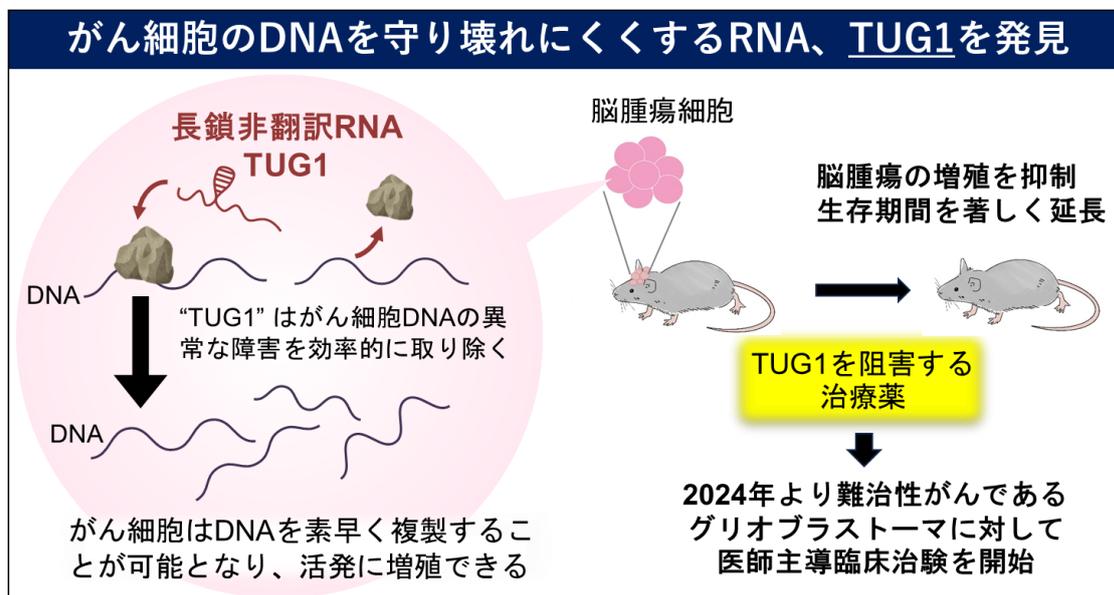


長鎖非翻訳 RNA が がん細胞の DNA を損傷から保護するしくみを解明 — グリオブラストーマに対する臨床治験の実施へ！



【要旨】

名古屋大学大学院医学系研究科・腫瘍生物学分野の近藤豊(こんどうゆたか)教授、鈴木美穂(すずきみほ)助教(筆頭著者)、飯島健太(いひまけんた)助教(研究当時、現 浜松医科大学)(筆頭著者)らの研究グループは、名古屋大学大学院医学系研究科・分子腫瘍学分野の鈴木洋(すずきひろし)教授らとの共同研究により、タンパク質に翻訳されない RNA(長鎖非翻訳 RNA^{*1})のうち TUG1^{*2} が、がん細胞の DNA を損傷から保護し増殖を助ける分子機構を解明しました。

がん細胞は活発に分裂し増殖するため、非常に速く DNA をコピーする必要があります。しかしがん細胞は正常な細胞と比べて DNA の変異や異常などの障害が多く、DNA のコピー(複製)がうまくできずに止まってしまうことがしばしばあります。これまで、がん細胞がどのように DNA の異常を解消し、すばやくコピーを続けていくのかは不明でした。

本研究グループは、がん細胞で高い発現を示し、かつ、がんの発生・悪性化に関与していることが知られている長鎖非翻訳 RNA に着目しました。そして、DNA の複製に問題が生じたときに、細胞内で速やかにつくられる長鎖非翻訳 RNA、TUG1 (Taurine Upregulated Gene 1)を発見しました。TUG1 は DNA の複製を止めてしまうような DNA の異常な構造をがん細胞で解消する働きをもつことがわかりました。そこで、TUG1 が高発現する難治性のがんであるグリオブラストーマ^{*3}(脳腫瘍)で TUG1 を阻害すると、DNA 複製が止まり、細胞死が誘導されました。脳腫瘍マ

ウスモデルを用いて TUG1 を阻害する核酸医薬(TUG1-DDS)とグリオブラストーマの標準治療薬テモゾロミドの併用治療を行った結果、腫瘍の増殖が著しく抑制され、生存期間が劇的に改善しました。

TUG1-DDS はすでに非臨床試験を終え、グリオブラストーマに対する有効性を検討するため、2024年3月ごろを目途に、名古屋大学医学部附属病院、京都大学医学部附属病院、国立がん研究センター中央病院にて医師主導臨床試験が開始されます。本研究は英国科学誌「Nature Communications」(2023年8月22日付(英国夏時間)オンライン版に掲載されました。

【ポイント】

- ・がん細胞に特徴的な高い複製ストレス^{*4} は、DNA 損傷とその修復過程における遺伝的エラーの可能性を高め、発がんの促進やがんの進展を加速させることがよく知られています。
- ・しかし、がん細胞が高い複製ストレスに晒されながらも、複製を完了させ細胞増殖していく機構は完全に解明されていません。
- ・タンパク質の生成に関わらない長鎖非翻訳 RNA は、近年がんの発生・悪性化や薬剤耐性との関連が報告されています。
- ・私たちは長鎖非翻訳 RNA のひとつ TUG1 が複製ストレスの原因となる R-loop^{*5} を解消する機能を持つことを発見しました。
- ・TUG1 は、複製ストレスに応答してすみやかに発現上昇します。そして R-loop に結合する RPA タンパク質と、R-loop を解消する RNA ヘリケースタンパク質 DHX9 と直接結合し、マイクロサテライト配列^{*6} を含む R-loop を解消することを明らかにしました。
- ・TUG1 を抑制すると R-loop が蓄積し、DNA が激しく損傷するためアポトーシス^{*7} による細胞死が誘導されました。
- ・TUG1 が高発現しているグリオブラストーマ細胞を用いた脳腫瘍モデルマウスで、TUG1 を抑制する核酸医薬(TUG1-DDS)とグリオブラストーマの標準治療薬テモゾロミドの併用治療を行った結果、顕著な抗腫瘍効果が得られました。
- ・TUG1-DDS は難治性のがんであるグリオブラストーマにおいて有効な治療薬となる可能性があります。

1. 背景

がん細胞に特徴的な高い複製ストレスは、DNA 損傷とその修復過程における遺伝的エラーの可能性を高め、発がんの促進やがんの進展を加速させることがよく知られていました。しかし、がん細胞が高い複製ストレスに晒されながらも、複製を完了させ細胞増殖していく機構は完全に解明されていません。タンパク質の生成に関わらない長鎖非翻訳 RNA は近年がんの発生・悪性化や薬剤耐性との関連が報告されていますが、そのほとんどの機能が未知のままです。そこで本研究では、がん細胞の複製ストレスを解消し、がんの増殖を助ける機能を持つ長鎖非翻訳 RNA を同定し、その作用機序を明らかにすることを目的としました。

2. 研究成果

がん細胞の培地に、複製ストレスを引き起こす薬剤(ヒドロキシウレアとカンプトテシン)を加えると、2 時間以内に長鎖非翻訳 RNA である TUG1 の発現が顕著に上昇することがわかりました(図 1)。また、この TUG1 の上昇は、がん細胞が複製ストレスにตอบสนองして活性化する ATR/Chk1 パスウェイの下流で起こることを明らかにしました。

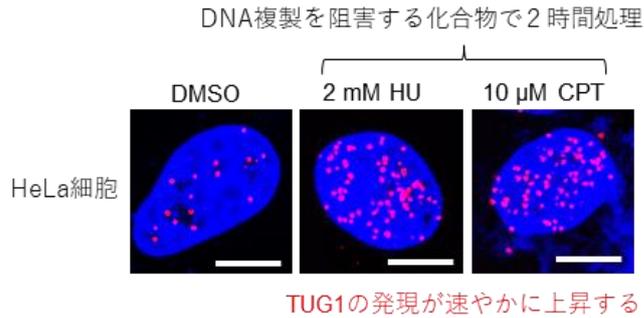


図1 複製ストレスによって発現上昇する長鎖非翻訳RNAの発見

複製ストレスにตอบสนองして新しく発現した TUG1 が核内のどこに移動するのかを調べると、R-loop という DNA 構造の近傍にあることがわかりました(図 2)。R-loop は転写中の RNA が DNA 二重らせんの片側の鎖に結合し、もう片方の一本鎖 DNA がループ状に飛び出した構造(図 2)で、RNA の転写機構と DNA 複製が衝突することで形成されます。R-loop 内の一本鎖 DNA は非常に切れやすく、DNA 損傷の原因となるため、TUG1

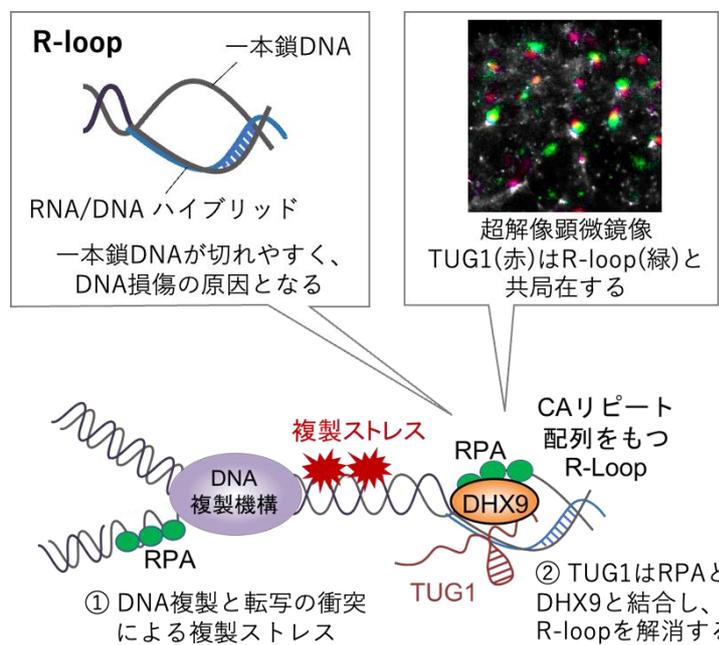


図2 複製ストレスによって発現上昇するTUG1はR-loopを解消する

は何らかの方法で R-loop を解消する役割を果たしていることが予想されました。そこで、TUG1 をノックダウンする(特異的な核酸薬剤をもちいて遺伝子の転写量を減少させ、その働きを抑える)と、R-loop が蓄積し、DNA が激しく損傷することを発見しました。

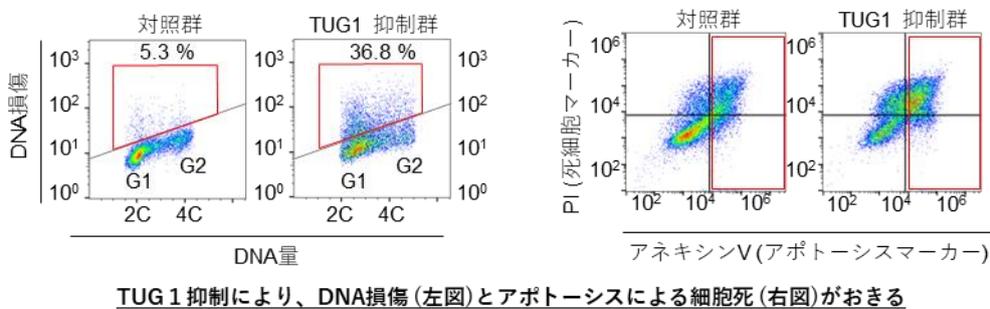
TUG1 がどのように R-loop を解消するのかを明らかにするために、TUG1 と結合し働くタンパク質を同定しました。R-loop に局在する TUG1 は、R-loop や停止した複製フォークに結合する RPA と、R-loop 構造を分解する RNA ヘリケースの一種 DHX9 と直接結合し R-loop を解消していることを明らかにしました(図 2)。

ゲノム DNA には様々な場所に R-loop が形成されやすい配列があることがわかっていますが、TUG1/RPA/DHX9 複合体は特に CA リピート(CA が複数回繰り返す配列)を含むマイクロサテライト領域の R-loop を好んで解消することが、ゲノムワイド解析により明らかになりました。マクロサテライト領域は DNA 損傷により塩基配列が容易に変異

することが知られています。TUG1 のノックダウンによりマイクロサテライト領域に DNA 損傷を与えれば、がん細胞に人為的に変異を誘導することができます。このようなマイクロサテライト領域の変異は、ネオアンチゲンと呼ばれる免疫療法の標的をがん細胞に新たに発現させることが報告されており、TUG1 を標的とした治療が免疫療法の効果を高める可能性が示唆されました。

TUG1 をノックダウンした細胞では、DNA が激しく損傷し、アポトーシスによる細胞死が誘導されます(図 3-a)。本研究グループは TUG1 が脳腫瘍の一種グリオブラストーマで高い発現を示すことに注目し、TUG1 の作用を抑制する核酸医薬によるグリオブラストーマへの抗腫瘍効果を、脳腫瘍モデルマウスを用いて検証しました。ナノ医療イノベーションセンター、東京大学との共同研究で作製した、薬剤をがん細胞のみに到達させるための“運び屋”を、TUG1 を抑制する核酸医薬と組み合わせた治療薬(TUG1-DDS)を用いることにより、TUG1 を抑制する核酸医薬を脳腫瘍細胞のみに送達しました。

a. TUG1抑制は細胞死を誘導する



b. 脳腫瘍モデルマウスを用いた治療実験

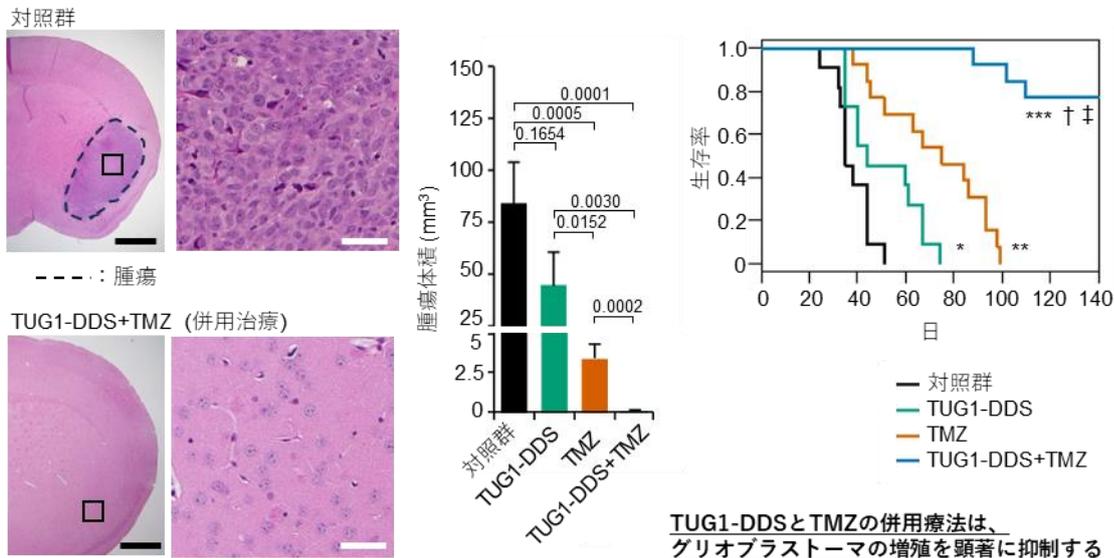


図3 TUG1-DDSは難治性のがんである脳腫瘍において有効な治療薬となる可能性がある

ヒトグリオブラストーマ細胞を移植したマウスに TUG1-DDS と脳腫瘍の標準治療薬テモゾロミド(TMZ)を投与し、治療効果を確認した結果、TUG1-DDS と TMZ を単独で投与したマウス(図 3-b 内 腫瘍体積グラフ、緑線と赤線)と比較して、TUG1-DDS と

TMZ を同時に投与すると、顕著に腫瘍増殖が抑制されました(図 3-b 内 腫瘍体積グラフ、青線)。そしてその結果、生存期間が著しく改善しました(図 3-b 内 生存率グラフ)。TUG1-DDS と TMZ を同時に投与した腫瘍では、TMZ によって増加した R-loop が解消されずに蓄積していました。本研究から TUG1 はがん細胞において R-loop を解消することにより、がんの DNA を損傷から保護し、細胞増殖を助けていることを世界で初めて明らかにしました。TUG1-DDS は難治性のがんである脳腫瘍において有効な治療薬となる可能性を見出すことができました。

3. 今後の展開

グリオブラストーマに対する TUG1-DDS の有効性を検討するための医師主導治験が 2024 年 4 月を目途に開始されます。TUG1-DDS は脳腫瘍で初めての長鎖非翻訳 RNA を標的とする核酸医薬であり、新規治療薬としての効果が期待されます。

◎本研究は、日本医療研究開発機構の次世代がん医療創生研究事業：研究課題名「DDS 技術を基盤とした革新的がん治療法の開発」、革新的がん医療実用化研究事業：研究課題名「新規核酸治療薬を用いた膠芽腫に対する臨床試験に関する研究」の助成を受けて行われました。

4. 用語説明

※1 長鎖非翻訳 RNA

細胞を構成するタンパク質は、RNA を翻訳することで作り出されます。しかし RNA の中にはタンパク質に翻訳されない“非翻訳 RNA”が存在し、こうした非翻訳 RNA は様々な機能を持つ可能性が明らかになっています。非翻訳 RNA の中で全長が 200 塩基以上のものを長鎖非翻訳 RNA といいます。

※2 TUG1(Taurine Upregulated Gene 1)

長鎖非翻訳 RNA のひとつ。脳腫瘍をはじめ多くのがんで発現が上昇しており、がんの発生・悪性化や抗がん剤の耐性に関与していることがわかっています。

※3 グリオブラストーマ

脳のグリア細胞から発生する悪性脳腫瘍の一種。原発性脳腫瘍の中で最も悪性度が高く、急速な増殖、浸潤性、治療抵抗性を特徴とします。

※4 複製ストレス

複製ストレスとは、細胞が DNA のコピーを作ろうとする際に、途中で障害に直面することで DNA 複製が止まってしまうことです。複製ストレスは DNA のコピーミスにつながり、遺伝的エラーの可能性を高め、がんなどの疾患を引き起こす可能性があります。しかし細胞には、DNA を無傷に保ち、深刻な問題を防ぐために、複製ストレスを感知し解消する方法があります。

※5 R-loop

R-loop とは、一本鎖 RNA 分子が DNA 二重らせんの片方の鎖に結合し、もう片方の DNA 鎖がループ状に飛び出した構造のことです。R-loop には、遺伝子制御など正常な

細胞にとって有益な機能を果たすものもありますが、がん細胞の高い複製ストレスにより形成され DNA 損傷を引き起こす場合もあります。

※6 マイクロサテライト配列

”CACACA ”のような 2~6 塩基の繰り返し配列からなる反復 DNA 配列。

※7 アポトーシス

傷ついた細胞や古くなった細胞、不要な細胞を除去するために、細胞が自己破壊するしくみ。

【論文情報】

雑誌名:Nature Communications

論文タイトル:TUG1-mediated R-loop resolution at microsatellite loci as a prerequisite for cancer cell proliferation

著者名・所属名:

Miho M. Suzuki^{1, †}, Kenta Iijima^{1,2, †}, Koichi Ogami³, Keiko Shinjo¹, Yoshiteru Murofushi¹, Jingqi Xie¹, Xuebing Wang¹, Yotaro Kitano⁴, Akira Mamiya¹, Yuji Kibe^{1,4}, Tatsunori Nishimura¹, Fumiharu Ohka⁴, Ryuta Saito⁴, Shinya Sato⁵, Junya Kobayashi⁶, Ryoji Yao⁷, Kanjiro Miyata⁸, Kazunori Kataoka^{9,10}, Hiroshi I. Suzuki^{3,11,12}, and Yutaka Kondo^{1,11,12,*}

¹Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi, 466-8550, Japan

²Laboratory Animal Facilities and Services, Preeminent Medical Photonics Education and Research Center, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka, 431-3192, Japan

³Division of Molecular Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi, 466-8550, Japan

⁴Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi, 466-8550, Japan

⁵Molecular Pathology and Genetics Division, Kanagawa Cancer Center Research Institute, 2-3-2 Nakao, Asahi-ku, Yokohama, Kanagawa, 241-8515, Japan.

⁶School of Health Sciences at Narita, International University of Health and Welfare, 4-3, Kozunomori, Narita, Chiba, 286-8686, Japan

⁷Department of Cell Biology, Japanese Foundation for Cancer

Research, 3-8-31 Ariake, Koto-ku, Tokyo, 135-8550, Japan

⁸Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656, Japan.

⁹Innovation Center of NanoMedicine, Kawasaki Institute of Industrial Promotion, 3-25-14 Tono-machi, Kawasaki-ku, Kanagawa, 210-0821, Japan.

¹⁰Institute for Future Initiative, Bunkyo-ku, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan.

¹¹Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Tokai National Higher Education and Research System Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi, 464-8601, Japan.

¹²Center for One Medicine Innovative Translational Research (COMIT), Nagoya University, Nagoya, Japan

†共同第一著者

*責任著者

DOI: [10.1038/s41467-023-40243-8](https://doi.org/10.1038/s41467-023-40243-8)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nat_230822en.pdf

【本研究に関する治験についてのお問い合わせ先】

東海国立大学機構 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科学

講師 大岡史治（おおおか ふみはる）

電話:052-744-2353 FAX 052-744-2360