

Press Release

2024年10月28日

東京科学大学

金沢大学

難治性がん TNBC に対する新規標的分子として RNA 結合タンパク質 ZCCHC24 を同定

– ZCCHC24 は転写後調節によって乳癌幹細胞性を制御している –

【ポイント】

- 乳癌幹細胞様集団に特異的に発現し乳癌幹細胞性を制御する RNA 結合タンパク質として ZCCHC24 を発見しました。
- ZCCHC24 は乳癌幹細胞性を特徴づける遺伝子群の mRNA の非翻訳領域に存在する"UGUWHWWA"という配列を認識し mRNA を安定化する新規制御メカニズムを揭示了しました。
- ZCCHC24 の標的の一つの転写因子 ZEB1 は ZCCHC24 の発現を転写調節しており、転写後調節と転写調節とのポジティブフィードバック機構を介して乳癌幹細胞性を獲得することを明らかにしました。
- ZCCHC24-ZEB1 フィードバックを標的にしたトリプルネガティブ乳癌(TNBC)の病態解明と新規治療戦略への応用が期待されます。

【概要】

東京科学大学* 大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野の浅原弘嗣教授、内田雄太郎博士研究員・臨床研修医らの研究グループは、金沢大学 がん進展制御研究所の後藤典子教授との共同研究で、難治性乳癌サブタイプの一つである**トリプルネガティブ乳癌 (TNBC、用語 1)**の癌幹細胞性が RNA 結合タンパク質 ZCCHC24 の転写後調節機構により制御されることを突き止めました。この研究は米国国立衛生研究所、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)の革新的先端研究開発支援事業(AMED-LEAP)、文部科学省科学研究費補助金、ならびに金沢大学がん進展制御研究所共同研究費の支援のもとで行われ、その研究成果は、国際科学誌 *EMBO Reports* に、2024年10月17日午前10時(ロンドン時間)にオンライン版で発表されました。

●背景

乳癌は日本で年間9万人以上が罹患する、女性において最も頻度が高い癌種です。中でもトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は乳癌全体の約20%を占め、他のサブタイプと異なり十分な治療法が確立されていないため、予後不良の疾患として知られています。TNBC においては CD44 陽性 CD24 陰性などの細胞膜上のマーカーで特徴づけられ、

*2024年10月1日に東京医科歯科大学と東京工業大学が統合し、東京科学大学 (Science Tokyo) となりました。

配信先：文部科学記者会、科学記者会、本町記者会、県文教記者クラブ

化学療法に対する治療抵抗性や乳癌の再発、腫瘍形成能に寄与する細胞集団は乳癌幹細胞と呼ばれ、転写制御や転写後制御等による遺伝子発現制御機構により、その幹細胞性が獲得されると考えられてきましたが、その詳細な分子機構はこれまで明らかではありませんでした。

転写後制御をつかさどる代表的なタンパク質として RNA 結合タンパク質が知られています。RNA 結合タンパク質は標的遺伝子の mRNA 上の **cis-element** (用語 2) と呼ばれる配列に直接結合することで、翻訳の亢進・減衰、および mRNA の安定化・分解を介して発現制御を行うことで、標的遺伝子の安定的な発現・細胞の恒常性維持に対して非常に重要な役割を果たします。これまで乳癌以外のいくつかの癌種では RNA 結合タンパク質による癌細胞の制御機構は知られていましたが、TNBC における RNA 結合タンパク質を介した癌幹細胞性の制御機構は全く不明でした。

●研究成果

本研究グループは TNBC 患者由来検体に対して**シングルセル RNA シークエンス解析** (用語 3) を行い、乳癌幹細胞を含む間葉系細胞集団に特異的に発現する遺伝子を探索し、RNA 結合タンパク質 ZCCHC24 を同定しました。これまで報告がほとんどされなかった ZCCHC24 分子の特性や遺伝子発現制御機構を解析するため、RNA シークエンスを用いた遺伝子発現解析、**BRIC シークエンス** (用語 4) による網羅的な mRNA の安定性解析、および **PAR-CLIP 法** (用語 5) を用いた ZCCHC24 の結合標的の網羅的解析を行いました。その結果として、ZCCHC24 が *ZEB1*, *NOTCH2*, *NRP1*, *CD44* といった乳癌幹細胞性獲得のために重要な遺伝子群の mRNA 非翻訳領域に特異的に存在する塩基配列“UGUWHWWA”という *cis-element* を認識して結合することで、これらの遺伝子の発現を上昇させて乳癌幹細胞性を獲得することが明らかになりました (図 1)。

さらに ZCCHC24 の発現を制御する上流転写因子の同定を TNBC 細胞に対する **Hi-C** (用語 6) や **ChIP シークエンス** (用語 7) によりデータ解析を行ったところ、ZCCHC24 の標的因子であり乳癌幹細胞性を制御することが報告されている転写因子 ZEB1 が ZCCHC24 の発現を転写活性化させることが明らかとなり、転写因子 ZEB1 と RNA 結合タンパク質 ZCCHC24 との間で転写調節と転写後調節によるポジティブフィードバックの形成が確認されました。

次に、ZCCHC24 の腫瘍形成における機能解析を進め、ZCCHC24 の発現を減少させた TNBC 患者由来検体においては *in vivo* レベルで腫瘍形成能が減弱することを確認した。さらに、形成された腫瘍に対するシングルセル RNA シークエンス解析を用い、ZCCHC24 の発現減少による乳癌幹細胞を含む間葉系細胞集団の大きく減少していることを明らかにしました (図 2)。

最後に TNBC 患者由来検体を皮下移植したマウスに ZCCHC24 に対する siRNA 製剤と TNBC に対する使用が有望視される化合物である BET 阻害剤 JQ1 とを併用投与す

ると腫瘍の成長が相加的に抑制されることを明らかにしました (図 3)。

これらの結果から、ZCCHC24 による mRNA の安定化を介した転写後調節制御と ZEB1 による転写調節制御が、互いにポジティブフィードバックを形成することで TNBC の癌幹細胞性が維持されることを明らかにしました。

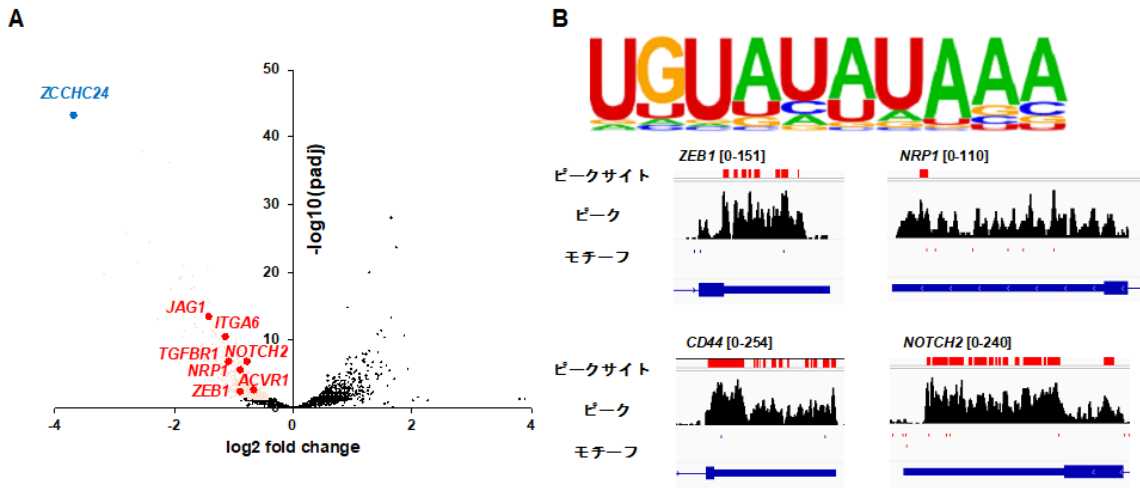


図 1 RNA 結合タンパク質としての ZCCHC24 の統合的解析

A : ZCCHC24 を siRNA によりノックダウンした MDAMB231 細胞株に対して RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析。B : MDAMB231 細胞株内の ZCCHC24 に対して PAR-CLIP を施行し同定された結合 RNA モチーフ配列 (上) および標的遺伝子における ZCCHC24 のピーク図 (下)。

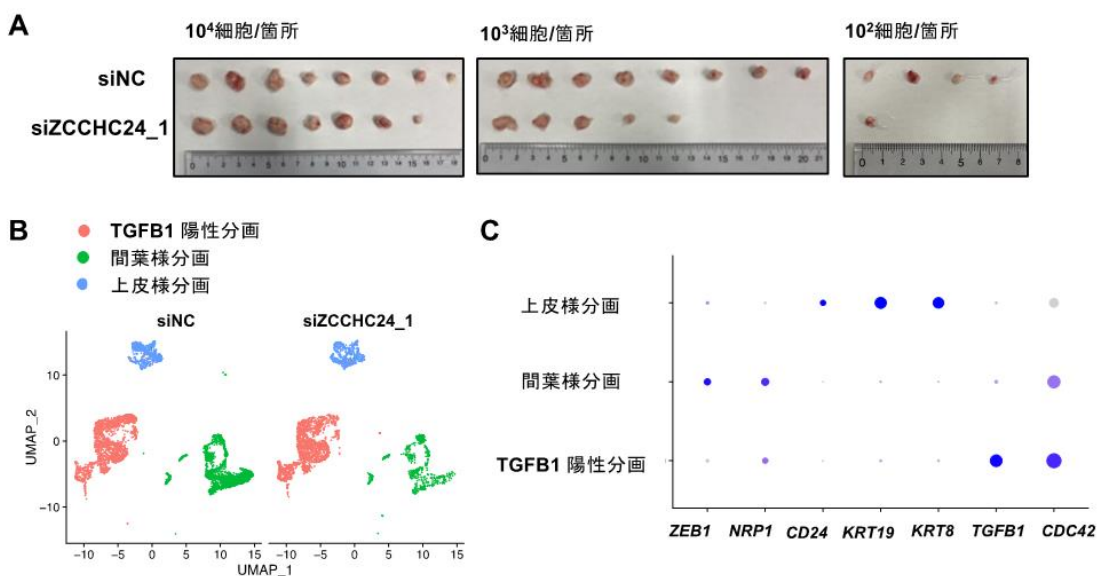


図 2 ZCCHC24 による腫瘍形成能制御の解析

A: ZCCHC24 をノックダウンした TNBC 患者由来検体細胞を NOG マウスに皮下移植し、限界希釈法により腫瘍形成能の変化を解析した。B: TNBC 患者由来検体細胞に対して ZCCHC24 およびネガティブコントロール (NC) をノックダウンした状態で 1000 個/箇所 NOG マウスに皮下移植し、形成された腫瘍に対してシングルセル RNA シークエンスを行った。図はシングルセル RNA シークエンスに対する Dimensional reduction plot (各種の細胞がどれだけいるのかを簡易的に表す手法)。C: シングルセル RNA シークエンスにおいて各分画にどのような遺伝子が特徴的に発現しているのかを示した Dot Plot。

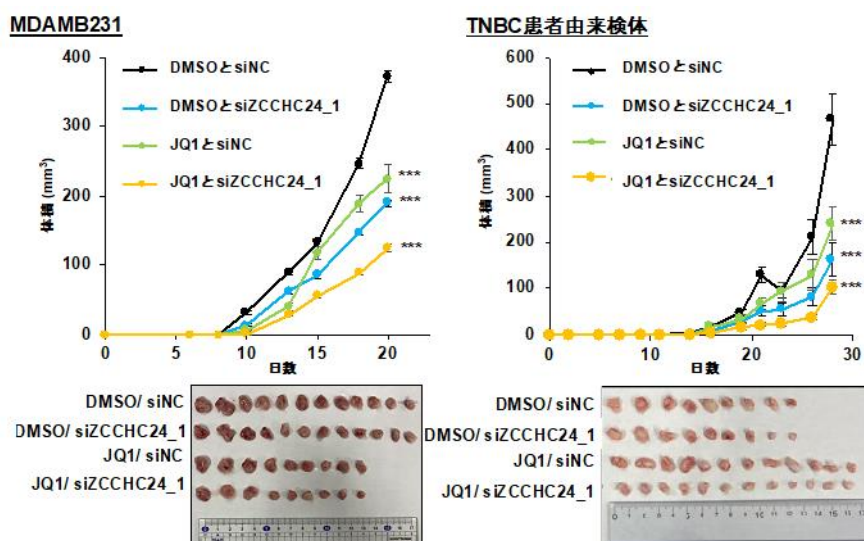


図 3 ZCCHC24 に対する siRNA と BET 阻害剤の併用による in vivo 治療実験

TNBC 細胞株 MDAMB231 および TNBC 患者由来検体に対して ZCCHC24 およびネガティブコントロール (NC) に対する siRNA を導入し、免疫不全マウスに皮下移植した。皮下移植されたマウスに対して BET 阻害剤およびコントロールとして DMSO を投与し、腫瘍体積を経時的に計測した。

●今後の展開

本研究グループは RNA 結合タンパク質 ZCCHC24 による乳癌幹細胞性に重要な遺伝子の非翻訳領域上の "UGUWHWWA" という *cis*-element を介した転写後調節機構と、転写因子 ZEB1 による転写調節がポジティブフィードバックを形成することで TNBC の腫瘍形成能や化学療法に対する治療抵抗性を獲得するという新規分子メカニズムを明らかにしました (図 4)。本研究成果は、乳癌幹細胞制御における RNA 階層を介したメカニズムの重要性を明らかにするとともに、難治性がんである TNBC に対する新規治療標的として ZCCHC24 が有望な分子であることを示し、今後の乳癌治療への寄与が期待されます。

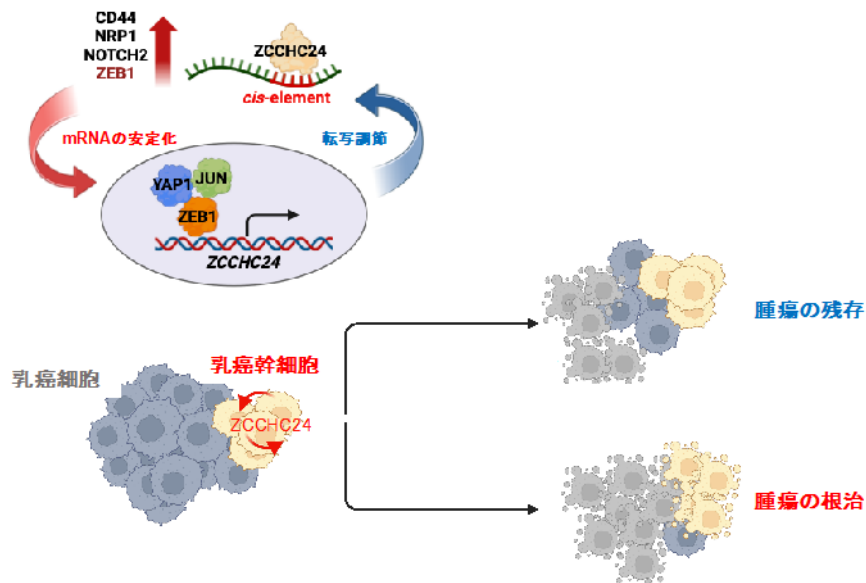


図4 本研究にて解明されたメカニズムの図

【用語説明】

- (1) **トリプルネガティブ乳癌(TNBC)**：ホルモン療法の標的となるエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および抗 HER2 抗体療法の標的となる HER2 受容体が陰性の乳癌のこと。治療標的となる受容体がないため、治療抵抗性が高いことで知られる。
- (2) **cis-element**：因子が直接結合することで標的遺伝子発現を調節することができる部位の総称。ここでは RNA 結合タンパク質が直接結合する塩基配列のことで標的 mRNA への機能調節を行う部位のことを指す。
- (3) **シングルセル RNA シークエンス**：細胞を性状ごとに分類したり、細胞集団に特異的に発現する遺伝子を同定したりすることを目的として1細胞ごとに網羅的な遺伝子発現解析を行う研究手法。
- (4) **BRIC シークエンス**：ブロモウリジンを細胞に取り込ませたのちにブロモウリジンに対する抗体により、免疫沈降を行うことによって濃縮された RNA を計測することにより細胞内における mRNA の分解速度を計測する手法。
- (5) **PAR-CLIP 法**：細胞にチオウリジンを取り込ませた状態で紫外線によりタンパク質と mRNA をクロスリンクさせたのちに RNA 結合タンパク質に対して免疫沈降を行うことによって高精度に RNA 結合タンパク質の結合標的を網羅的に同定する手法。RNA 結合タンパク質の結合モチーフの解析等に適している。
- (6) **Hi-C**：DNA が細胞内でどのように三次元的に折り畳まれているのかを網羅的に同定する手法。近接している DNA 上の領域が明らかとなることによって、

遺伝子のエンハンサー候補領域の同定などが可能となる。

- (7) **ChIP シークエンス**：転写因子と DNA とをホルムアルデヒドによりクロスリンクしたのちに転写因子に対して免疫沈降を行うことによって転写因子が結合している DNA 領域を網羅的に同定する手法。

【論文情報】

掲載誌：*EMBO Reports*

論文タイトル：RNA binding protein ZCCHC24 promotes tumorigenicity in triple-negative breast cancer

著者：Yutaro Uchida, Ryota Kurimoto, Tomoki Chiba, Takahide Matsushima, Goshi Oda, Ichiroh Onishi, Yasuto Takeuchi, Noriko Gotoh, Hiroshi Asahara

DOI：[10.1038/s44319-024-00282-8](https://doi.org/10.1038/s44319-024-00282-8)

【研究者プロフィール】

内田 雄太郎（ウチダ ユウタロウ） Yutaro UCHIDA

東京科学大学 大学院医歯学総合研究科

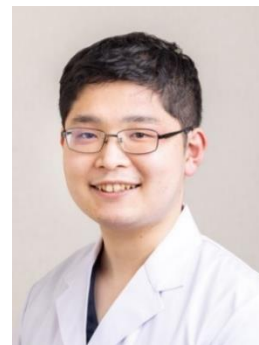
システム発生・再生医学分野

博士研究員・臨床研修医（東京科学大学病院）

MDFPhD コース卒業生

研究分野：

RNA 生物学、核酸医薬学、癌分子生物学



浅原 弘嗣（アサハラ ヒロシ） Hiroshi ASAHARA

東京科学大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 教授

研究分野：

分子生物学（遺伝子発現）、

発生・再生医学、整形外科学、リウマチ学



後藤 典子（ゴトウ ノリコ） Noriko GOTOH

金沢大学 がん進展制御研究所

分子病態研究分野 教授

研究分野：

分子腫瘍学、幹細胞生物学



【お問い合わせ先】

(研究に関すること)

東京科学大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野教授 浅原 弘嗣 (アサハラ ヒロシ)

Email: asahara.syst@tmd.ac.jp

TEL: 03-5803-5015

FAX: 03-5803-5810

(報道取材申し込み先)

東京科学大学 総務企画部 広報課

申し込みフォーム: <https://forms.office.com/r/F3shqsN7zY>



Email: media@ml.tmd.ac.jp

TEL: 03-5734-2975 FAX: 03-5734-3661

金沢大学薬学・がん研支援課企画総務係

Email: y-somu@adm.kanazawa-u.ac.jp

TEL: 076-234-6979 FAX: 076-234-6844