

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18624

研究課題名(和文) 泌尿器がんでの恒常的DNAダメージ負荷を利用した新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapeutic Approach Exploiting Constitutive DNA Damage in Genitourinary Cancer

研究代表者

小村 和正 (Komura, Kazumasa)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：10789853

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)：今回、我々は同一患者から得られた一対の臨床膀胱がんBCサンプル(治療歴のない腫瘍と化学療法CRT再発腫瘍)の包括的proteomic解析により、CRT再発腫瘍のBUB1B/BUBR1発現量の異常が、IRとシスプラチンに反応して変異原性NHEJ活動を促進し、腫瘍に蓄積した変異を有することを明らかにした。また、BUB1B/BUBR1高発現のある腫瘍では、DSB発生時にATMとの相互作用があることを明らかにし、ATM阻害薬が有効である可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在国内で行われているゲノム医療の普及促進の一つの課題として、解析後のアウトプットとなる臨床治験を含む治療選択肢の拡充が挙げられると申請者らは考えている。癌治療、研究において特定のKey Moleculeによる多彩な形質変化を明らかにすることは、患者様の発現差異による層別化を可能にし、さらにその変化に伴う治療ターゲットの発見がテーラーメイド医療を可能にする。本研究においても治療効果予測因子であるバイオマーカーを明らかにすることにより、より精度が高く、Precision Medicineへの発展を目指すとともに、ゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：There has been accumulating evidence for the clinical benefit of chemoradiation therapy (CRT), whereas mechanisms in CRT-recurrent clone derived from the primary tumor are still elusive. Herein, we identified an aberrant BUB1B/BUBR1 expression in CRT-recurrent clone in bladder cancer (BC). CRT-recurrent BC cells exhibited a cell-cycle independent upregulation of BUB1B/BUBR1 expression rendering an enhanced DNA repair activity in response to DNA double strand breaks (DSBs). We revealed that cells with aberrant BUB1B/BUBR1 expression dominantly exploit mutagenic non-homologous end joining (NHEJ). We further found that phosphorylated ATM interacts with BUB1B/BUBR1 after ionizing radiation (IR) treatment. In vivo, tumor growth of CRT-resistant T24R cells was abrogated by ATM inhibition using AZD0156. These data collectively suggest a redundant role of BUB1B/BUBR1 underlying mutagenic NHEJ in an ATM-dependent manner.

研究分野：尿路上皮がん

キーワード：泌尿器がん DNAダメージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な種類の癌の治療において、治癒を目的とした化学放射線療法 (CRT) の実施に関する新たな治験が報告されている。電離放射線 (IR) や遺伝毒性物質によって誘発される DNA 二本鎖切断 (DSB) は、ゲノムの完全性を維持するために修復されなければならない非常に重要な DNA 損傷であり、腫瘍形成に深く関わっている。細胞は本来、2 種類の一般的なシステムを用いて DSB を修復している。第一は、非相同末端結合 (NHEJ) と呼ばれるもので、DSB の主要な修復経路であると考えられている。NHEJ の特徴は、相同テンプレートによらず、DSB の部位で切断された末端を直接ライゲーションすることである。もう一つの修復経路は相同組換え (HR) と呼ばれ、同一の姉妹染色体が鋳型として存在する S 期と G2 期において主に仲介される。それぞれの修復経路は、異なるタンパク質群の相互作用によって活性化され、その結果、インデルなどの DSB の部位に異なる結果をもたらすことが多い。特に NHEJ は、古典的非相同末端接合 (C-NHEJ) と代替的非相同末端接合 (A-NHEJ) と呼ばれる少なくとも 2 つのモデルに分類されることが明らかになっている。C-NHEJ は、KU (KU70/80)、DNA-PKcs、DNA ligase IV (LIG4) などのコアファクターを利用することがよく知られており、最近の研究では、DSB における C-NHEJ の結果はほとんどエラーフリーであることが示されている。一方、A-NHEJ はエラーが起こりやすく、様々な要因がこの修復機構に寄与していると考えられているが、その分子基盤はまだ十分に理解されていない。

2. 研究の目的

今回、我々は同一患者から得られた一对の臨床膀胱がん BC サンプル (治療歴のない腫瘍と CRT 再発腫瘍) を調査し、CRT 再発腫瘍における BUB1B/BUBR1 発現量の上昇をもたらす分子細胞学的特徴を明らかにした。

3. 研究の方法

細胞株、増殖アッセイ、Caspase-3/7 アッセイ

BC 細胞株について、JMSU1 細胞は共同研究機関より提供されたものを用いた。253JBV 細胞は MD Anderson Cancer Center から提供され、本研究における他のすべての細胞株は American Type Culture Collection (ATCC) から入手したものである。認証は Human STR Profiling Cell Authentication Service で取得し、マイコプラズマ検査はすべての細胞株で実施した。これらの細胞は、2mM の L-グルタミンを補充した 10% ウシ胎児血清中で、37°C、5% CO₂ で維持された。個々の実験で処理した細胞は、Cell Titer-Fluor Assay と Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Madison, WI) を用いて、製造業者のプロトコールに従って細胞生存率を評価した。

タンデムマスタグ (TMT) 標識による質量分析 (MS) のための定量化

TMT 10 plex Isobaric Label Reagent Set, Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay を Thermo Fisher Science 社から購入した。サンプルは 10mM Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB: 1.0 M, pH 8.5±0.1) で 56°C、1 時間還元した後、1:50 の割合で 37°C、一晩トリプシン化した。抽出したペプチドを乾燥に近い状態まで凍結乾燥した後、100 μg のペプチドを 50mM で最終容量 100 μL となるように希釈した。TMT Label Reagents を室温に平衡化した後、直ちに 41 μL の無水アセトニトリルを各サンプルチューブに加え、時々ボルテックスしながら 5 分間インキュベーションした。その後、室温で 1 時間、TMT Label Reagents と試料を混合した。8 μL の 5% ヒドロキシルアミンを加えて反応を停止させ、試料を 1 本のチューブにまとめた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行い、6 成分でサンプルを分画した。nanoLC-MS/MS 分析には、ESI ナノスプレー源を備えた Orbitrap Q Exactive 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific, USA) と結合した Dionex Ultimate 3000 Nano LC システムを、以下のように設定して使用した (ナノカラム: 100 μm × 10cm 自社製)。ナノカラム: 逆相 ReproSil-Pur C18-AQ 樹脂充填 100 μm × 10cm 自社製カラム、負荷試料量: 5 μL、総流量: 600 nL/min、MS 分解能: 0.600 nL/min、MS 分解能: 70000 at 400 m/z、MS プリカーサー m/z range: 300.0-1650.0)。データ解析は、6 つの生 MS ファイルを解析し、Maxquant (ver. 1.5.6.5) を用いて、サンプルの種に応じたヒトタンパク質データベースとの検索を行った。Gene Ontology 解析は、DAVID bioinformatics resources (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いて行った。ヒートマップは GENE-E (www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/) を用いて作成した。

RNA 干渉、DNA トランスフェクション、およびレンチウイルス導入

使用した shRNA の配列を補足表 4 に示す。Mammalian Gene Collection ヒト BUB1B/BUBR1 配列検証済み cDNA (カタログ ID: MHS6278-202832130) は Dharmacon (Horizon Discovery) より購入した。CMV プロモーター付きヒト ATM 配列検証済み cDNA のプラスミド (カ

タログ ID : OHS5898-224629547) は、Dharmacon 社 (Horizon Discovery) から購入した。ATM-S1981A (Ser: AGC to Ala: GCC) の点変異は PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (TAKARA BIO, Japan) を用いて作製した。個々の shRNA は、ミスマッチポテンシャル >0.3 および最長共通因子 (LCF) <9 を考慮したライセンシーのための Enhanced Direct (rna1.co.jp/lsci/e-sidirect.html) を使用して設計した。BUB1B/BUBR1 および FOXM1 標的 siRNA トランスフェクションは Dharmacon 社 (Horizon Discovery) から購入して、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) を使用して実行された。トランスフェクションの 24 時間前に、細胞を 6 ウェルプレートに播種した。製造元のプロトコルに記載されているように、細胞を 50 nM の siRNA でトランスフェクションし、48 時間維持し、その後、設計した実験を行った。BR1-765x の過剰発現のために、プラスミドの設計に GENEART および GENEOPTIMIZER サービス (Thermo Scientific, Waltham, MA) を適用し、DharmaFECT Duo Transfection Reagent (Horizon Discovery) を用いて siBUB1B (3' UTR) とのコ・トランスフェクションを実行した。レンチウイルス導入には、pLKO-Tet-on-puro (Addgene プラスミド ID : #21915)、BUB1B/BUBR1 の過剰発現のための pLenti-CMyc-DDK-IRES-Puro (Origene プラスミド ID : PS100069)、pHAGE PGK-GFP-IRES-LUC-W (Addgene plasmid ID : #46793)、TRE-KRAB-dCas9-IRES-GFP (Addgene plasmid ID : #85556) ベクターをトランスフェクトして psPAX2 パッケージングと pMD2. G エンベローププラスミドを、Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) を用いて HEK293FT 細胞に 2 日間トランスフェクトした。その後、 $8 \mu\text{g/mL}$ ポリブレンの存在下で、ウイルス上清 ($0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過) を用いて標記細胞を感染させた。BUBR1-765x の過剰発現には、GENEART および GENEOPTIMIZER サービス (Thermo Scientific, Waltham, MA) を適用してプラスミドを設計した。shRNA については、6 ウェルプレートを用いて、2,700rpm で 60 分間スピンインフェクションプロトコルを適用し (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Scientific, Waltham, MA)、その後 37°C でインキュベーションを行った。翌日、培地を新しい培地に交換し、ウイルスを導入した細胞を 3 日間インキュベートした後、ピューロマイシン ($1-1.5 \text{ ng/mL}$) を用いて選択した。

フローサイトメトリーによる変異原性 NHEJ および HR 修復の検出

TRE-KRAB-dCas9-IRES-GFP (Addgene plasmid ID : #85556) のレンチウイルス感染を 293T 細胞および T24R 細胞に行い、dCas9 と統合 DNA 配列 (IRES-GFP) を安定発現した。U6 プロモーターで GFP を標的とした gRNA は pMA-T バックボーンベクター (pMA-T-U6-sgGFP) にクローニングしておいた。HR 修復のためのノックインドナー DNA は、sgGFP 標的部位 (1838 bp) を挟んで両相同腕 ($>500 \text{ bp}$) で mCherry を発現するように設計し、pMK-RQ バックボーンベクターにクローン化した。次に、Platinum SuperFi DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いた PCR によりノックインドナー dsDNA を増幅し、その後、リン酸化鎖を Guide-it Long ssDNA Strandase (Takara-bio, Kusatsu, Shiga) により消化してノックインドナー ssDNA を生成させた。トランスフェクションは、pMA-T-U6-sgGFP とノックインドナー ssDNA を同時に、リポフェクタミン 3000 を用いたリバース・トランスフェクション・プロトコルで dCas9 を安定発現する細胞に製造者のプロトコルに従ってトランスフェクションを行った。72 時間後、細胞を回収し、BD FACSAria セルソーター (BD Biosciences, New Jersey, USA) で解析し、GFP 陽性細胞および mCherry 陽性細胞の割合の変化を計算した。実験は独立して 3 回繰り返し、解析した。

デジタルドロップレット PCR (ddPCR)

ゲノム AAVS および RBM 20 領域を標的とする CRISPR リボ核タンパク質複合体を、CRISPRMAX トランスフェクション試薬 (Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて、指示した細胞にトランスフェクションした。48 時間後、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いてゲノム DNA を抽出した。ddPCR に使用したプライマーとプローブを補足表 3, 7 に示す。プローブは、FAM レポーターは sgRNA 標的部位に、HEX レポーターは参照部位に設計した。QX200 システム (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) を使用した。反応は、 $2 \times$ ddPCR Supermix for probes (No dUTP; Bio-Rad) 10 mL 、プライマー (900 nmol/L)、プローブ (250 nmol/L) およびゲノム DNA サンプル 50 ng からなる 20 mL 容で行われた。各反応ミックスを QX200 ドロップレットジェネレーターでドロップレットに変換した。液滴化したサンプルを 96 ウェルプレートに移し、密封した後、C1000 Touch サーマルサイクラー (バイオ・ラッド社製) を用いて以下のサイクリングプロトコルで循環させた。 95°C 、10 分、 94°C 、30 秒、60 秒、 98°C 、10 分を 40 サイクル。サイクリングしたプレートを生 Bio-Rad QX200 droplet reader で読み取った。ゲノム DNA を鋳型としないネガティブコントロールのウェルを少なくとも 2 つ、すべてのランに含めた。データ解析は QuantaSoft droplet reader software v1.7.4 (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) を用いて行った。

4. 研究成果

化学放射線抵抗性ヒト膀胱癌における BUB1B/BUBR1 の過剰発現

BC 細胞が CRT に対する耐性を獲得するメカニズムを探るため、まず、臨床患者試料を用いたタンデムマスタグ (TMT) 標識定量質量分析法による包括的プロテオーム解析を行った。同じ患者からのペアマッチしたサンプル (CRT 前の原発腫瘍と CRT 後の再発腫瘍) を分析した。

両サンプルで合計 1040 個のタンパク質が同定されました。CRT 再発腫瘍において、治療前の原発腫瘍と比較して、発現量の多いタンパク質と発現量の少ないタンパク質の上位 50 位までを抽出した。これらのタンパク質を gene ontology (GO) でパスウェイ解析したところ、CRT 再発腫瘍で発現量の多い上位 50 個のタンパク質には UniProtKB Key Words の DNA 修復関連パスウェイがリストアップされていた。特に、BUB1B/BUBR1 が未治療の腫瘍と比較して CRT 再発腫瘍で最も発現が上昇したタンパク質であり、対応するサンプルの免疫プロットングにより CRT 再発腫瘍における BUB1B/BUBR1 の発現上昇を確認することができた。次に、他の BC 患者サンプルを用いて BUB1B/BUBR1 の発現量を検討した。CRT 再発腫瘍では、正常膀胱や原発腫瘍組織と比較して BUB1B/BUBR1 タンパク質発現レベルの上昇が明らかであり、mRNA 発現レベルも CRT 再発腫瘍で有意に上昇した。これらのデータから、CRT 再発 BC 細胞における BUB1B/BUBR1 タンパク質の発現増加は、少なくともその mRNA 発現レベルの上昇に起因していることが示唆された。

さらに、一般に公開されているデータセットにおける BUB1B/BUBR1 の mRNA 発現量についても調査した。疾患進行に伴う BUB1B/BUBR1 mRNA 発現レベルの上昇、すなわち非筋肉浸潤性 BC (NMIBC) と比較して筋浸潤性 BC (MIBC) で最も高い発現が確認された。BUB1B/BUBR1 mRNA の発現量は、増殖マーカーとして知られる TCGA BC データセットの MKI67 発現量と正の相関があった。これらのデータを総合すると、BC 患者における BUB1B/BUBR1 発現レベルの上昇に伴う攻撃的な性質が示唆された。

T24R および JMSU1R BC 細胞における BUB1B/BUBR1 発現量の増加による IR およびシスプラチンへの抵抗性

BC 細胞株で CRT 耐性クローンの開発を目指した。T24 および JMSU1 BC 細胞株を IR (2Gy / 5 分割×10 サイクル：合計 50Gy) およびシスプラチン 2 μ M で処理し、T24R および JMSU1R 細胞株として CRT 耐性クローンを樹立した。これらの CRT 耐性細胞株は、親細胞と比較して BUB1B/BUBR1 タンパク質の発現量が増加し、シスプラチンおよび IR に対する感受性が低下していた。また、親細胞である T24 と JMSU1 に BUB1B/BUBR1 を過剰発現させると、IR 処理に対する感度が低下した。一方、親細胞 (T24 細胞および JMSU1 細胞) の BUB1B/BUBR1 ノックダウンでは、Si-Control と比較して creaved PARP 発現および caspase3/7 活性が増加し、BUB1B/BUBR1 のノックダウンによる大規模なアポトーシスが示唆されたが、耐性 T24R および JMSU1R 細胞の creaved PARP 発現や caspase3/7 活性は Si-Control および si-BUB1B 間で差がないようだった。また、BUB1B/BUBR1 のノックダウンにより、これらの T24R および JMSU1R 細胞のシスプラチンに対する抵抗性が逆転することを見出した。

BUB1B/BUBR1 は、有糸分裂チェックポイント複合体 (MCC) の構成要素であり、アナフェイス促進複合体/シクロソーム (APC/C) の阻害剤であることが報告されている。そこで、BUB1B/BUBR1 のノックダウンが細胞増殖と細胞周期に変化を与えるかどうかを評価した。興味深いことに、BUB1B/BUBR1 のノックダウンは、JMSU1R 細胞では細胞増殖を抑制し、細胞周期を変化させたが、T24R 細胞では抑制しなかった。これまでの研究で、BUB1B/BUBR1 の発現量は細胞周期依存的に厳密に制御されていることが報告されていることから、T24R 細胞と親 T24 細胞で細胞同期を行い、特定の細胞周期期における BUB1B/BUBR1 発現量を調べた。その結果、親 T24 細胞では BUB1B/BUBR1 タンパク質の発現量は G2/M 期で特異的に増加したが、T24R 細胞では細胞周期期全体で BUB1B/BUBR1 の発現量増加が構成的に認められた。

この表現型をさらに解明するために、T24R および JMSU1R 細胞において、レンチウイルスを用いた Tet-on 誘導 sh-BUB1B/BUBR1 システムを利用した。軟寒天コロニー形成アッセイでは、T24R と JMSU1R の sh-Control 細胞は 2Gy×5fr の IR 後、アンカレッジ非依存的に増殖したが、sh-BUB1#1, 2 細胞は同じ処理で増殖が制限されることが明らかにされた。次に、異種移植マウスモードを採用した。BUB1B/BUBR1 のノックダウンは、IR (2Gy×5fr：計 10Gy) 開始の 3 日前に 0.1%ドキシサイクリンを投与して誘導した。BUB1B/BUBR1 をノックダウンしない場合、T24R および JMSU1R 細胞は IR 処理に対して腫瘍を形成したが、いずれの異種移植モデルでも BUB1B/BUBR1 のノックダウンにより IR 耐性の増殖が阻害された。

次に、これらの細胞において、IR 後の DSB の程度を表す rH2AX 陽性病巣の数を比較した。IR の 3 時間後に sh-control と sh-BUB1B/BUBR1 の間で同程度の陽性病巣があるように見えたが、BUB1B/BUBR1 のノックダウンは sh-control と比較して IR の 12 時間と 36 時間後に有意に高い rH2AX レベルを示した。さらに、BUB1B/BUBR1 の発現量が増加している耐性 T24R 細胞において、rH2AX と BUB1B/BUBR1 抗体による二重染色の免疫蛍光染色を行ったところ、BUB1B/BUBR1 の発現量が増加した。重要なことは、IR 処理により rH2AX と BUB1B/BUBR1 陽性病巣が共局在化したことである。これらのデータは、BUB1B/BUBR1 発現レベルのノックダウンで rH2AX 陽性病巣が持続し、DSB に応答して rH2AX と BUB1B/BUBR1 の共局在化が証明されるように、異常な BUB1B/BUBR1 発現が DSB に応答して DNA 修復活性を高めることを示唆するものであった。

BUB1B/BUBR1 の発現量増加は変異原性 NHEJ を促進する

BUB1B/BUBR1 発現の増加が BC 細胞における DSB の修復に影響を与えることが示唆されたので、次にその生物学的メカニズムを明らかにすることを目指した。まず、CRISPR/cas9 システムを用いて非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) を定量する方法を開発した。TRE-KRAB-dCas9-IRES-GFP のレンチウイルス感染を行い、dCas9 と統合 DNA 配列 (IRES-GFP) を安定的に発

現させた。また、U6 プロモーターで GFP を標的とした sgRNA のベクターと、HR 修復のために合成した一本鎖 DNA (ssDNA) (ノックインドナー) を同時に dCas9 を安定的に発現する細胞にトランスフェクトした。まず、BUB1B/BUBR1 を過剰発現させた 293T 細胞とそうでない細胞を解析に用いた。GFP と mCherry 陽性細胞のフローサイトメトリーを解析したところ、GFP の減少、mCherry 陽性細胞の増加は、それぞれ変異原性 NHEJ、HR を示すことがわかった。興味深いことに、293T 細胞で BUB1B/BUBR1 を過剰発現させると、親 293T 細胞に比べて mCherry と GFP の両方の陽性細胞の比率が減少することが明らかになった。次に、T24R 細胞において内在性 BUB1B/BUBR1 をノックダウンすると、GFP および mCherry 陽性細胞の比率が変化するかどうかを検討した。BUB1B/BUBR1 をノックダウンしない場合、sgRNA および ssDNA のトランスフェクション後の GFP および mCherry 陽性細胞の比率は、sh-control、BUB1B/BUBR1#1、2 間で同様であり、これは T24R 細胞においてこれらの shRNA 間でトランスフェクト効率が同等であることを示している。注目すべきは、0.15 μ g/ml のドキシサイクリンを添加して shRNA の転写を誘導すると、shBUB1B/BUBR1#1、#2 において GFP 陽性と mCherry 陽性細胞の比率が shControl と比較して増加することが示された点である。これらのデータは、293T 細胞で BUB1B/BUBR1 を過剰発現させた結果と同様に、BUB1B/BUBR1 発現異常の細胞は、DSB に応答して精密 NHEJ や HR ではなく変異原性 NHEJ を優位に利用することを示唆している。

次に、T24R と JMSU1R 細胞における内在性ゲノム部位での DNA 修復過程を調べた。sgRNA のトランスフェクションに応答して、AAVS1 (Chr19) と RBM20 (chr10) の内部コントロール部位 (HEX プローブ) を比較する変異原性 NHEJ (FAM プローブ) によるインデルの絶対数を決定するためにデジタル液滴 PCR が採用された。つまり、CRISPR/cas9 切断部位に FAM プローブを設計し、HEX プローブはベースライン対照として使用する。理論的には、sgRNA を導入しない場合、FAM プローブと HEX プローブが認識する隣接する 2 つのゲノム座のコピー数は同じ (FAM / HEX = 1) であるはずである。もし、切断効率が完全であれば、FAM/HEX 比は DNA 修復の正確さを表すことになり、例えば、全ての DNA 修復が正確であれば、「FAM/HEX = 1」となる。切断効率と正確な DNA 修復の比率は同一ではないが、この実験では、sgRNA 導入後の FAM プローブのカウントに着目し、コントロールの HEX プローブと比較して、変異原性 DNA 修復の絶対数を提供することができる。したがって、FAM 数の減少は、インデルの発生を意味し、 $(1 - \text{FAM}/\text{HEX})$ として計算される変異原性 NHEJ による DNA 修復の割合が得られる。この実験モデルにより、shControl では変異原性 NHEJ が全体の 50%以上を占めるのに対し、BUB1B/BUBR1 の発現をノックダウンすると、T24R 細胞ではインデルの事象が有意に減少することがわかった。同様に、JMSU1R 細胞においても BUB1B/BUBR1 発現のノックダウンにより変異原性 NHEJ の比率が減少することが確認された。BUB1B/BUBR1 による有糸分裂活性の影響を排除するために、2 日間の血清飢餓による G1 期の細胞同期を行い、内因性ゲノム領域を標的とした sgRNA トランスフェクションに対する変異原性 DNA 修復率が、BUB1B/BUBR1 ノックダウン有無による G1 同期で変化するかどうかを開発した ddPCR 実験モデルで検討した。興味深いことに 10%FBS 条件よりも G1 同期条件においてエラープリンの修復率がより多く観察されたが、BUB1B/BUBR1 ノックダウンでは耐性 T24R 細胞の G1 同期にかかわらず同等のエラープリンの修復率が観察された。JMSU1R 細胞でも同様の結果が得られた。これらのデータから、BUB1B/BUBR1 の異常発現は、G2/M チェックポイントにおける BUB1B/BUBR1 の正規の活性とは別に、変異原性 NHEJ 経路を促進することによって DNA 損傷剤に対する耐性を提供していることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uchimoto T, Komura K, Fukuokaya W, Kimura T, Takahashi K, Nishimura K, Nakamori K, Fujiwara Y, Matsunaga T, Tsutsumi T, Tsujino T, Maenosono R, Yoshikawa Y, Taniguchi K, Tanaka T, Uehara H, Ibuki N, Hirano H, Nomi H, Takahara K, Inamoto T, Egawa S, Azuma H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Early Prostate-Specific Antigen (PSA) Change at Four Weeks of the First-Line Treatment Using Abiraterone and Enzalutamide Could Predict Early/Primary Resistance in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 526 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030526	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 該当する

1. 著者名 Uchimoto T, Komura K, Fukuokaya W, Kimura T, Takahashi K, Fujiwara Y, Matsunaga T, Tsutsumi T, Tsujino T, Taniguchi K, Tanaka T, Uehara H, Ibuki N, Hirano H, Nomi H, Takahara K, Inamoto T, Egawa S, Azuma H.	4. 巻 127
2. 論文標題 Risk stratification for the prediction of overall survival could assist treatment decision making at diagnosis of castration resistant prostate cancer: a multicentre collaborative study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 212 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bju.15187	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 該当する

1. 著者名 Matsunaga T, Komura K, Hashimoto T, Muraoka R, Satake N, Tsutsumi T, Tsujino T, Yoshikawa Y, Takai T, Minami K, Taniguchi K, Tanaka T, Uehara H, Hirano H, Nomi H, Ibuki N, Takahara K, Inamoto T, Ohno Y, Azuma H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Adjuvant chemotherapy improves overall survival in patients with localized upper tract urothelial carcinoma harboring pathologic vascular invasion: a propensity score-matched analysis of multi-institutional cohort	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00345-020-03118-x	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 該当する

1. 著者名 Miyake Makito, Marugani Nagaaki, Fujiwara Yuya, Komura Kazumasa, Inamoto Teruo, Azuma Haruhito, Matsumoto Hiroaki, Matsuyama Hideyasu, Fujimoto Kiyohide	4. 巻 10
2. 論文標題 Down-Grading of Ipsilateral Hydronephrosis by Neoadjuvant Chemotherapy Correlates with Favorable Oncological Outcomes in Patients Undergoing Radical Nephroureterectomy for Ureteral Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10010010	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 Tsujino Takuya, Sugito Nobuhiko, Taniguchi Kohei, Honda Ryo, Komura Kazumasa, Yoshikawa Yuki, Takai Tomoaki, Minami Koichiro, Kuranaga Yuki, Shinohara Haruka, Tokumaru Yoshihisa, Heishima Kazuki, Inamoto Teruo, Azuma Haruhito, Akao Yukihiro	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA 143/Musashi 2/ KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2188-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14035.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小村 和正, 稲元 輝生, 東 治人.
2. 発表標題 BU1B/BUBR1異常発現によるMutagenic NHEJとintact ATMの意義
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小村和正、稲元輝生、東 治人。
2. 発表標題 放射線化学療法耐性尿路上皮がんにおけるError-Prone DNA Repairの異常亢進と臨床への意義.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------