が高いことが判明した。これらのタンパク質群には翻訳やリボソーム生合成に関与する因子が多く含まれており、G4リガンドを処理したがん細胞株では時間依存的にタンパク質生合成が抑制されることが見出された。以上より、G4リガンドはRNA G4を過度に安定化することで翻訳を抑制し、制がん効果を発揮すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、G4の安定化はゲノムワイドな翻訳抑制をもたらすことが明らかとなった。バクテリアではゲノムからG4形成配列が進化の過程で排除されている一方、真核生物では多数のG4形成配列が出現するとともにG4を解消するヘリカーゼなどが発達していることを考え合わせると、G4はゲノム機能のfine tunerとして働くものと考えられる。一方、医療への応用面では、本研究で得られた知見はG4を標的とした新規がん治療薬開発のための基盤概念になると期待される。とりわけ、G4リガンド感受性のがん細胞には肺がん・膵がん・神経膠芽腫などの難治がんが多く含まれており、本研究成果の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the target specificity of translation inhibition by G-quadruplex (G4) stabilizing compounds (G4 ligands) and their anticancer molecular mechanisms, the following findings were obtained. First, in G4 ligand-sensitive cancer cells treated with G4 ligands, proteins that showed a decrease in absolute amount or a reduction in translation efficiency had a high density of G4-forming sequences in the 5'-untranslated regions of the gene-coding strands. These proteins included many factors involved in translation and ribosome biogenesis, and it was confirmed that protein biosynthesis was inhibited in a time-dependent manner in G4 ligand-treated cancer cells. These observations suggest that G4 ligands exert anticancer effects by excessively stabilizing RNA G4 structures, thereby inhibiting translation.

研究分野：腫瘍治療学、分子生物学

キーワード：グアニン四重鎖 翻訳制御 抗悪性腫瘍薬 薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

(1) グアニン四重鎖安定化合物 (G4 リガンド) によるテロメア DNA 損傷

DNA 複製に伴う染色体末端テロメアの短縮は、細胞老化を誘導することで細胞の無限増殖を抑える働きがある。約 90% のがん細胞は、テロメア合成酵素テロメラーゼを活性化しており、不老不死の性質を示す。我々はこれまでに種々のテロメラーゼ阻害剤を開発・評価し、その制がん効果を実証してきた (Seimiya et al. *Cancer Cell*, 2005 など; Reviewed in Seimiya, *Cancer Sci*, 2020)。テロメラーゼ阻害剤の中でもとりわけ、放線菌由来のテロメスタチンという化合物をがん細胞に処理すると、短時間のうちにテロメアの末端保護機能が損なわれ、増殖抑制・細胞死が観察される (Tahara et al. *Oncogene*, 2006)。その分子作用機序として、テロメア反復配列 (TTAGGG)_n はグアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) と呼ばれる高次核酸構造を形成し、テロメスタチンはこの構造を強力に安定化することでテロメアの機能不全を誘導する。我々はさらに、テロメスタチンおよびその合成誘導體類 (オキサゾールテロメスタチン誘導體類) などの G4 安定化合物 (G4 リガンド) が、テロメアなどで複製ストレスおよび DNA 損傷を誘導し、難治性のヒト神経膠芽腫細胞およびそのがん幹細胞を殺傷することを報告した (Miyazaki et al. *Clin Cancer Res*, 2012; Hasegawa et al. *BBRC*, 2016; Nakamura et al. *Sci Rep*, 2017; PCT/JP2019/028398)。その分子作用機序として、神経膠芽腫幹細胞は複製ストレスに過敏であり、G4 リガンドによるテロメア DNA 損傷が特に起こりやすいことを見出してきた (Hasegawa et al. *BBRC*, 2016; Reviewed in Seimiya et al. *J Antibiot*, 2021)。

(2) G4 の生物学的意義とその動態制御による細胞脆弱性の誘導

重要なことに、テロメア DNA の塩基配列はヌクレオソーム形成に要するエネルギーが高く、G4 を形成しやすい。G4 は本来、DNA 複製の障壁となりうるが、テロメアのグアニンに富む反復配列は進化の過程で淘汰されず、高度に保存されている。これらのことから、G4 には生物学的に何らかの合目的性があると推定される。事実、我々は、テロメラーゼの過剰発現によるテロメアの伸長に伴って蓄積する、G4 形成性のテロメア非コード RNA (TERRA) や、これを模倣した G4 形成オリゴヌクレオチドがインターフェロン/自然免疫系遺伝子群の発現を抑制することを見出している (Hirashima et al. *Mol Cell Biol*, 2013; *Nucleic Acid Res*, 2015; Okamoto et al. *Cells*, 2019; *J Biol Chem*, 2019; Matsumoto et al. *Genes Cell*, 2021)。これらの知見から我々は、G4 はゲノム機能の調節因子として重要であり、ある種のがん細胞ではこの構造の過度な安定化に伴って脆弱性が生じるのではないかと推定した。事実、G4 リガンドは DNA の相同組換え修復機構を欠損したがん細胞に対して合成致死 (synthetic lethal) な細胞増殖抑制効果を発揮する。我々の予備検討においても、上述のテロメスタチンやその誘導體類を含む種々の G4 リガンドが、様々な臓器由来のヒトがん細胞株のうち、肺がん・膵がん・神経膠芽腫を含む約 3 割の細胞株に対してのみ、強い増殖抑制効果を発揮すること、さらに、ヒトがん細胞株を移植したゼノグラフト腫瘍マウスモデルにおいて、忍容用量範囲で制がん効果を発揮することを確認している。

(3) 転写・翻訳に対する G4 リガンドの影響

興味深いことに、G4 リガンドに超感受性 (hyper-sensitivity) を示したがん細胞株のうち、膵がん、乳がんおよび一部の肺がん細胞株では、G4 リガンドを処理しても DNA 損傷応答がほとんど観察されなかった。このことは、G4 リガンドが DNA 以外の標的、すなわち RNA にも作用する可能性を示唆している。事実、G4 は RNA 上でも形成されるため、その動態はタンパク質翻訳にも影響を与えると予想される。G4 は、転写が盛んな領域、とりわけがん関連遺伝子のプロモーター領域や 5' 非翻訳領域 (ならびに転写された RNA 上の同領域) に多く存在することが報告されており (Hänsel-Hertsch et al. *Nat Genet*, 2016)、これらの領域での G4 の過剰な解消はがん関連遺伝子の発現を上昇させ、発がんに繋がると推定される。したがって、G4 の安定化はこれらの遺伝子・タンパク質発現を抑えることで制がん効果を発揮する可能性がある。しかしながら、本研究の開始当初はそのような仮説の妥当性および具体的な分子作用機序は明らかでなかった。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では G4 リガンド超感受性がん細胞のタンパク質翻訳システムに刻み込まれた、「G4 の安定化に伴って露呈する細胞脆弱性」の存在を仮定し、その本質に迫ることを目的とした。研究の具体的な達成目標として、以下の 2 点を掲げた。

(1) G4 リガンドによって発現 (翻訳) が抑制されるタンパク質群の遺伝子塩基配列上の特徴を分析することで、G4 安定化によるゲノムワイドな翻訳抑制の標的特異性を明らかにする。

(2) 上記で明らかにしたタンパク質群の機能および発現様態を把握し、G4 安定化がリガンド超感受性がん細胞の生存・増殖システムを破綻に導く分子機構を明らかにする。

本研究によって得られる成果は、これまでのゲノム・エピゲノム研究の軸であった核酸の

「塩基配列」や「化学修飾」でなく、核酸の「形態」によるゲノム機能の制御を提唱するばかりでなく、創薬シーズ化合物としての G4 リガンドの分子作用機序の理解ならびに効果予測診断などへの応用につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) G4 安定化によるゲノムワイドな翻訳抑制の標的特異性

我々は準備検討にて、様々なヒト臓器由来の培養がん細胞株 50 種を用いた準備検討により、母核構造の異なる複数の G4 リガンド（天然化合物テロメスタチンや合成化合物 Phen-DC3 など）に強い感受性を示すがん細胞 11 株を臓器横断的に同定している。これらのうち 6 つのがん細胞株は、G4 リガンドによる複製ストレスおよび DNA 損傷応答を示さないため、DNA のみならず RNA も G4 リガンドの標的となることが想定される。そこで、本研究ではまず、G4 リガンドを処理した G4 リガンド超感受性がん細胞株のトランスクリプトーム（GeneChip マイクロアレイ）およびプロテオーム（isobaric tag for relative and absolute quantitation: iTRAQ）複合解析を実施した。また、G4 リガンドによって個々の mRNA からタンパク質への翻訳効率がどのように変化するかを Ribo-seq 解析により検討した。さらに、これらの解析で変動が確認されたタンパク質群の発現量について、ウェスタンブロット法で個別に検証解析を行った。遺伝子塩基配列中の G4 形成配列は QGRS Mapper アルゴリズムにて検索し、スコア化した。

(2) G4 安定化ががん細胞の生存・増殖システムを破綻に導く分子機構

上記オミクス解析で同定された、G4 リガンド処理で減少するタンパク質群の遺伝子オントロジー（gene ontology: GO）解析を Metascape および STRING などのプラットフォームを介して実施した。その結果を踏まえ、G4 リガンドをがん細胞に処理した際のタンパク質合成レベルを Surface sensing of translation (SUnSET) アッセイ法にて解析した。また、Click-IT L-homopropargylglycine (HPG) および AlexaFluor488-Azide のクリックケミストリーを利用したイメージング観察系を構築し、G4 リガンドが生細胞内のタンパク質翻訳に与える影響について蛍光顕微鏡を用いて解析した。さらに、蛍光プローブを用いて G4 リガンドの細胞内局在を観察した。合成オリゴヌクレオチドの試験管内 G4 形成は、円二色性スペクトル分析により確認した。被検遺伝子 cDNA からの試験管内転写・翻訳反応および翻訳反応は、それぞれ TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems および Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System を用い、メーカー推奨プロトコールに従って実施した。小分子干渉 RNA によるノックダウン実験は、RNAiMAX Transfection Reagent を用い、常法に従って行った。標的遺伝子の mRNA 量は RT-qPCR 法で定量した。

4. 研究成果

(1) G4 安定化によるゲノムワイドな翻訳抑制の標的特異性

G4 リガンドで処理した G4 リガンド超感受性ヒト膵がん細胞株のトランスクリプトームおよびプロテオーム複合解析を実施した結果、G4 リガンド処理によって減少するタンパク質群は、同リガンド処理によって増加する、あるいは量的に変動しないタンパク質群と比較して、遺伝子コード鎖（センス鎖）の 5'非翻訳領域における G4 形成配列密度が有意に高いことが見出された。そこでさらに、G4 リガンドによって個々の mRNA からタンパク質への翻訳効率がどのように変化するかを Ribo-seq 解析にて検討した。その結果、G4 リガンド処理によって翻訳効率が低下する mRNA は、翻訳効率が向上する mRNA と比較して G4 形成配列密度が有意に高いことが示された。そこでさらに、当該タンパク質群のうち、実際に G4 形成配列を有するタンパク質群を選抜してこれらの細胞内存在量をウェスタンブロット法で検証した。その結果、G4 リガンド処理によって減少するものが多いことが確認された。

(2) G4 安定化ががん細胞の生存・増殖システムを破綻に導く分子機構

上記の解析で同定された、G4 リガンド処理で減少したタンパク質群の GO 解析を行ったところ、タンパク質翻訳やリボソーム生合成などと関連する複数の GO タームが上位に描出された。このことから、G4 リガンドは翻訳関連因子そのもののタンパク質翻訳を抑制することで、最終的にタンパク質の生合成全体を抑制する可能性が示唆された。これと一致して、G4 リガンドを処理したがん細胞株の SUnSET アッセイを行ったところ、タンパク質生合成の抑制が時間依存的なかたちで観察された。陰性対照として、G4 リガンドと同様に細胞増殖抑制効果を示す細胞傷害性抗がん剤では、タンパク質生合成の抑制はほとんど認められなかった。興味深いことに、G4 リガンドのうち Phen-DC3 処理によるタンパク質生合成の抑制の程度は、G4 リガンド感受性であるにもかかわらず同剤を処理しても DNA 損傷応答が生じないがん細胞株で顕著である傾向が認められた。このことから、少なくとも Phen-DC3 高感受性のがん細胞株は、その薬効機序が複製ストレスおよび DNA 損傷によるものとタンパク質翻訳の抑制によるものに大別される可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ、Click-IT HPG イメージングによる検証実験を行ったところ、G4 リガンドが生細胞内で翻訳を抑制することを支持する所見が得られた。さらに、蛍光プローブを用いて G4 リガンドの細胞内局在を解析したところ、同リガンドは細胞質内の核近傍に多く分布することが明らかとなった。これらの解析結果から、G4 リガンドは DNA 損傷を誘導するのみなら

ず、RNA 分子内に形成される G4 を過度に安定化することでタンパク質合成を抑制し、制がん効果を発揮するものと考えられた。

一方、G4 リガンド処理によって減少した翻訳関連因子以外のタンパク質のうち、様々ながん種で過剰発現しており、がんの増殖や転移を促進することが報告されているヒストンアルギニンメチル基転移酵素 CARM1 に着目して以下の検討を行った。まず、CARM1 遺伝子のコード鎖に存在する G4 形成配列が実際に G4 を形成することを円二色性スペクトル分析により確認した。また、CARM1 遺伝子の試験管内翻訳は G4 リガンド Phen-DC3 により抑制されることを見出した。G4 リガンド高感受性ヒト膀胱がん細胞株に Phen-DC3 を処理すると、CARM1 タンパク質が減少した。このとき、CARM1 mRNA 量の低下は認められなかったため、G4 リガンドによって安定化した RNA G4 が立体障害となり、翻訳が抑制されたと推定した。重要なことに、小分子干渉 RNA による CARM1 のノックダウンは G4 リガンド高感受性がん細胞の増殖を抑制した。以上の結果から、CARM1 の翻訳抑制が G4 リガンドの制がん効果に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morino Shun, Mashima Tetsuo, Shirai Fumiyuki, Nagayama Satoshi, Katayama Ryohei, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 584
2. 論文標題 BET protein-dependent E2F pathway activity confers bell-shaped type resistance to tankyrase inhibitors in APC-mutated colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 216632 ~ 216632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2024.216632	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 -

1. 著者名 Moyret Lalle Caroline, Prodhomme Melanie K., Bulet Delphine, Kashiwagi Ayaka, Petrilli Virginie, Puisieux Alain, Seimiya Hiroyuki, Tissier Agnes	4. 巻 113
2. 論文標題 Role of EMT in the DNA damage response, double strand break repair pathway choice and its implications in cancer treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2214 ~ 2223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15389	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 8件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Seimiya, H.
2. 発表標題 Crossroads of telomere biology and anticancer drug discovery
3. 学会等名 2023 NSFC-CAS-JSPS Forum, Translational Medicine and Innovative Drug Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seimiya, H.
2. 発表標題 Development of tankyrase inhibitors and G-quadruplex-stabilizers as innovative cancer medicines
3. 学会等名 International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部幸子, 茂木優奈, 中西忠也, 馬悦, 新家一男, 長澤和夫, 清宮啓之
2. 発表標題 グアニン四重鎖リガンドによるタンパク質生成の阻害
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部幸子, 茂木優奈, 中西忠也, 新家一男, 長澤和夫, 清宮啓之
2. 発表標題 制がん性グアニン四重鎖リガンドによるタンパク質生成の阻害
3. 学会等名 2022年度新学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム「成果発表会」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部幸子, 新家一男, 長澤和夫, 清宮啓之
2. 発表標題 制がん性グアニン四重鎖リガンドによるタンパク質生成の阻害
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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			
フランス	Universite Claude Bernard Lyon 1	Universite de Lyon	PSL Research University	