

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16759

研究課題名（和文）mRNAプロセッシングによる相同組換え修復維持機構の解明と卵巣癌治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of homologous recombination repair by mRNA processing and application to ovarian cancer treatment

研究代表者

谷川 道洋（TANIKAWA, MICHIRO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70706944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、新規のDNA損傷修復因子としてメディエーター複合体のゲノム安定性維持における役割を明らかにした。具体的には、網羅的スクリーニングで、メディエーター複合体因子を新規DNA損傷候補因子として抽出し、DNA損傷修復経路のどの段階を制御するかを同定した。また、共焦点顕微鏡によるライブセルイメージング技術を用いて新規因子のDNA損傷部位における動態を観察する実験系を確立し、阻害剤やsiRNAにより上流制御経路を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規のDNA損傷修復因子としてmRNAプロセッシングに関わるメディエーター複合体を同定した。DNA損傷修復、特に相同組換え修復能の異常は卵巣癌の治療標的として確立されており、メディエーター複合体の機能失活が相同組換え修復異常につながる可能性を初めて示すことになる。メディエーター複合体を含むmRNAプロセッシング経路は複数の癌種で高頻度に変異を呈しており、将来的には新規の治療マーカーや治療標的につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we revealed the role of the mediator complex as a novel DNA damage repair factor in maintaining genomic stability. Specifically, in comprehensive genome wide screens, we extracted mediator complex factors as novel DNA damage candidate factors and identified which steps in the DNA damage repair pathway are regulated. In addition, we established an experimental system for observing the dynamics of a novel factor at the DNA damage site using live cell imaging technique by a confocal microscope, and identified the upstream regulatory pathway by inhibitors and siRNA. The mRNA processing pathway involving the mediator complex is frequently mutated in multiple cancer types, suggesting that it may become a novel therapeutic marker or target in the future.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 DNA損傷修復 相同組換え修復 mRNAプロセッシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌において、相同組換え修復経路の低下している状態(HRD; homologous recombination deficiency)にある遺伝性乳がん卵巣がん症候群患者に PARP 阻害剤が選択的に高い奏巧性をもつことが明らかになり、PARP 阻害剤である Olaparib や Niraparib が卵巣癌において既に臨床導入されている。卵巣漿液性癌を対象としたゲノムワイド解析研究では、約 25%に *BRCA1/2* の生殖細胞変異・体細胞変異が認められただけでなく、*BRCA1* のプロモーター領域のメチル化や *EMSY* の発現増幅、*PTEN* の欠失、その他の相同組換え修復因子の変異等でおよそ 50%弱の漿液性癌で相同組換え修復能が低下していることが明らかになった。PARP 阻害剤の Niraparib に関する臨床試験 (ENGOT-OV16) では *BRCA1/2* の生殖細胞変異が無くても白金製剤に感受性があれば PARP 阻害剤が有効であることが明らかにされた。既知の相同組換え修復因子の異常では無く他経路の遺伝子異常により、HRD の状態にあり PARP 阻害剤に感受性があるという可能性や、PARP 阻害剤に HRD 以外の複雑な治療メカニズムがある可能性が示唆されている。本申請者は複雑な制御を受けている相同組換え修復機序の解明のため、siRNA ライブラリを用いた網羅的スクリーニングを行い、多数の mRNA プロセッシング因子(転写因子・スプライシング因子・メディエーター複合体構成因子)を新規の DNA 損傷修復候補因子として同定した。

#### 2. 研究の目的

本研究では、siRNA library による網羅的スクリーニングにより同定された DNA 損傷修復・相同組換え修復の新規候補因子として同定された mRNA のプロセッシングに関わる因子、特にメディエーター複合体のゲノム安定性維持への役割を解明し、卵巣癌及び乳癌における発病や治療効果へのバイオマーカーあるいは新規の創薬の標的になる可能性を探索することを目的とした。本研究では、卵巣癌発症に重要な役割を担う *BRCA1/2* やスプライシング因子の新規の機能である DNA/RNA hybrid(R-loop)の積極的処理と卵巣癌の関連を解明することも目的とした。

#### 3. 研究の方法

新規の DNA 損傷修復候補因子の siRNA によるノックダウン下で pATM, CtIP, BLM, *BRCA1*, RPA, RAD51 の DNA 損傷部位への集積を蛍光免疫染色で評価し、同経路において寄与する段階を同定した。相同組換え修復能は DNA 相同組換え修復能評価アッセイにて検討した。このアッセイでは無機能 GFP カセット内にエンドヌクレアーゼ I-SceI 認識サイトを安定発現する DR-GFP U2OS 細胞を用いた。本研究ではメディエーター因子が *BRCA1* と協調して転写調節を行うことに着目して、*BRCA1* の BRCT 領域との結合を GST-BRCT プラスミドを作成して GST-pull down 法にて結合を確認した。DNA 損傷修復経路への直接的寄与を示すために Laser microirradiation 法を用いた。候補因子の GFP fusion プラスミドを細胞にトランスフェクションし Laser microirradiation で細胞に DNA 損傷を与え、共焦点顕微鏡でリアルタイムにて観察した。候補因子が DNA 損傷部位に集積する場合は、PARP・ATM・ATR・DNA-PK 等の DNA 損傷シグナルの上流にある因子の阻害剤を使用して新規因子の集積動態がどのように変化するかも解析した。本研究では、メディエーター因子及び *BRCA1* の R-loop 処理への関与を検討するため、細胞内・臨床検体内での R-loop 蓄積を蛍光免疫染色法で検討した。R-loop を同定する方法は特異的抗体である S9.6 抗体を使用した。臨床検体としては、全エクソンシーケンスの解析で判明した mRNA のプロセッシングに変異を認める卵巣癌臨床検体を使用した。

#### 4. 研究の成果

本研究では、DNA 損傷修復、相同組換え修復の新規候補因子であるスプライシング因子・メディエーター因子が pATM・H2AX のリン酸化、いわゆる DNA 損傷シグナルの最上流で制御していることを解明した。これらの因子のノックダウンにより、DNA 損傷シグナルが著しく抑制さ

れ、BRCA1, RPA, RAD51 等の既知の相同組換え修復因子の DNA 損傷部位への集積が抑制され、相同組換え修復能が著しく低下することが示された。新規修復因子が BRCA1 と BRCT 領域を介して結合することを示し、一部の候補因子が Laser microirradiation で誘導される DNA 損傷部位に集積することを示した。細胞及び臨床検体の解析では、R-loop が BRCA1 変異やメチエーター因子・スプライシング因子に変異がある卵巣癌の細胞核内で蓄積することを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Takeuchi Makoto, Tanikawa Michihiro, Nagasaka Kazunori, Oda Katsutoshi, Kawata Yoshiko, Oki Shinya, Agapiti Chuwa, Sone Kenbun, Miyagawa Yuko, Hiraike Haruko, Wada-Hiraike Osamu, Kuramoto Hiroyuki, Ayabe Takuya, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Anti-Tumor Effect of Inhibition of DNA Damage Response Proteins, ATM and ATR, in Endometrial Cancer Cells   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancers  | 6. 最初と最後の頁<br>1913 ~ 1913 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cancers11121913  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Aotsuka Aeri, Matsumoto Yoko, Arimoto Takahide, Kawata Akira, Ogishima Juri, Taguchi Ayumi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Oda Katsutoshi, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻<br>110               |
| 2. 論文標題<br>Interleukin 17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>3068 ~ 3078 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.14174   | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Akino Nana, Wada-Hiraike Osamu, Isono Wataru, Terao Hiromi, Honjo Harunori, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Hirano Mana, Harada Miyuki, Hirata Tetsuya, Hirota Yasushi, Koga Kaori, Oda Katsutoshi, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka | 4. 巻<br>17           |
| 2. 論文標題<br>Activation of Nrf2/Keap1 pathway by oral Dimethylfumarate administration alleviates oxidative stress and age-associated infertility might be delayed in the mouse ovary   | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Reproductive Biology and Endocrinology   | 6. 最初と最後の頁<br>96-104 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12958-019-0466-y  | 査読の有無<br>無           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Kojima Machiko, Sone Kenbun, Oki Shinya, Kukita Asako, Kawata Yoshiko, Kashiyama Tomoko, Asada Kayo, Tanikawa Michihiro, Mori-Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻<br>19        |
| 2. 論文標題<br>The histone methyltransferase WHSC1 is regulated by EZH2 and is important for ovarian clear cell carcinoma cell proliferation   | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>BMC Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>455 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12885-019-5638-9  | 査読の有無<br>無        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kukita Asako, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Kaneko Syuzo, Komatsu Masaaki, Wada Miku, Honjoh Harunori, Kawata Yoshiko, Kojima Machiko, Oki Shinya, Sato Masakazu, Asada Kayo, Taguchi Ayumi, Miyasaka Aki, Tanikawa Michihiro, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻<br>513             |
| 2. 論文標題<br>Histone methyltransferase SMYD2 selective inhibitor LLY-507 in combination with poly ADP ribose polymerase inhibitor has therapeutic potential against high-grade serous ovarian carcinomas  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>340 ~ 346 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2019.03.155  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>谷川道洋   |
| 2. 発表標題<br>Clinical sequencing by Todai OncoPanel(TOP) for ovarian cancer |
| 3. 学会等名<br>日本癌治療学会  |
| 4. 発表年<br>2018年 ~ 2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>谷川道洋  |
| 2. 発表標題<br>卵巣悪性腫瘍の クリニカルシーケンス(Todai OncoPanel) で遭遇する生殖細胞系列変異への対応 |
| 3. 学会等名<br>家族性腫瘍学会   |
| 4. 発表年<br>2018年 ~ 2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>谷川道洋  |
| 2. 発表標題<br>Clinical sequencing by Todai OncoPanel (TOP) for Mullerian cancer |
| 3. 学会等名<br>日本婦人科腫瘍学会 International Gynecologic Cancer Society (招待講演)         |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>本城晴紀  |
| 2. 発表標題<br>Mediator complex subunit 1 (MED1) is a novel binding partner of BRCA1 and regulates homologous recombination repair |
| 3. 学会等名<br>日本産科婦人科学会   |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本城晴紀   |
| 2. 発表標題<br>転写制御因子Mediator complex subunit 1 (MED1)はBRCA1と新規複合体を形成しゲノム安定性に寄与する |
| 3. 学会等名<br>婦人科分子標的治療研究会   |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>本城晴紀  |
| 2. 発表標題<br>Transcription factor MED1 regulates homologous recombination and maintains genome stability |
| 3. 学会等名<br>日本癌学会   |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本城晴紀   |
| 2. 発表標題<br>Transcription factor, MED1 is a novel binding partner of BRCA1 and guards genome stability |
| 3. 学会等名<br>日本婦人科腫瘍学会 International Gynecologic Cancer Society (国際学会)                                  |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲葉洋文  |
| 2. 発表標題<br>Clinical Sequencing by Todai OncoPanel (TOP) for Uterine Sarcomas |
| 3. 学会等名<br>日本癌学会   |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|-------------------------------|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 本城 晴紀<br>(HONJOH HARUNORI)    | 帝京大学医学部・産婦人科・助手<br><br>(32643)   |    |
| 研究協力者 | 稲葉 洋文<br>(INABA HIROFUMI)     | 東京大学医学部・産婦人科・大学院生<br><br>(12601) |    |
| 研究協力者 | 日下部 美佐子<br>(KUSAKABE MISAOKO) | 東京大学医学部・産婦人科・大学院生<br><br>(12601) |    |