

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20456

研究課題名(和文) SWI/SNFクロマチン再構成異常を標的としたATR阻害剤によるがん治療基盤確立

研究課題名(英文) Development of a therapeutic foundation for SWI/SNF chromatin remodeling complex defective cancer by ATR inhibitor

研究代表者

倉島 公憲 (Kurashima, Kiminori)

基礎生物学研究所・幹細胞生物学研究室・特任助教

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)：14種類の肺腺がん細胞に対するATR阻害剤の効果を解析比較した結果、内在性複製ストレスレベルがATR阻害剤感受性と相関することが分かり、さらに高感受性細胞の多くにSWI/SNFクロマチン再構成複合体のサブユニットの一つSMARCA4の欠損が認められた。またその作用点として、SMARCA4が欠損していると(Ⅰ)複製困難領域として知られているヘテロクロマチンが増加することでDNA複製ストレスが生じ、(Ⅱ)reversed forkにおいてヌクレアーゼであるMre11が過剰に働くことで一本鎖DNAが生じる、という2つの異なる理由により相乗的にATR阻害剤に効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSMARCA4欠損がATR阻害剤高感受性のバイオマーカーとなる可能性が示された。近年、発展の目覚ましい分子標的薬によるがん治療は特定のdriver遺伝子を標的としているが、本研究で治療可能性を示したものはがん細胞が持つ特性であるDNA複製ストレスを標的とするため、特定の遺伝子にとらわれず様々ながんへの適用が期待される。また、本来細胞にとって生存に有利に働くとされるやATRが、がん細胞の生存にも寄与する、さらにはATRが機能することで高い複製ストレス下において突然変異を高い頻度で起こしながら生存する可能性が示され、がんの発生、進行悪性化のメカニズム解明に迫る知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ATR is a master kinase regulating DNA replication stress (RS) responses. ATR inhibitor (ATRi) is supposed to be effective to cancer cells suffering from higher RS. Here, we report that SMARCA4, a catalytic subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complex, deficient lung adenocarcinoma (LADC) cells show a higher intrinsic RS and hence are sensitive to ATRi. Loss of SMARCA4 confers susceptibility to ATRi, both by increasing heterochromatin-associated RS and by allowing Mre11 to destabilize reversed forks. These two mechanisms synergistically increase susceptibility of SMARCA4-deficient LADC cells to ATRi. These results provide a preclinical basis for assessing SMARCA4 defects as a biomarker of ATRi efficacy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA複製ストレス ATR SMARCA4 バイオマーカー DNA fiber がん ヘテロクロマチン 多能性幹細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

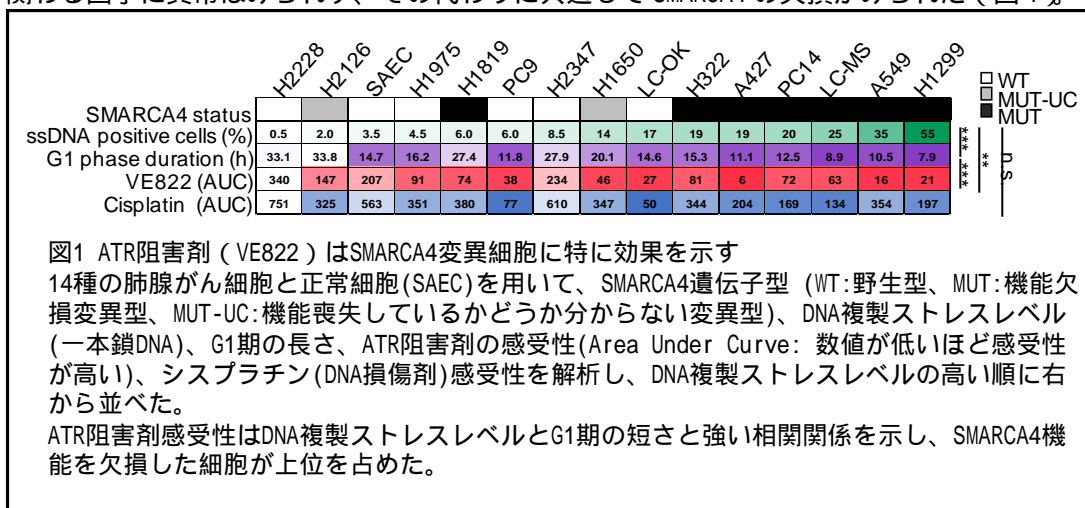
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年 K-ras や c-Myc などのがん遺伝子の活性化が異常な DNA 複製を引き起こすことで、DNA 複製ストレスを誘発し、ゲノム不安定性を介してがんの進行悪性化に関与することが報告されている (Halazonetis et al. Ann. Rev. Pathol., 2015)。ATR キナーゼは DNA 複製ストレスにより生じる一本鎖 DNA に応答して活性化し、様々な基質をリン酸化することでゲノム安定性の維持に寄与する。そのため ATR は腫瘍抑制因子であると考えられてきた。しかしながらこの考えに当てはまらない現象も報告されている。例えば、乳がんでは ATR タンパク発現の高い患者は低い患者と比べて予後が悪い (Abdel-Fatah et al. Mol. Oncol., 2015)。また、マウスモデルにおいて ATR 発現を低く制限した場合にはがん遺伝子誘導性の腫瘍形成が抑制される (Schoppy et al. J. Clin. Inv., 2012)。近年のがんゲノム解析においても ATR の突然変異はまれでありむしろ増幅がみられることが示されている。以上のことから、がん細胞が ATR に依存して生存することが予想され、ATR 阻害剤ががん細胞特異的に作用する可能性を示唆する。ATR 阻害剤の前臨床試験では単剤または DNA 損傷剤との併用において、がん細胞により強い効果を示すことが報告され、いくつかの第 1 フェーズ臨床試験が進行中である。しかしながらその作用機序など分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

研究代表者らはオミックス情報の付随した肺腺がん細胞 (Suzuki et al. Nucleic Acids Res., 2014) から、異なる driver 遺伝子や driver 遺伝子の不明な細胞が含まれるよう 14 種類選択し ATR 阻害剤の効果を調べた。その結果、がん細胞においても ATR 阻害剤の感受性は高いものから低いものまで様々であった。それぞれの細胞の内在性 DNA 複製ストレスを露出した一本鎖 DNA を指標に計測した結果、内在性 DNA 複製ストレスレベルが ATR 阻害剤感受性と強い相関関係を示した。オミックス情報を解析した結果、ATR 阻害剤高感受性細胞では既知の ATR 阻害剤感受性に関わる因子に異常はみられず、その代わりに共通して SMARCA4 の欠損がみられた (図 1)。



SMARCA4 は ATP 加水分解活性とヘリカーゼ活性を示す SWI/SNF クロマチン再構成複合体のコアサブユニットである。そこで本研究では ATR 阻害剤による SWI/SNF 異常がん細胞特異的な殺細胞効果について、新規バイオマーカー候補である SMARCA4 欠損に着目し以下の二つを目標とした。

- (1) SMARCA4 発現の有無が ATR 阻害剤感受性におよぼす影響を明らかにする。
- (2) がん細胞における ATR 阻害剤の作用点の分子基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

14 種類の肺腺がん細胞と正常細胞として肺腺がんの起源と考えられている SAEC を用いて以下の実験を行った。ATR 阻害剤として VE-822 を用いた。

- (1) ATR 阻害剤感受性の高い細胞において SMARCA4 の欠損が多くみられたことから、SMARCA4 を野生型で発現している細胞を用いて siRNA により SMARCA4 発現を抑制する。これとは逆に SMARCA4 欠損細胞において SMARCA4 を強制発現する細胞を作成する。これらの細胞を用いて ATR 阻害剤に対する感受性や露出した一本鎖 DNA を指標に内因性複製ストレスレベルを解析する。
- (2) チミジンアナログである IdU, CIdU を連続的に取り込ませ複製中の DNA を可視化する DNA fiber 法により、複製速度や複製起点活性化の頻度、複製フォーク進行の遅延や停止を測定する。SMARCA4 異常がこれらの複製ダイナミクスに与える影響を解析する。
- (3) 複製フォークが停止した後、逆方向に進む Fork reversal は Mre11ヌクレアーゼにより削られ一本鎖 DNA を生じさせる。この Fork reversal により生じる一本鎖 DNA が ATR 阻害剤により露出する一本鎖 DNA の原因なのかを、また SMARCA4 異常により増加するかどうかを Mre11 阻害剤を用いて解析する。
- (4) SMARCA4 異常により DNA 複製ストレスレベルが生じる原因として、SMARCA4 がクロマチンリモデラーとして機能することから、クロマチン構造異常によるものと予想し、ヘテロクロマチンマーカーを用いた免疫染色やクロマチン構造を変化させる薬剤を用いて、内在性複製ストレスレベルに与える影響を解析する。

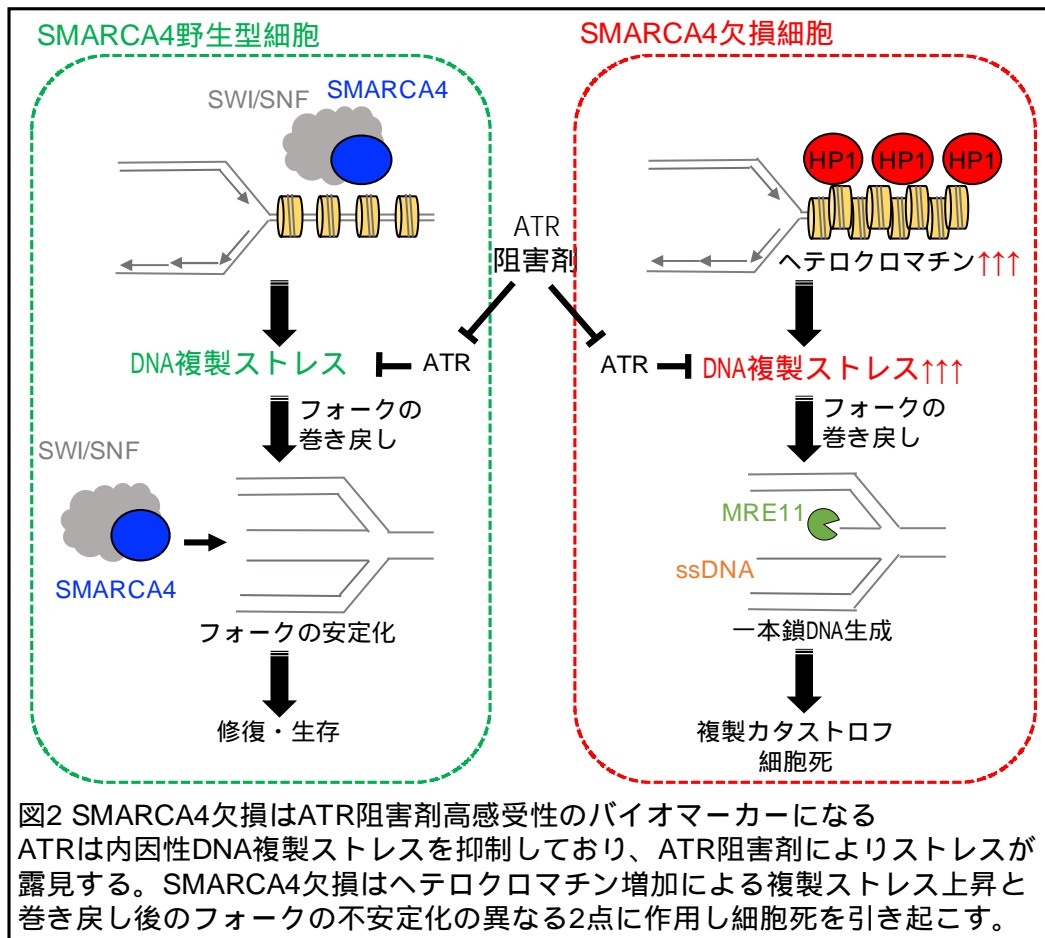
### 4. 研究成果

- (1) SMARCA4 を野生型で発現している H1975, H2228, PC9 細胞を用いて siRNA により SMARCA4 発現を抑制した。その結果、ATR 阻害剤に対する感受性や露出した一本鎖 DNA の増加がみられた。これとは逆に SMARCA4 欠損細胞である A427, A549, H1229 において SMARCA4 を強制発現する細胞を作成したところ、ATR 阻害剤感受性や露出した一本鎖 DNA が減少した。以上のことから SMARCA4 が無い事により内在性 DNA 複製レベルが上昇し ATR 阻害剤に対して高感受性を示すことが示唆された。一方、正常細胞である SAEC では SMARCA4 ノックダウンの影響はみられなかった。
- (2) DNA fiber 法により複製ダイナミクスを解析した結果、複製速度に関してはそれぞれの細胞で様々であったが、より複製フォークの停止/遅延を反映するとされる複製フォーク進行の非対称性を測定した結果、SMARCA4 を野生型で発現している細胞は欠損細胞に比べ非対称性が低くみられた。同一細胞において SMARCA4 の有無による影響をみたところ、SMARCA4 が有ると速くなり非対称性は低く、SMARCA4 が無いと進行速度は遅くなり、非対称性は増加する傾向が得られた。SAEC ではフォーク非対称性は低く保たれており、SMARCA4 ノックダウンによる影響もみられなかった。

(3)複製フォークが停止した後、逆方向に進む Fork reversal 構造を形成させる DNA トランスロケース SMARCAL1 の発現抑制は SMARCA4 欠損細胞の露出一本鎖 DNA 量を減少させたことから、Fork reversal 構造が ATR 阻害剤による一本鎖 DNA の生成に関わることが示唆された。さらに Mre11 阻害剤によっても一本鎖 DNA が減少したことから、Fork reversal 構造のフォーク安定性が SMARCA4 欠損細胞では低いことが示唆された。

(4)ヘテロクロマチンマーカである HP1 やヒストン H3K9me3 抗体を用いた免疫染色の結果、SMARCA4 欠損細胞における SMARCA4 発現はそれらのシグナルを減少させ、SMARCA4 発現細胞における SMARCA4 発現抑制はシグナルの増加を誘導した。これらのことから SMARCA4 欠損細胞ではヘテロクロマチンが多く形成されており、複製困難領域と考えられるこれらの領域の増加が DNA 複製ストレスの原因となる可能性が示された。そこでクロマチン構造を緩ませることが知られている DNA intercalator である Chloroquine やヒストンメチル化阻害剤の GSK-126 処理をしたところ、SMARCA4 欠損細胞において ATR 阻害剤誘導性的一本鎖 DNA 生成が抑制され、SMARCA4 欠損によるクロマチン構造異常が複製ストレスの原因の一つであることが示唆された

以上の結果から、SMARCA4 が欠損していると(I)複製困難領域として知られているヘテロクロマチンが増加することで DNA 複製ストレスが生じ、(II)Reversed fork においてヌクレアーゼである Mre11 が過剰に働くことで一本鎖 DNA が生じる、という2つの異なる理由により相乗的に ATR 阻害剤に効果を示し、SMARCA4 欠損が ATR 阻害剤高感受性のバイオマーカーとなる可能性が示された(図2)。



近年、発展の目覚ましい分子標的薬によるがん治療は特定の driver 遺伝子を標的としているが、本研究で治療可能性を示したものはがん細胞が持つ特性である DNA 複製ストレスを標的とするため、特定の遺伝子にとらわれず様々ながんへの適用が期待される。また、本研究は、本来細胞にとって生存に有利に働くとされるや ATR が、がん細胞の生存にも寄与すること、さらには ATR が機能することで、高い複製ストレス下において突然変異を高い頻度で起こしながら生存する可能性が示されたことから、がんの発生、進行悪性化のメカニズム解明に迫る知見であると考えられる。

また、これまでがん細胞を中心に DNA 複製ストレス応答について研究を行ってきたが、本研究期間の途中における所属機関の変更に伴い、幹細胞における DNA 複製ストレスについて研究を開始した。多能性幹細胞であるマウス ES 細胞は分化細胞よりも極端に G1 期が短く、DNA 複製速度が低下しており、DNA 複製ストレスレベルが高いことが示唆されている。また、複製起点の活性化頻度も高くがん細胞とよく似た複製様式を採用している。一方、ES 細胞ではゲノム安定性は高く保たれており、ゲノム不安定性の高いがん細胞とは似て非なる DNA 複製様式を持つことが予想される。ES 細胞に ATR 阻害剤を処理することにより分化細胞と比して強く細胞死が誘導され、その際、複製フォークの非対称な進行が増加することが分かった。以上のことから、ATR 阻害剤を用いたがん治療、特に ES 細胞と遺伝子発現プロファイルが似ているとされるがん幹細胞への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurashima Kiminori, Kashiwagi Hideto, Shimomura Iwao, Suzuki Ayako, Takeshita Fumitaka, Mazevet Marianne, Harata Masahiko, Yamashita Takayuki, Yamamoto Yusuke, Kohno Takashi, Shiotani Bunsyo	4. 巻 2
2. 論文標題 SMARCA4 deficiency-associated heterochromatin induces intrinsic DNA replication stress and susceptibility to ATR inhibition in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 zcaa005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/narcan/zcaa005	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉島 公憲、河野 隆志、塩谷 文章
2. 発表標題 SMARCA4欠損はDNA複製ストレスの上昇と複製フォークの不安定化によりATR 阻害剤感受性を高める
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉島 公憲、柏木 秀人、山下 孝之、河野 隆志、塩谷 文章
2. 発表標題 SMARCA4欠損は内在性DNA複製ストレスの増加とreversed forkの不安定化を誘導しATR阻害剤感受性を高める
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉島 公憲、上川 泰直、松本 陽乃、坪内 知美
2. 発表標題 多能性幹細胞特異的DNA複製制御 によるゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉島 公憲、上川 泰直、松本 陽乃、坪内 知美
2. 発表標題 マウスES細胞におけるDNA複製制御
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------