

奨励金No.1506

がん細胞で活性化しやすい DNA 修復経路を標的とした 癌治療法の開発

香崎 正宙

産業医科大学 産業生態科学研究所 講師

Development of cancer therapies targeting DNA repair pathways that are activated in cancer cells

Masaoki Kohzaki,

Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational
and Environmental Health, Japan, Lecturer



本研究では、BRCA 欠損がん細胞等で亢進されるエラーが大きい DNA 修復経路の一本アニーリング（SSA）経路因子 RAD52 を標的とした新規治療薬の開発を目指して、*in vitro* 及び *in vivo* 実験を進めた。既知の RAD52 阻害剤に加え、我々が同定した RAD52 阻害剤は nM レベルの極低濃度でも、RAD52 亢進がん細胞の増殖や薬剤耐性獲得を長期にわたって抑制することが可能であることから、副作用がない状態で、がん細胞だけを徐々に排除できる新しいコンセプトの治療法の可能性を見出した。

This study aimed to develop a new therapeutic drug that targets RAD52, a single-strand annealing (SSA) pathway factor in the error-prone DNA repair pathway that is enhanced in some cancer cells including BRCA-deficient cancer cells. In addition to known RAD52 inhibitors, the RAD52 inhibitor we identified can suppress the proliferation and drug resistance acquisition of RAD52-enhanced cancer cells over a long period of time even at extremely low concentrations at the nM level, suggesting the possibility of a new concept of cancer treatment that can gradually eliminate only cancer cells without side effects.

1. 研究内容

1.1 背景

診断技術や治療法の進歩のおかげで、働きながらがんを治療することが可能になってきている。しかし、がん治療の副作用による QOL の低下、がん細胞の薬剤耐性獲得や、超高齢化にともなう医療費急増による社会保険制度の逼迫など、根本的に解決すべき課題は多く、費用対効果が高く、かつ副作用がない新しいコンセプトの抗がん剤の開発は喫緊の課題である。こうした背景のもとで、希少がんの網膜芽細胞腫 Rb 遺伝子の研究から大きなブレイクスルーがあったことを参考に（Weinberg, Cell, 1995）、希少がんの骨肉腫を好発する希少疾

患ロスムンド・トムソン症候群（RTS）の関連遺伝子 RECQL4 の特徴を掘り下げることで、がん細胞の未知の弱点を探ることにした。独自に樹立した RECQL4 欠損細胞を使った解析から、がん治療でよく使われる放射線やシスプラチンに高感受性を示す点や、エラーが大きい一本鎖アニーリング（single-strand annealing: SSA）修復経路因子の RAD52 が特異的に活性化する特性を発見している。加えて、RECQL4 欠損がん細胞は、SSA 修復経路を阻害しても、相同組換え（HR; homologous recombination）や代替末端結合（Alt-EJ; alternative end-joining）といった他の DNA 修復経路が相補的に活性化しないことを確認しているため、RAD52

阻害剤の特異的な抗腫瘍効果を独自に検証できる実験系を樹立している。

すでに臨床で使われている PARP 阻害剤をはじめ、DNA 修復経路を標的とした抗がん剤の開発が近年着目されており（Nat Rev Cancer, 2023, 23, 78）、実際に Alt-EJ 因子の PolQ に対する阻害剤の臨床試験が複数進んでいる。一方で、RAD52 阻害剤はこれまでに複数報告されているが、臨床試験まで進んでいる薬剤はない。理由としては、細胞レベルから動物レベルまでの研究を通して、RAD52 阻害剤を使うタイミングや濃度、対象となるがん細胞の種類などが全体的に把握できていないことが考えられる。PolQ ノックアウトマウスや RAD52 ノックアウトマウスはほぼ表現型がないことから、正常細胞の生存に必須ではなく、がん細胞が特殊な条件下で利用する因子であることが分かっているので、正常細胞に対する副作用がほとんど無い抗がん剤の開発が期待できる。そこで本研究では、正常細胞に影響のない極低用量の新規 RAD52 阻害剤を使って、がん細胞の弱点を標的として徐々に蝕んでいく全く新しいコンセプトで、細胞レベルからマウス個体レベルまでを通して研究を進めることで、長期的に副作用がない新しいコンセプトのがん治療法の確立を目指した。

1.2 方法

SSA 因子 RAD52 が亢進している RECQL4 欠損がん細胞や、シスプラチンや PARP 阻害剤に対して薬剤耐性を獲得しやすい BRCA 欠損細胞を使って、細胞レベルで長期にわたる低濃度の RAD52 阻害剤による抗腫瘍効果や薬剤耐性能に対する阻害効果を検証した。RAD52 阻害剤は、既存の RAD52 阻害剤である EGC や D-I03 と並行して、我々が同定した Suramin を使い、RAD52 阻害という共通点以外は全く異なる化合物構造式をもつ RAD52 阻害剤を使って比較解析することで、RAD52 標的阻害による抗腫瘍効果を検証した。

次に RAD52 阻害剤の臨床応用を目指して、細

胞レベルでの結果をマウス実験に反映するために、BALB/c-nu マウスにヒト RECQL4 欠損がん細胞を移植して RAD52 阻害剤を経口投与することで、RAD52 が亢進しているがん細胞特異的に RAD52 阻害剤が抗腫瘍効果を示すかどうか検証した。さらに、免疫系が正常である C57BL/6 マウスに同系の腫瘍細胞を移植して RAD52 阻害剤を投与することで、免疫系を介した RAD52 阻害剤の抗腫瘍効果を解析した。

1.3 結果及び考察

細胞レベルの解析から、RAD52 阻害剤は非常に低い濃度領域（pM-nM）でも、RECQL4 欠損がん細胞や BRCA 欠損がん細胞などの RAD52 亢進がん細胞に対して、既知及び新規 RAD52 阻害剤の処理によって、70-90% 程度の抗腫瘍効果を長期的に示すことが明らかになった。しかし、一般的な抗がん剤の評価基準である IC₅₀（50% 阻害濃度）をもとに評価した場合は、他の抗がん剤と同様に μ M の濃度領域となってしまう点が、RAD52 阻害剤の効能評価と実用化を難しくしていると予想された。これらの結果から、RAD52 を標的とした新しいコンセプトの抗がん剤を利用する際には、IC₂₀（20% 阻害濃度）や IC₁₀（10% 阻害濃度）にもとづいて、どれだけ長期的に抗腫瘍作用が持続するか、つまり、チリも積もれば山となるイメージの抗腫瘍効果を検証する新しい視点も必要になると考えられる。

このコンセプトを実証するために、シスプラチン耐性を獲得しやすい BRCA1 欠損 UWB1.289 細胞に対して、極低容量（1 nM）RAD52 阻害剤を併用すると興味深いことに、シスプラチンの耐性獲得能を数ヶ月間に渡って阻害することを見出した。

ヌードマウスの実験では、個体差を考慮してマウスの右側に野生型ヒト乳がん MCF7 細胞、左側に RECQL4 欠損 MCF7 細胞を移植した上で、RAD52 阻害剤のスラミンを長期的に経口投与する実験を

実施した。スラミンは、未治療であればほぼ100%死に至り、年間5～50万人が死亡していると推定されるアフリカ睡眠病の1つの東アフリカ睡眠病の第一期の治療薬として知られる。これまでに抗がん剤として利用する試みも1990年代に実施されたが、高濃度スラミンの静脈投与は副作用が大きく、抗がん剤としてFDAから認可されていない。一方、細胞レベルの実験結果から、非常に低い濃度でもRAD52 亢進がん細胞の増殖を抑制することが分かっているので、あえてスラミンが吸収されにくい侵襲性のない経口投与によって抗腫瘍効果を検証したところ、RAD52 が亢進するRECQL4 欠損MCF7 細胞特異的に抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。さらに、長期的に腫瘍が退縮し、寛解するマウスも確認されたことから、長期的に徐々にがん細胞を弱体化させる新しい治療コンセプトを裏付ける実験結果が示された。

さらに興味深いことに、免疫系が正常なC57BL/6マウスに同系由来の大腸がんMC38細胞を移植してから、RAD52 阻害剤を経口投与したところ、抗腫瘍効果のポジティブコントロールとして腹腔内投与したウイルスRNA 模倣アナログの10 mg/kg のpoly I:C と比べて抗腫瘍効果はやや弱いものの、顕著な抗腫瘍効果を示すことが分かった。10 mg/kg のpoly I:C を腹腔内投与すると、10%程度のマウスが免疫関連有害事象 (immune-related Adverse Events; irAE) によって死亡することを考えると、極低用量 RAD52 阻害剤の経口投与による体重減少等の副作用は見られず、長期にわたって顕著な抗腫瘍効果を示す結果は、安全性や有効性が高いがん治療法として重要な点である。

以上の結果から、副作用がなく長期にわたってがん細胞が好むDNA 修復経路を徐々に阻害し得る新しいコンセプトの極低用量 RAD52 阻害剤の経口投与は、働きながらかん治療が当たり前の時代のニーズに応えることが可能な費用対効果が高い新しい治療方法として、将来的に有望ながん治療法の1つとして選択される日がくることが期待

される。

2. 発表 (研究成果の発表)

本研究成果は現在投稿準備中です。貴財団の研究へのご理解とご協力に深く感謝申し上げます。

1. [Kohzaki M](#), Suzuki K, Ootsuyama A, Okazaki R. Spontaneous p53 activation in middle-aged C57BL/6 mice mitigates the lifespan-extending adaptive response induced by low-dose ionizing radiation. *NPJ Aging*. 9(1):26. 2023.
2. Okazaki R, [Kohzaki M](#), Kai M, Jiang Y, Kubo T, Ootsuyama A, Sado T, Suzuki K, Tateishi S, Mori K. Relationship between haematological data and radiation doses of TEPCO workers before and after the FDNNP accident. *J Radiat Res*. 64(2):261-272. 2023.
3. [Kohzaki M](#). Comparison of the fertility of tumor suppressor gene-deficient C57BL/6 mouse strains reveals stable reproductive aging and novel pleiotropic gene. The 19th Ataxia Telangiectasia workshop 2023, 2023/03/03, Kyoto, Japan.
4. [Kohzaki M](#), Ootsuyama A, Abe T, Tsukamoto M, Umata T, Okazaki R. Long Bones Exhibit Adaptive Responses to Chronic Low-Dose-Rate Ionizing Radiation despite its Lifespan-Shortening and Carcinogenic Effects on C57BL/6 Mice. *JBMR Plus*. 6(12):e10688. 2022.
5. [Kohzaki M](#). Mammalian Resilience Revealed by a Comparison of Human Diseases and Mouse Models Associated with DNA Helicase Deficiencies. *Front Mol Biosci*. 9:934042. 2022.