

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18438

研究課題名(和文) Y-family DNAポリメラーゼ阻害によるc-myc高発現がん治療基盤の確立

研究課題名(英文) Development of a therapeutic foundation for c-Myc overexpressed cancer by depletion of Y-family DNA polymerase

研究代表者

倉島 公憲 (KURASHIMA, Kiminori)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：90724956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子が誘導する複製ストレスは発がんを促進するDNA損傷やゲノム不安定性の原因となり得る。そのため、この応答機構の理解はがん治療において重要である。本研究ではY-family DNAポリメラーゼであるPol δ の発現抑制がc-Mycによる複製ストレスを増強させることを見出した。また、このとき生じるDNA二本鎖切断はMUS81-EME2 S期特異的エンドヌクレアーゼ複合体を介していることを明らかにした。さらに、Pol δ とMUS81/EME2の二重阻害は相乗的に細胞死を誘導したことから、これらの合成致死効果がc-Myc高発現がん治療に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oncogene-induced replication stress is a major source of DNA damage and genomic instability during tumor development. Thus, understanding of cellular replication stress response mechanisms provides potential therapeutic targets for cancer treatment. This time, we revealed that depletion of Pol δ , a member of Y-family DNA polymerase, promotes c-Myc induced replication stress. We also show that in the absence of Pol δ , c-Myc-induced DNA double strand breaks formation depended on MUS81-EME2, the S-phase specific endonuclease complex. We further demonstrate that concomitant depletion of MUS81-EME2 and Pol δ enhanced replication stress and cell death in a synergistic manner. The present work highlights the possibility of a synthetic sick or lethal interaction between Pol δ and MUS81-EME2 that can be exploited for c-Myc overexpressed cancer treatment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Y-family DNAポリメラーゼ c-Myc 複製ストレス Pol δ DNA fiber法 MUS81-EME2

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子の活性化は DNA 複製の異常とそれに伴う DNA 損傷を生じさせる。この複製ストレスは細胞老化・細胞死を誘導することにより発がんを抑制する一方で、ゲノム不安定性を介して発がんの促進にも作用し得るといふ両面性を持つ。また近年、複製ストレスの増強による腫瘍特異的な殺細胞効果が注目されており、この応答機構の理解は発がん機序の解明だけでなく治療標的としても重要な意味を持つ。しかしながら、その詳細な分子機構は不明な部分も多く、特にどのような DNA ポリメラーゼが関与するかは明らかでない。

c-Myc はヒト腫瘍で最も頻繁に異常がみられるがん遺伝子の一つである。その発がん作用は転写因子としての働きによる細胞増殖蛋白の活性化とそれによる代謝異常と考えられていたが、近年 c-Myc が DNA 複製を異常亢進させ、その結果生じる複製ストレスがゲノム不安定性を介してがん化へと導くことが示唆されている。興味深いことに、この DNA 複製の異常亢進は転写非依存的に c-Myc が複製開始前複合体に直接結合し、複製起点を活性化させることが示された。

Y-family DNA ポリメラーゼは Pol η 、Pol θ 、Pol ι 、REV1 の 4 種類からなり、その働きとして DNA 損傷などにより複製が停止した部位において、複製ポリメラーゼと置き換わり損傷を乗り越えて DNA 合成できる損傷乗り越え合成が知られている。Pol η は紫外線感受性を示し皮膚がんを高率に発症する遺伝性疾患、色素性乾皮症バリエーション型 (XP-V) の原因遺伝子である。また近年、損傷乗り越え合成に加えて染色体脆弱部位など通常の複製ポリメラーゼでは複製困難な領域における DNA 合成に Y-family ポリメラーゼが関わるという報告も増えてきている。

2. 研究の目的

がん遺伝子 c-Myc が誘導する複製ストレスにおけるその応答機構、特に Y-family ポリメラーゼの機能とその分子基盤を明らかにする。また、Y-family ポリメラーゼや、それに関連して機能する分子の阻害による抗がん効果を調べ、新たな治療標的を見出す。

3. 研究の方法

4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT) の添加により c-Myc の活性化が誘導可能なヒト骨肉腫細胞株 (U2OS/c-Myc-ER) を作成し、c-Myc 活性化細胞で Y-family ポリメラーゼの siRNA

による発現抑制を行い、その影響を種々の細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を用いて解析した。また、GFP 標識した Pol η を U2OS/c-Myc-ER 細胞に導入しその核内局在を解析した。さらに複製ダイナミクスを解析するため、チミジンアナログである IdU と ClIdU を連続的に取り込ませた細胞を溶解しスライドガラス上に DNA を展開し染色する DNA fiber 法を行った。

4. 研究成果

(1) U2OS/c-Myc-ER 細胞において Y-family ポリメラーゼである Pol η 、Pol θ 、Pol ι 、REV1、複製ポリメラーゼである Pol δ を siRNA により発現抑制した後、4OHT を加え c-Myc を活性化させ、その細胞増殖をみた結果、Y-family ポリメラーゼの発現抑制は通常の細胞増殖にはほとんど影響を与えなかったが、c-Myc 活性化による細胞増殖が Pol η 発現抑制により特に低下した。この時、G2M 期の細胞の増加とアポトーシス細胞の増加がみられた。Pol η の発現抑制は c-Myc の活性化の有無にかかわらず細胞増殖を遅延させた。以上のことから Pol η に焦点を当て以下の解析を行った。

(2) GFP 標識した Pol η を安定発現した U2OS/c-Myc-ER のクローンを用いて、その核内局在をみた結果、この細胞は c-Myc 活性化により S 期において BrdU 標識された複製部位と共局在する foci が処理時間依存的に増加した。このことは c-Myc による複製ストレスに対して Pol η が機能することを示唆する。

(3) DNA fiber 法により複製ダイナミクスをみた結果、c-Myc 活性化により、複製起点の活性化頻度の上昇、複製フォークの進行速度の低下と停止の増加がみられた。このとき Pol η を発現抑制させると複製フォークの進行速度の低下と停止の増加がさらに強まった。

(4) DNA 二本鎖切断 (DSB) をみるため、H2AX の核内 foci やウエスタンブロットによる DSB マーカーの検出、ニュートラルコメットアッセイを行った。その結果、c-Myc 活性化による DSB の増加が Pol η の発現抑制によりさらに増強した。

(5) Pol η のポリメラーゼ活性部位にアミノ酸置換を導入しその活性を無くした変異体 (dead-Pol η) を U2OS/c-Myc-ER 細胞に一過的に発現させた。その結果、dead-Pol η は c-Myc 活性化により DSB 部位と共局在した。この結果から c-Myc による複製ストレスに対して Pol η が機能するにはその酵素活性が必須であること、また、Pol η が局在化する部位においてそれが解消されないと DSB が生じるこ

とが示唆された。

(6) 複製停止部位において二本鎖切断を生じさせるヌクレアーゼとしてMUS81が知られている。MUS81はEME1もしくはEME2とヘテロ二量体をつくり機能することが報告され、それぞれG2/M期、S期に働く。そこでこれらをsiRNAにより発現抑制し、c-Myc活性化とPol α 発現抑制により生じるDSBへの影響を解析した。その結果、EME1の発現抑制では影響がみられなかったが、MUS81とEME2の発現抑制によりDSBの生成が抑制された。この時の細胞死や複製ストレスをみた結果、MUS81もしくはEME2の発現抑制によりc-Myc活性化とPol α 発現抑制による細胞死および複製ストレスが相乗的に増加していた。この結果はMUS81-EME2によるDSB生成はDNA修復を介する複製再開に寄与することを示唆する。

以上の結果から下図のモデルを作成した。c-Mycの活性化により複製起点の活性化頻度が上昇し複製ストレスが生じ、複製フォークが停止する。この時、複製ポリメラーゼからPol α への置き換わりが起き、Pol α が複製を再開することで細胞の生存へと導く。Pol α の発現抑制や活性の無いPol α によりそれが起こらないと複製フォークの停止が長期化する。この時バックアップとしてMUS81-EME2によるDSB生成が起きる。このDSBが修復され複製再開する。MUS81-EME2が機能しないと細胞死が誘導される。

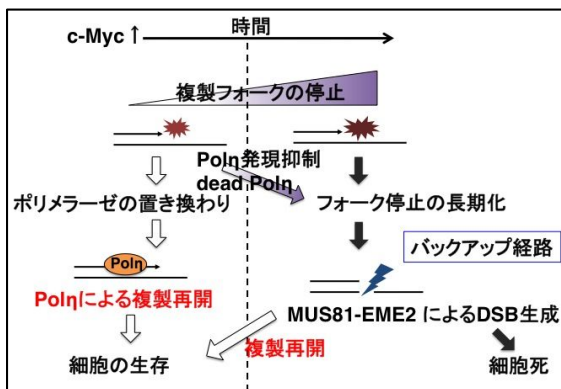


図 c-Myc による複製ストレス応答モデル

このように本研究はPol α とMUS81-EME2の機能阻害による合成致死効果を示し、c-Myc高発現がん治療における新たな可能性が示された。また、XP-V患者におけるがん遺伝子誘導性複製ストレス応答がMUS81-EME2経路が重要である可能性が示され、有用な治療に期待される。

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 0 件)

(学会発表)(計 8 件)

倉島公憲、関本隆志、小田司、川端剛、花岡文雄、山下孝之、Y-familyポリメラーゼPol α とエンドヌクレアーゼMus81-Eme2複合体は段階的に協調してc-Mycがん遺伝子誘導性複製ストレスを抑制する、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、熱ショック応答転写因子Heat shock factor 1(HSF1)の発現抑制による細胞老化はMDM2阻害蛋白Dehydrogenase/reductase 2(DHRS2)に制御されている可能性がある、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之、Pol α , a Y-family translesion polymerase, mitigates c-Myc induced replication stress、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日~8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、HSF1抑制はタンパク質毒性ストレス非依存的に細胞老化を誘導する、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日~8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

倉島公憲、関本隆志、小田司、川端剛、花岡文雄、山下孝之、Pol α , a member of Y-family DNA polymerases, suppresses MYC oncogene-induced replication stress、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、Heat shock factor 1(HSF1)抑制はDNA損傷および蛋白変性ストレスと独立して細胞老化を誘導する、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之、Pol α , a member of Y-family DNA polymerases, prevents generation

of DNA double strand breaks induced by c-Myc expression、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、HSF1 抑制は細胞依存的なメカニズムで老化を誘導する、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://molgen.imcr.gunma-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

倉島 公憲 (KURASHIMA, kiminori)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：90724956