

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22561

研究課題名(和文) BRCA1欠損乳がん細胞においてエストロゲン曝露時に生じるゲノム切断の位置の決定

研究課題名(英文) Genome-wide identification of double-strand break sites induced by activated estrogen receptors and Topoisomerase IIβ

研究代表者

武田 俊一 (Takeda, Shunichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60188191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAの2重鎖切断を修復する経路、相同組換え(HR)は、すべての増殖細胞において機能する。HR因子、BRCA2の機能低下がなぜ乳腺と卵巣のみ発癌を大きく増加させるか不明である。これらの組織の上皮細胞はエストロゲンが強く増殖を刺激する。本研究の目的は、この臓器選択的な発癌機序を解明することであり、研究成果は、その機序を解明したことである。BRCA2が機能低下すると、エストロゲンが細胞増殖をより強く刺激した。その原因は、エストロゲンによるc-MYC発現誘導が増強することであった。増強の原因は、c-MYC 遺伝子のエンハンサーに発生した切断が修復されないことである事を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは、日本も含め東アジア全体で患者数が増加している。乳癌の問題点は、若い患者が多いことにある。BRCA1やBRCA2の変異のキャリアは乳癌の発症率が増加する(HBOC症候群)。BRCA1やBRCA2は、腫瘍抑制遺伝子であるにもかかわらず、なぜキャリアで発症率が増加するのか不明である。この増加の原因は、キャリアの乳腺上皮がごくまれにloss of heterozygosityが起こるや否や、BRCA1やBRCA2の欠損によって一気に癌化が進むと推定されている。この「一気に癌化が進む」分子機構が解明できれば、HBOC症候群の予防法開発と治療法開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：BRCA2 is a key player in homologous DNA recombination (HR), repairing double-strand breaks (DSBs) only at S/G2 in all cycling cells. It is unclear why loss of BRCA2 leads to an increase in carcinogenesis only in the mammary gland and ovary in HBOC syndrome. Our working hypothesis is that (i) TOP2 generates DSBs at E2-dependent enhancers during treatment with E2, (ii) BRCA2 play a crucial role in repairing TOP2-dependent DSBs independent of its function in HR, (iii) unrepaired breakage dysregulates transcriptional response to E2 in many genes, (iv) resulting overexpression of c-Myc oncogene in response to E2 explains oncogenesis in estrogen-regulated tissues, which explains the tissue specificity of HBOC. We have shown that (ii), (iii), and (iv) hypotheses are correct by analyzing the repair of TOP2-dependent DSBs in BRCA2-depleted G1 cells, transcriptome during response to E2, and c-Myc expression in BRCA2-deficient mice in cooperation with the Netherland Cancer Center, respectively.

研究分野：分子生物学

キーワード：BRCA1 HBOC症候群 乳がん 卵巣がん DNA Topoisomerase IIβ エストロゲン エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) HBOC 症候群の原因遺伝子である BRCA1 や BRCA2 は、S/G2 期でのみ機能する相同組換え (HR) で機能すると考えられてきた。一方、我々は、BRCA1 が G1 期においても HR とは独立してゲノム切断の修復に関与することを発見した (*PNAS USA* 2018、BRCA2 は未発表データ)。BRCA1 は、G1 期において DNA トポイソメラーゼ 2 (Top2) が作る切断を修復することを見つけたのである。

DNA トポイソメラーゼ 2 (Top2) についての既知の知見

- 1-1. Top2 は、触媒反応中に一過性にゲノム切断する (図 1、①)。
- 1-2. Top2 は 2 種類 (Top2 α と Top2 β) 存在し、両者は重複した機能を持つ
- 1-3. Top2 α は休止期にはほとんど発現しない。Top2 α は細胞増殖に必須。
- 1-4. Top2 β は、休止期細胞も含む全ての細胞では発現。
- 1-5. Top2 α と Top2 β は、転写の制御や転写の伸長反応に関与。

Top2 について我々の発見

- 2-1. Top2 α と Top2 β は、頻回に触媒反応に失敗し (図 1、③)、大量の難治性切断 (Top2 が切断端に共有結合した DNA 切断-Top2 複合体、図 1、④) を自然発生させる (*Mol Cell* 2016, PMID: 27912094)
- 2-2. BRCA1/2 は、この難治性切断の修復を促進 (図 1、⑤) (*PNAS USA* 2018、BRCA2 は未発表データ)
- 2-3. 生理濃度のエストロゲンでヒト乳がん MCF-7 細胞を刺激した時に、BRCA1 が欠損すると、病的 DNA 切断-Top2 β 複合体が大量に蓄積 (*PNAS USA* 2018)。
- 2-4. BRCA1 が機能低下すると、MCF-7 細胞においてエストロゲン刺激後の転写プロファイルが変化する。エストロゲン刺激後の、*c-MYC* 発がん遺伝子の発現誘導が、BRCA1 が機能低下すると、約 3 倍高まる (未発表データ)。

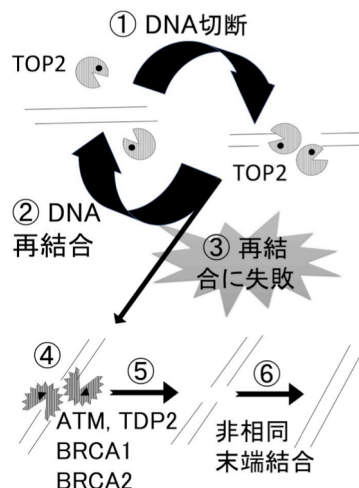


図1 Topoisomerase II (TOP2) は DNA の切断 (①) と再結合 (②) を高速で繰返す。切断部位において別の DNA 鎖を通過させ、DNA 間のもつれを解消する。TOP2 が再結合に失敗する (③) と、再結合を非同末端結合経路がする。この再結合の前に ATM, BRCA1, BRCA2 が切断端から TOP2 を剥取る (応募者の発見)。

(2) 本研究を遂行中に他のグループが新たに解明したこと

我々は、エストロゲン曝露時の Top2 触媒のホットスポットを、エンハンサーと仮定した。エンハンサーについて 2018 年から 2020 年にかけて新たに解明された点を記載する。エンハンサーとは、同一の DNA 上に乗ったプロモーターを活性化させる数百塩基からなる DNA 配列のことである (図 2)。1 つの遺伝子に対して複数個のエンハンサーがある。ホルモンなど細胞外の刺激に反応して一過性に活性化されるエンハンサーに関しては、事実上何もわかっていない。一過性に活性化されるタイプのエンハンサーを同定する手法が 2019 年に新規に開発された (*Nature Genet* 2019, PMID:31477927)。この手法 (NET-CAGE 法) は、活性化されたエンハンサーのみが発現する、エンハンサー RNA (eRNA) 超高感度に検出する (図 3)。NET-CAGE 法は、ホルモン刺激時に一過性に活性化されるエンハンサーを網羅的に検出できる唯一の手法である。我々はこの方法を、エストロゲンで刺激された細胞において一過性に発現する eRNA の検出に利用した。

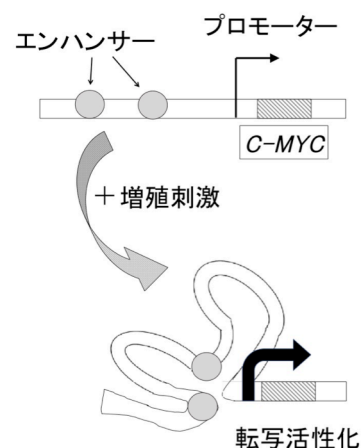


図2 増殖刺激による遺伝子発現誘導時には、エンハンサー配列が転写開始点上流 (プロモーター) に近接し、転写 (右向き矢印) が活性化。

(3) 研究を遂行中に我々が新たに解明したこと

BRCA1 が欠損すると、病的 DNA 切断-Top2 β 複合体が大量に蓄積するが、この DNA 損傷を BRCA1 とともに再結合する酵素群を網羅的に解析した。この成果を *iScience* 2020 に発表した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BRCA1 欠損乳がん細胞においてエストロゲンが Top2 を活性化してゲノム切断する部位を 1000 箇所以上 Deep Sequence にて同定する。そしてエストロゲン受容体の標的遺伝子、*C-MYC* 遺伝子に的を絞り、乳腺選択的な発がん機序を解明する。

3. 研究の方法

ゲノム切断する部位を決定する方法は以下の 2 つである。1 つ目はうまくいかなかったが、2 つ目の方法によってエストロゲン依存的エンハンサーが切断のホットスポットであることを示すデータを得た。

1 つ目の決定手法は、減数分裂相同組換えが開始されるゲノム切断部位を 10,000 カ所以上決定した、Scott Keeney 博士 (NY メモリアルスローンケッタリング癌研究病院 (MSKCC)) が開発した手法を応用する。減数分裂開始のゲノム切断は、Spo11 と呼ばれる Top2 類似酵素が作る。切断部位の同定手法は、Spo11 認識抗体を使って DNA 切断-Spo11 複合体を免疫沈降・精製した後に、Spo11 に共有結合している DNA 鎖を Deep Sequence にかける手法である。Scott Keeney ラボの山田博士が、MSKCC と申請者のラボの両方に所属するクロスアポイント助教に着任した。彼らとの共同研究で、本研究の目的を達成する。

2 つ目の決定手法は、エストロゲンで刺激された細胞において一過性に発現する eRNA の発現 キネティクスを野生型 MCF-7 細胞とエストロゲン依存的ゲノム切断が効率よく修復できないミュータント細胞で比較することである。ミュータント細胞として DNA-PKcs 遺伝子破壊 MCF-7 細胞を選んだ。非相同末端結合は G1 期に機能する唯一のゲノム切断修復経路である。DNA-PKcs は非相同末端結合に必須である。野生型と DNA-PKcs 遺伝子破壊 MCF-7 細胞 をそれぞれ 1 日間血清飢餓状態におき G1 期に同調した後に、エストロゲンを加える前とエストロゲンを加えて 30 分と 60 分後のナッセント RNA を抽出し、Deep Seq にかけた。

4. 研究成果

- (1) 我々は、非相同末端結合 (DNA-PKcs) が欠損すると、千以上のエストロゲン受容体 (ER) 標的遺伝子のエストロゲン依存的発現が異常になり、多くのエンハンサーから作られる eRNA の発現が E2 曝露時に異常に増加することを見出した。以上の結果から ER と Top2 の両方に依存するゲノム切断のホットスポットはエンハンサーであり、切断がすぐに再結合しないとホルモン応答時の転写に異常が起こると結論した。
- (2) エストロゲンへの転写応答異常の 1 つとして、*c-MYC* の高発現をマウス (DNA-PKcs 欠損マウスと TDP2 欠損マウス) で確認した。TDP2 は BRCA1 と並行して病的 DNA 切断-Top2β 複合体を修復する酵素である。
- (3) MCF-7 細胞をエストロゲン刺激後に、*c-MYC* 発がん遺伝子のスーパーエンハンサー領域が切断されることを見つけた (pH2AX ChIP 法による、未発表データ)。スーパーエンハンサーのなかで ER 結合部位を含むエンハンサーは、*c-MYC* プロモーターから 67 kb 離れたところに存在するエンハンサーである。このエンハンサーでエストロゲン依存的に H2AX リン酸化抗原が出現することを確認した。この抗原の出現は、非相同末端結合欠損細胞ではさらに高まった。
- (4) このエンハンサーを MCF-7 細胞において CRISPR/Cas9 によって切断すると、エストロゲン刺激後の、*c-MYC* 発がん遺伝子の発現誘導が数倍高まった (未発表データ)。

(5) 結論

エンハンサーにゲノム切断が起こると、ホルモンへの転写応答が狂うという新しい発癌機構を提唱できた。

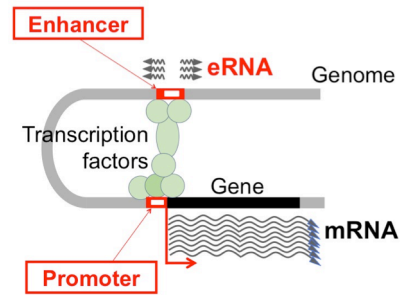


図3 エンハンサーの活性は eRNA 発現量を測定して解析できる。活性化されたエンハンサーからは両向きの転写が起こり、eRNA と呼ばれる。eRNA は、転写開始点の 5'末 RNA のみをトランスクリプトーム解析する CAGE 法でしか検出できない。NET-CAGE は、半減期が 1 分しかない eRNA (mRNA は 60 分) を検出する為、細胞質に貯まる mRNA を除去し、RNA ポリメラーゼ II と複合体を作る RNA のみを精製し Deep Seq する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Wang J, Oh YT, Li Z, Dou J, Tang S, Wang X, Wang H, Takeda S, Wang Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 RAD52 Adjusts Repair of Single Strand Breaks via Reducing DNA Damage-Promoted XRCC1/LIG3 a Colocalization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 108625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108625	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 Moribe F, Nishikori M, Takashima T, Taniyama D, Onishi N, Arima H, Sasanuma H, Akagawa R, Elloumi F, Takeda S, Pommier Y, Morii E, Takaori-Kondo A, Murai J.	4. 巻 16
2. 論文標題 Epigenetic suppression of SLFN11 in germinal center B-cells during B-cell development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0237554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237554	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 Takeishi A, Kogashi H, Odagiri M, Sasanuma H, Takeda S, Yasui M, Honma M, Suzuki T, Kamiya H, Sugasawa K, Ura K, Sassa A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterases are involved in mutagenic events at a ribonucleotide embedded into DNA in human cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0244790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244790	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 Rahman MM, Mohiuddin M, Shamima Keka I, Yamada K, Tsuda M, Sasanuma H, Andreani J, Guerois R, Borde V, Charbonnier JB, Takeda S.	4. 巻 295
2. 論文標題 Genetic Evidence for the Involvement of Mismatch Repair Proteins, PMS2 and MLH3, in a Late Step of Homologous Recombination.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 17460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013521	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 Nakano T, Shoulkamy MI, Tsuda M, Sasanuma H, Hirota K, Takata M, Masunaga SI, Takeda S, Ide H, Bessho T, Tano K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Participation of TDP1 in the Repair of Formaldehyde-Induced DNA-protein Cross-Links in Chicken DT40 Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0234859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234859	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 Saha LK, Wakasugi M, Akter S, Prasad R, Wilson SH, Shimizu N, Sasanuma H, Huang SN, Agama K, Pommier Y, Matsunaga T, Hirota K, Iwai S, Nakazawa Y, Ogi T, Takeda S.	4. 巻 117
2. 論文標題 Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER deficient cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 14412-14420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1920165117	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

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Rahman MM, Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Yamada S, Nussenzweig A, Tanaka H, Takeda S
2. 発表標題 BRCA1 and BRCA2 protect transcriptional response to estrogens from abortive catalysis by Topoisomerase II
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference "The Genetic Recombination and Genome Rearrangements Conference" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda S
2. 発表標題 BRCA1 and BRCA2 protect transcriptional response to estrogens from abortive catalysis by Topoisomerase II
3. 学会等名 2019 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda S
2. 発表標題 BRCA1 and BRCA2 protect transcriptional response to estrogens from abortive catalysis by Topoisomerase II
3. 学会等名 The 10th International Symposium on DNA Damage Response & Human Disease, isDDRHD-2019 (招待講演) (国際学会)
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		
米国	National Institutes of Health	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	