

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19478

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬誘導性DNA複製ストレス誘導におけるRNAの関与とその意義

研究課題名(英文) RNA involvement in the process of chemotherapy-induced DNA replication stress

研究代表者

北尾 洋之 (Kitao, Hiroyuki)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：30368617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの特性であるゲノム不安定性は、正常なDNA複製が妨げられることによるストレス(複製ストレス)が原因と考えられているが、その内在的要因としてRNA転写中間体(R-loop)が提唱されている。申請者は抗がん剤トリフルリジン(FTD)作用による複製ストレスへのR-loop関与について検証した。FTDの作用により活性化したFancD2は転写を担うRNAポリメラーゼIIと核内で近接した。転写抑制剤によりFancD2活性化は抑制され、FancD2欠損時にはFTDによるDNA障害が重篤化した。抗がん剤に対する細胞応答において、FancD2によるR-loop解消が重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤の作用メカニズムは複雑で、それぞれの理解は重要である。申請者の研究成果は、DNAに作用する抗がん剤の作用においてRNAの関与を裏付けるものであり、その意義は大きい。FTD/TPIは進行再発直腸結腸癌に対する治療薬として2014年に本邦で認可を受け、現在では、米欧、アジアでも広く治療に用いられている。近年、胃癌に対する適応も取得し、消化器癌に対する治療薬としての重要度も増している。申請者の研究成果は、FTD/TPIの抗腫瘍効果を担うFTDの作用メカニズムを理解する上でも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：DNA replication stress is the trigger of genome instability, a hallmark of cancer. One critical endogenous cause of DNA replication stress is R-loop, an intermediate DNA-RNA hybrid structure during RNA transcription. We investigated the possible contribution of R-loop in the DNA replication stress induced by a chemotherapeutic drug, trifluridine (FTD). FancD2 was activated by FTD and closely associated with RNA polymerase II in the nucleus. Transcription inhibitors suppressed FTD-induced FancD2 activation and FancD2 deficiency caused severer FTD-induced DNA damage. FancD2 contributes to resolve R-loop during mild replication stress. Our data indicate that FancD2 plays an important role in the cellular response to FTD via resolving R-loops.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：複製ストレス RNA転写中間体 FancD2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「がんの特性」を生み出すための性質として「ゲノム不安定性」があり、様々ながんにおける共通の性質として認識されている。多くのがんにおいて、DNA 複製ストレスが染色体レベルでのゲノム不安定性を引き起こす要因とされている。DNA 複製ストレスとは、DNA 損傷や dNTP 枯渇など、不完全な環境で正常な DNA 複製進行が妨げられる状況を指すが、近年、DNA 複製進行を妨げる外的な要因がない場合でも、自然発生する因子が引き金となり、DNA 複製ストレスが発生していることが知られるようになっていた。その要因の1つとして、RNA 転写中間体 (R-loop, RNA-DNA ハイブリッド構造) の存在と、R-loop と DNA 複製 Machinery との物理的な衝突があると複数のグループから提唱されていた。しかし、この R-loop を介したメカニズムが、悪性化した腫瘍に対する抗がん剤治療の際の抗腫瘍効果発現メカニズムとして機能しているか否かについては、まだ明確な結論が得られていなかった。申請者は、新規抗がん剤 FTD/TPI の抗腫瘍成分であるトリフルリジン(FTD)が DNA 複製ストレスを惹起し、抗腫瘍効果を発揮することを見いだしていたが、DNA 複製ストレス誘導の具体的なメカニズムについて、まだ詳細には明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

抗がん剤、特に FTD の作用によって惹起される DNA 複製ストレスについて、R-loop の関与の有無を検証することを目的とした。また、R-loop 構造の安定化及び解消を通じて、抗がん剤の抗腫瘍効果を高めるための革新的な戦略を見いだすことを目指した。

3. 研究の方法

抗がん剤による DNA 複製ストレス惹起について、DNA 複製ストレス応答因子の活性化は、Chk1 のリン酸化、FancD2 のモノユビキチン化を指標として検出する。がん細胞のゲノム DNA 上に存在する R-loop については、R-loop 特異的な抗体 (S9.6) を用い、蛍光免疫染色や DNA スロットプロット法により定性的、定量的に評価する。R-loop と DNA 複製フォークとの近接については、FancD2 と S9.6 あるいは FancD2 と RNA polymerase II との共局在を in situ proximity ligation アッセイによって評価する。転写抑制剤として、RNA polymerase II 阻害剤である 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB)、CDK 阻害剤である Flavopiridol (Alvocidib)、核酸系抗生物質である 3'-deoxyadenosine (Cordycepin)を用いる。

4. 研究成果

抗がん剤 FTD による DNA 複製ストレス発生時における RNA 転写中間体の関与の有無について、検証を行った。FTD (IC50 濃度 = 3 microM) 曝露 24 時間後に効率よく Chk1 Ser345 リン酸化、FancD2 モノユビキチン化が観察された。2019 年に京都大学の高田教授のグループから FancD2 に RNA プロセシング因子群を呼び寄せて、R-loop を解消する働きがあることが報告された (Okamoto et al. FEBS J. 286: 139-150, 2019)。この知見を受けて、FTD 曝露時に RNA polymerase II と FancD2 との近接について in situ proximity ligation assay (PLA)により検証したところ、シグナルが検出され、両者の核内での近接が確認された。転写活性を阻害する薬剤のうち、DRB、Flavopiridol 添加により、FTD による Chk1 Ser345 リン酸化、FancD2 のモノユビキチン化が有意に抑制されたが、Cordycepin 添加では抑制効果は見られなかったことから、RNA polymerase II の活性そのものを抑えることが R-loop と DNA 複製 machinery との衝突を防ぐ上で重要であると考えられた。申請者はヒトがん細胞において、FTD 曝露により発生する

複製ストレスに起因して、S期完了後の間期にも核内にRPA32フォーカスとして可視化できる1本鎖DNAが形成されることを見出した。FancD2の発現抑制による、このRPA32フォーカス形成に対する影響について検証したところ、RPA32フォーカスの数は変化がなかったが、1つ1つのフォーカスの蛍光輝度が強まっていた。このことは、FancD2欠失により、S期終了後間期に核内に発生する1本鎖DNA領域の発生頻度は変化がないが、それぞれの領域が拡大していることを意味している。FancD2によるR-loop解消がうまく作動しないことで、FTDによるDNA損傷を重篤化し、その抗腫瘍効果に影響を及ぼしていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Sugiko, Iimori Makoto, Chan David Virya, Hara Eiji, Kitao Hiroyuki, Maehara Yoshihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 MDC1 methylation mediated by lysine methyltransferases EHMT1 and EHMT2 regulates active ATM accumulation flanking DNA damage sites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29239-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Edahiro Keitaro, Iimori Makoto, Kobunai Takashi, Morikawa-Ichinose Tomomi, Miura Daisuke, Kataoka Yuki, Niimi Shinichiro, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Kitao Hiroyuki, Maehara Yoshihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Thymidine Kinase 1 Loss Confers Trifluridine Resistance without Affecting 5-Fluorouracil Metabolism and Cytotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0686	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Bharti Sanjay Kumar, Sommers Joshua A, Awate Sanket, Bellani Marina A, Khan Irfan, Bradley Lynda, King Graeme A, Seol Yeonee, Vidhyasagar Venkatasubramanian, Wu Yuliang, Abe Takuye, Kobayashi Koji, Shin-ya Kazuo, Kitao Hiroyuki, Wold Marc S, Branzei Dana, Neuman Keir C, Brosh Robert M	4. 巻 46
2. 論文標題 A minimal threshold of FANCD1 helicase activity is required for its response to replication stress or double-strand break repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6238 ~ 6256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky403	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yamashita Nami, Tokunaga Eriko, Iimori Makoto, Inoue Yuka, Tanaka Kimihiro, Kitao Hiroyuki, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With?Regard to Invasion and Metastasis of Breast?Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 e1003 ~ e1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clbc.2018.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Inoue Yuka, Yamashita Nami, Kitao Hiroyuki, Tanaka Kimihiro, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Oda Yoshinao, Tokunaga Eriko, Maehara Yoshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinical Significance of the Wild Type p53-Induced Phosphatase 1 Expression in Invasive Breast Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 e643 ~ e650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clbc.2017.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kataoka Yuki, Imori Makoto, Niimi Shinichiro, Tsukihara Hiroshi, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko, Kitao Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Cytotoxicity of trifluridine correlates with the thymidine kinase 1 expression level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44399-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Yoshiaki, Nakanishi Ryota, Nukatsuka Mamoru, Matsuoka Kazuaki, Ando Koji, Wakasa Takeshi, Kitao Hiroyuki, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko, Mori Masaki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Detection of trifluridine in tumors of patients with metastatic colorectal cancer treated with trifluridine/tipiracil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-020-04072-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kataoka Yuki, Imori Makoto, Fujisawa Ryo, Morikawa-Ichinose Tomomi, Niimi Shinichiro, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Miura Daisuke, Tsurimoto Toshiki, Maehara Yoshihiko, Kitao Hiroyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 DNA replication stress induced by trifluridine determines tumor cell fate according to p53 status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 Cell fate decision according to p53 status in response to nucleoside analog-induced DNA replication stress
3. 学会等名 Gordon Research Conference-Mutagenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 The mechanism of tumor cell fate decision by an antitumor nucleoside analogue, trifluridine
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 Cell fate decision according to p53 status in response to nucleoside analog-induced DNA replication stress
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北尾洋之, 片岡裕貴, 飯森真人, 若狭武司, 藤澤遼, 釣本敏樹, 松岡和明, 沖英次, 佐伯浩司, 前原喜彦, 森正樹
2. 発表標題 トリフルリジン誘導性細胞老化とDNA複製ストレスとの関連
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 研究者情報
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003932/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	飯森 真人 (Iimori Makoto) (20546460)	九州大学・薬学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	沖 英次 (Oki Eiji) (70380392)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	佐伯 浩司 (Saeki Hiroshi) (80325448)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	