

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14376

研究課題名（和文）ゲノム安定性維持機構による不均等細胞分裂の制御

研究課題名（英文）Regulation of asymmetric cell division by the machinery maintaining genome stability

研究代表者

宮川 清（MIYAGAWA, KIYOSHI）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：40200133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん治療抵抗性の特徴を有するがん幹細胞の特性を規定する分子機序を解明するために、DNA二本鎖切断に応答する経路と不均等細胞分裂に関わる経路とを共通に制御する機構の発見を試みた。その結果、相同組換えによるDNA修復とp53の分解に関係して細胞周期チェックポイントを制御するRad54Bが、神経芽腫細胞株において、不均等細胞分裂を促進することが明らかとなった。また、この機能に関する経路の候補として、Rad54BがNumbを負に制御することによってNotchを活性化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular mechanism underlying the nature of cancer stem cells characterized by tolerance to cancer treatment, we tried to identify the machinery regulating both the DNA double-strand break response and asymmetric cell division. We found that Rad54B, which repairs double-strand breaks by homologous recombination and regulates cell-cycle checkpoint by degrading p53, promotes asymmetric cell division in the neuroblastoma-derived cell line. Furthermore, we found that Rad54B activates the Notch-signaling pathway by inhibiting Numb, which may be involved in asymmetric cell division.

研究分野：医学

キーワード：細胞周期 不均等細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

発がんの機序を理解し、その情報を治療に応用するために、がん幹細胞の研究は中心的な役割を果たす時代が到来している。その中でも幹細胞の系列を反映する分子の動態を追跡する試みは、幹細胞の起源と役割を理解する上で、極めて有望な方法と考えられている。一方で、がん幹細胞を特徴づける性質については、個々の性質の機構の解明は進んできてはいるが、これらを統合的に解釈する試みは極めて少ない。その理由としては、これらの特徴を一元的に制御するマスター分子の存在が不明瞭であるのと、既知のがん幹細胞の特徴とは別の性質が本質的である可能性などが想定される。

このような国内外の研究動向において、本研究者は放射線と化学療法剤に対する治療抵抗性の機序について長年研究に携わってきた立場から、がん幹細胞の特徴に注目するようになった。放射線や化学療法剤の治療効果はDNA損傷が適切に処理されないことによって細胞死が誘導されることに大きく依存するために、DNA損傷に対する修復機構、とりわけ最も重篤な損傷であるDNA二本鎖切断に対する修復機構が、がん幹細胞においては機能が亢進していることが想定される。一方、このようなDNA修復が行われる際には、修復に適している細胞周期で停止しないしは緩徐な進行をすることによって、修復が完了する時間を確保する必要がある。DNA修復が、より効率よく行われるためには、細胞周期進行に対する強力な制御機構と密接に関係することが必要である。このような考え方に基くと、DNA二本鎖修復機構を構成する経路の中でも、がん幹細胞と分化細胞では、使用されやすい経路に差異が生じている可能性があり、特にがん幹細胞においては、DNA損傷の存在下において細胞周期の進行を精緻に抑制するチェックポイントと密接に関係したDNA修復機構が存在することが想定される。その候補として、細胞周期チェックポイントの制御機構を有することが明らかにされたRad54Bに着目し¹⁾、そのがん幹細胞の形質への関与を検討する着想に至った。

2. 研究の目的

発がん過程の理解および治療法の開発にとって、がん幹細胞と呼ばれる細胞の形質とその制御機構の解明は必要不可欠であるが、その中でも幹細胞の自己複製と分化に重要な不均等細胞分裂とがん治療抵抗性の現象は、機序がほとんど理解されていない。本研究者は、DNA修復分子Rad54Bがこの両方の現象に関与する可能性を見いだしたために、細胞生存に必須であるDNA二本鎖切断に対する修復機構が、多様な細胞内情報伝達ネットワークを形成して、本来の機能であるDNA損傷性治療に対する抵抗性を促進することに加

え、幹細胞の重要な特徴である不均等細胞分裂をも制御する仮説の着想に至った。本研究は、このようながん幹細胞の重要な特徴を一元的に説明する新たなネットワークを同定し、治療開発の基本原理を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 不均等細胞分裂頻度の測定

神経芽腫由来の細胞株の中で、がん遺伝子であるMYCNが過剰発現していない細胞株では、細胞極性タンパク質であるNuMAが、細胞分裂の際に、2つに生成される細胞の1細胞のみに分布する頻度が高いことが知られている²⁾。このNuMAの細胞分裂時における娘細胞への不均等分配を、不均等細胞分裂を反映する測定系として用いる。

具体的には、神経芽腫細胞株NB69において、siRNAによってRad54Bの発現を低下させた細胞と、コントロール細胞を準備し、抗NuMA抗体を用いた蛍光免疫によって、細胞分裂時における細胞膜近傍に分布するNuMAを可視化する。細胞分裂によって生成される2細胞のうちで、1細胞のみにNuMAが分布される場合を不均等細胞分裂として、分裂期細胞におけるその割合を算定する。

(2) 情報伝達経路の解析

不均等細胞分裂に関わる分子経路としては、神経組織におけるNotch経路がよく知られている。そのために、Notch経路が活性化されることによって誘導されるHes1の発現レベルの変化を、定量RT-PCRによって検討する。

Rad54Bの不均等細胞分裂における役割を仲介する分子としては、酵母two-hybrid法によるデータを参考にして、Rad54Bが直接結合する可能性を有しているLNXを想定することができる。LNXはNotchの不活化に関わるNumbを制御することが知られているために、Rad54Bのノックアウト実験系において、NumbのRNAレベルの発現量を定量RT-PCRによって、そのタンパク質レベルでの発現量をウェスタン・ブロッティングによって解析する。

4. 研究成果

(1) 不均等細胞分裂におけるRad54Bの役割

神経芽腫細胞株NB69において、NuMAを指標とした不均等細胞分裂の頻度は、コントロールsiRNA処理細胞においては、平均28%であったのに対して、Rad54BのsiRNA処理細胞においては、平均20%であり、有意に低下していた。この結果から、Rad54Bは、不均等細胞分裂を促進する役割を有することが示唆された。

不均等細胞分裂は、幹細胞から分化細胞が生成されるために、重要な機構と考えられて

いる。すなわち、生成される2つの娘細胞において、異なる性質がもたらされることは、1つは、幹細胞としての自己複製を、もう1つは、幹細胞から分化する細胞の分化能を反映することが考えられる。

Rad54Bは、これまでの先行研究によって、その発現レベルの増加が、多くの種類のがんにおいて確認されている¹⁾。もし、がん幹細胞においてもRad54Bの発現レベルが増加しているのであれば、その幹細胞としての特性を維持することに貢献することになる。がん幹細胞は、治療抵抗性であるために、がん治療においては、いかにこのような特性を有する細胞を消滅させるかが大きな課題となっている。以上の研究によって、Rad54Bが、がん幹細胞の特性である自己複製と分化能の両方を維持するために必要な不均等細胞分裂を正に制御することが示唆されたために、この研究結果を支持するさらなる証拠が必要となった。そのために、その分子機序の解明に取り組んだ。

(2) Rad54Bが形成する新規情報伝達経路の同定

Rad54Bの構造上の特徴は、ATP加水分解酵素としての役割を果たすために、他の同類のタンパク質にも進化上も保存される7つのドメインを有することであり、これらはSNF2/SWI2ファミリーに属するタンパク質においては共通した構造である³⁾。このATP加水分解活性は、DNA依存性であることから、Rad54Bが有する機能として最もよく知られている相同組換えにおいて重要な活性と考えられている⁴⁾。

一方、Rad54Bは、相同組換え以外にも、E3ユビキチン・リガーゼであるMDM2/MDMXのタンパク質複合体の足場タンパク質としてその活性を増強することによって、DNA損傷応答の中心的な分子であるp53の分解を促進する機能も有していることが明らかになっている¹⁾。この場合には、ATP加水分解酵素活性は必要とせず、足場タンパク質としてRad54Bの一部の構造のみがあれば十分である。

このように、Rad54Bは相同組換えとDNA損傷応答における情報伝達の2つの異なる役割を果たすことが明らかとなっているが、神経芽腫由来細胞株において明らかになった不均等細胞分裂における役割は、これらとは明らかに異なる機能であり、その機序についても異なることが想定される。そこで、酵母two-hybrid法によって同定されているRad54Bと直接結合するタンパク質の候補の中から、発生・分化に関係する可能性のあるものについて、Rad54Bと機能的に関係する可能性を検討した。

その結果、LNXがRad54Bと直接結合する可能性があったために、LNXが関与する情報伝達経路におけるRad54Bの影響を解析した。LNXはE3ユビキチン・リガーゼとして細胞運

命決定に重要な役割を果たすことが知られているNumbを分解することが報告されている⁵⁾。そこで、Rad54Bのノックダウン実験において、Numbの発現レベルを解析したところ、RNAの変化ははっきりとは見られなかったのに対して、ウェスタン・ブロッティングにおいては、Rad54BのノックダウンによってNumbタンパク質の増加が認められた。

次に、Numbが標的とする経路としてNotchに着目し、その構成タンパク質であるHes1の発現量を解析した。その結果、定量RT-PCRにおいて、Rad54Bのノックダウンによって、Hes1の発現は低下していた。NumbはNotch経路を不活化することから、この結果は、上記のNumbへの影響と整合性のあるものである。

以上の解析によって、Rad54Bは、Numbを抑制することによってNotch経路を正に制御することが明らかとなった。そして、Notchが、神経発生においては、不均等細胞分裂に重要な役割を果たすことから、この経路が、神経芽腫細胞株において観察された不均等細胞分裂にも関わる可能性が想定された。ただし、この仮説については、まだ実証できていないために、この情報伝達経路の意義については不明である。

(3) 今後の展望

神経芽腫由来の細胞株を用いた実験において、Rad54Bが不均等細胞分裂に関与することが明らかとなったために、当初の研究目的を鑑みると、この現象が、がん幹細胞の特性に直接関係しているのかが次の重要な課題となる。この点については、他の種類のがん細胞株での検討とともに、がん幹細胞のマーカーを使用した実験が必要になる。

その次の課題としては、このようなRad54Bの役割が、これまでに同定されている相同組換えやDNA損傷応答などのDNA二本鎖切断に対する応答現象と関連しているかがあげられる。現時点の結果からは、Rad54Bが多機能性のタンパク質であり、DNA損傷応答とは独立して細胞分裂における役割を有している可能性も十分に存在する。

最後に、Rad54Bが不均等細胞分裂に関わる機序について、今回の研究で解明されたNumb-Notch経路が重要であるのか、それとも別経路が存在するのを明確にすることが課題となる。

このように、今回の研究で得られた2つの結果については、両方とも新しい知見であり、幹細胞研究において新たな方向性を提案するものであるが、生命現象の基本原則の一つとして、これらを含めた原理を確立するためには、以上の課題を検討した上で、その結果を解釈する必要がある。特に、分子機序については、Rad54Bと直接結合するLNXが、本質的に関与しているのか、それとも別のRad54B結合タンパク質が関与しているのかが、重要な点となる。

<引用文献>

Yasuhara T, Suzuki T, Katsura M, Miyagawa K: Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. Nat Commun 5:5426, 2014

Izumi H, Kaneko Y: Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 109:18048-18053, 2012

Tanaka K, Hiramoto T, Fukuda T, Miyagawa K: A novel human Rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51. J Biol Chem 275:26316-26321, 2000

Tanaka K, Kagawa W, Kinebuchi T, Kurumizaka H, Miyagawa K: Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. Nucleic Acids Res 30:1346-1353, 2002

Nie J, McGill MA, Dermer M, Dho SE, Wolting CD, McGlade CJ: LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. EMBO J 21:93-102, 2002

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Nagai Y, Yamamoto Y, Yasuhara T, Hata K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Yamanaka T, Miyagawa K, Watanabe T: High RAD54B expression: an independent predictor of postoperative distant recurrence in colorectal cancer patients. Oncotarget 6:21064-21073, 2015 査読有
DOI:10.18632/oncotarget.4222

[学会発表](計 4 件)

Yasuhara T, Suzuki T, Katsura M, Miyagawa K: Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. 15th

International Congress of Radiation Research, 2015年5月25日~5月29日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Yasuhara T, Suzuki T, Katsura M, Miyagawa K: The novel mechanism linking cell cycle regulation to cancer development. Gordon Research Seminar & Conference-Cell Growth & Proliferation, 2015年7月11日~7月17日, Vermont(米国)

Yasuhara T, Miyagawa K: The Rad54B-p53 axis limits the strength of DNA damage checkpoint. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年10月6日~10月8日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yasuhara T, Miyagawa K: The Rad54B-p53 axis limits the strength of DNA damage checkpoint. 日本放射線影響学会第59回大会, 2016年10月26日~10月28日, JMS アステールプラザ(広島県広島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 清(MIYAGAWA KIYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40200133

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無

(4)研究協力者

無