様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ９ 月 １７ 日現在

機関番号：８２５０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１２１７８

研究課題名（和文）エピゲノム修飾制御による放射線応答の経路選択

研究課題名（英文）Pathway Selection of Radiation Response by Regulation of Epigenomic Modification

研究代表者
中島　菜花子（Nakajima, Nakako）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門量子医科学研究所・研究員

研究者番号：５０４０２８６３

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）：本研究ではクロマチン構造を制御するヒストン修飾酵素の一つであるH3K36メチル化酵素NSD2の欠損細胞を作成し、NSD2のDNA損傷応答に対する影響を解析した。NSD2欠損はＸ線に対する生存率・増殖抑制に影響しなかった。DNA損傷誘導性の抗がん剤および紫外線照射に対してNSD2欠損細胞は感受性が高くなった。抗がん剤の効果を高めるタンパクSLFN11の発現がNSD2欠損細胞内で高くなった。このことから、NSD2はSLFN11発現を制御することによって、DNA損傷誘導性の細胞死を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ヒストンH3K36メチル化は転写活性のあるゲノム領域に集積するヒストン修飾であるにも関わらず、単にヒストンH3K36メチル化酵素を欠損させても遺伝子発現に顕著な変化が認められず、機能が判然としないエピゲノム修飾であった。本研究は遺伝子発現解析を通してヒストンH3K36メチル化酵素を介した新たな放射線応答制御の発見である。また、ヒストンH3K36メチル化酵素遺伝子の変異はがん細胞においてしばしば見出されており、本研究によってエピゲノム制御異常による細胞がん化の仕組みが明らかになり、分子標的薬の重要な基盤となると期待される。

研究成果の概要（英文）：The DNA repair pathway that determines radiosensitivity is affected not only by DNA repair factors, but also by the chromatin structure of the DNA damaged area.In this study, to assess the molecular mechanism of the histone-modifying enzyme H3K36 methylase NSD2 that regulates chromatin structure in DNA damage response, NSD2-deficient cells were created and their effects on DNA damage responses were analyzed. NSD2 deficiency did not affect survival or growth suppression against X-rays. NSD2-deficient cells were more susceptible to DNA-damaging anticancer drugs and ultraviolet irradiation. Expression of the protein SLFN11, which enhances the effects of anticancer drugs, was increased in NSD2-deficient cells. These results suggest that NSD2 regulates DNA damage-induced cell death by regulating SLFN11 expression.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：がん治療　DNA修復　エピジェネティクス　ヒストン修飾酵素　DNA損傷応答

※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（共通）

１．研究開始当初の背景

DNA 修復機構は、放射線感受性を決定づけることで放射線治療成績に大きく影響する。また、DNA 修復因子の先天性遺伝子欠損は家族性がんの原因であることからも明らかなように、DNA 修復経路の異常は遺伝子不安定性・発がんにつながるため、DNA 修復機構は古くから世界的に広く研究され、多くの報告がある。細胞にとって最も重篤な損傷である DNA 二重鎖切断（DSB）は、相同末端組換え(HR)と非相同末端結合（NHEJ）と呼ばれる二つの主要な経路によって修復される。二つの経路選択は、細胞周期、DNA 損傷の種類によって決定されていることが報告されてきた。さらに DNA 損傷部位のヒストン構造が DNA 修復経路選択に影響していることが明らかになりつつある。DNA は細胞核内で主に二重鎖で存在し、ヒストンタンパクに二重に巻き付いている。DNA 合成や遺伝子転写活性部位では、DNA が DNA 合成因子・転写因子等に結合しやすくするために、ヒストン同士の結合が弛緩し、DNA が露出される。このヒストン同士の凝集・弛緩を制御しているのがヒストン修飾酵素であり、遺伝子発現制御の多くが、ヒストン修飾酵素によって制御されている（図１）。DNA 修復においても、DNA 修復因子が DNA 損傷部位に結合するため、ヒストン修復酵素が関わっていることが多く報告されている。

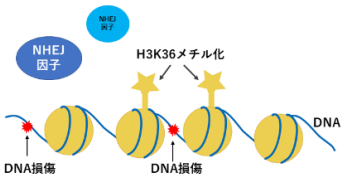

図1. DNA損傷部位のH3K36のメチル化とNHEJ因子の関連性

２．研究の目的

ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基(ヒストン H3K36)のメチル化は転写活性領域に分布し、転写活性領域のマーカーとして適している。ヒストン H3K36 メチル化は、酵母では唯一 RNA ポリメラーゼ結合(SRI)ドメインを有した Set2 によって担われているが、マウスやヒトでは少なくとも5種類の Set2 のメチル化酵素活性 SET ドメインを高度に保存したタンパク質が存在する（図 2）。近年、特定の H3K36 メチル化酵素 NSD2 が DNA 二本鎖切断(DSB)修復を促進するとの報告がなされているがその分子機構は未解明である。本研究では DNA 修復経路における NSD2 の分子機能を明らかにするため、NSD2 欠損細胞を作製し、DNA 損傷応答への影響を解析した。

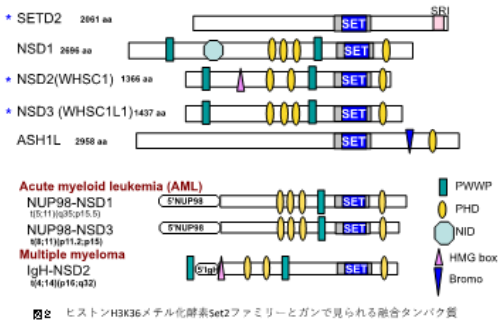

図2　ヒストンH3K36メチル化酵素Set2ファミリーとガンで見られる融合タンパク質

３．研究の方法

ヒト由来 B 細胞白血病細胞株 Nalm6、ヒトリンパ球芽細胞 TK6 およびヒト由来腫細胞株 U2-OS の、NSD2 遺伝子を Crispr/Cas9 システムを用いたゲノム編集によってノックアウトし、NDS2 欠損細胞を作製した（図3）。欠損細胞のヒストンのメチル化レベルおよびタンパク発現は抗 H3K36me2 抗体、抗 SLFN11 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。NDS2 野生型

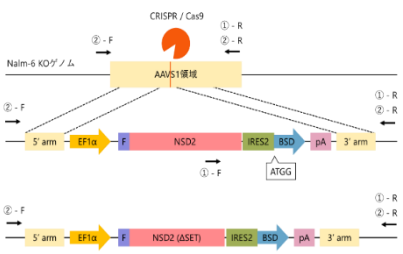

図3.NSD2ノックアウト

細胞株、および欠損細胞株の DNA 損傷に対する感受性を評価するため、培養細胞に抗がん剤、UV、X線を照射し、コロニー形成法により生存率を計測しまたMTT法により細胞増殖能を計測した。NSD2 の DNA 損傷部位への核内局在を観察するため、UVA レーザーを照射し、免疫蛍光染色によって DNA 損傷マーカー（53BP1）と NSD2 の共局在を蛍光顕微鏡下で観察した。

４．研究成果

Nalm6-NSD2、TK6-NSD2 欠損細胞は、H3K36me2 と H3K36me3 のメチル化レベルの低下を認めた（図４）。U2OS-NSD2 欠損細胞はメチル化レベルの低下が認められなかった。NSD2 欠損細胞株は細胞増殖速度が低下した。しかし、X線照射後の生存率には NSD2 欠損は影響しなかった(図 5)。一方で紫外線と DNA 損傷誘導性の抗がん剤において、感受性が増加した（図 5）。NSD2 の DNA2 重鎖切断部位への集積を免疫蛍光染色法によって解析したが、集積は認められなかった。I-SceI 誘導性 DNA 二重鎖切断の修復レポーターアッセイにおいては、NSD2 過剰発現細胞において、非相同末端結合修復効率が増加し、相同組み換え修復効率が抑制された。また、抗がん剤の効果を高めるタンパク SLFN11 の細胞内発現が NSD2 欠損細胞において増加を認めた。これらのことから、NSD2 は SLFN11 の発現を制御することによって、DNA 損傷誘導性の細胞死を調節していることが示唆された。

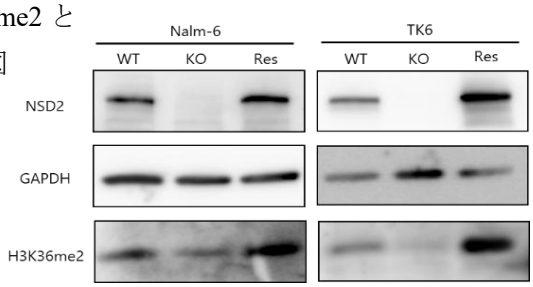

図４．H3K36 のメチル化レベル

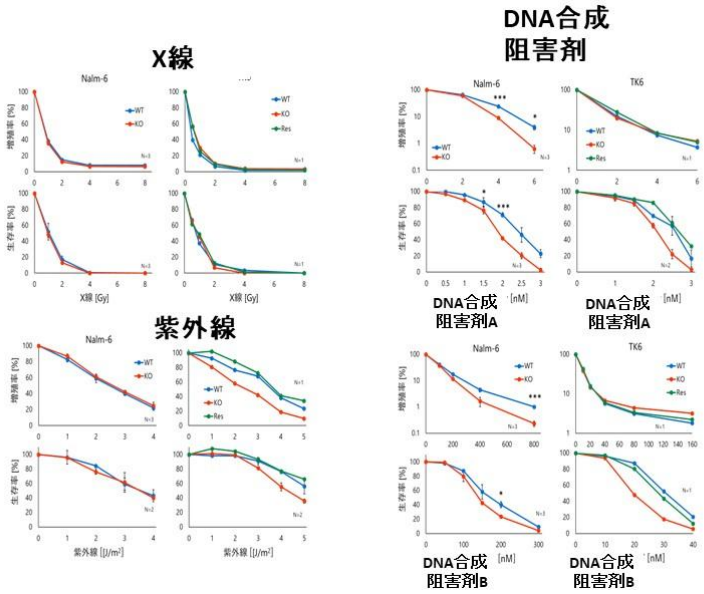

図５．生存率および増殖速度

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　0件）

１．著者名 Iwasaki Koh、Tojo Akari、Kobayashi Haruka、Shimizu Kai、Kamimura Yoshitaka、Horikoshi Yasunori、Fukuto Atsuhiko、Sun Jiying、Yasui Manabu、Honma Masamitsu、Okabe Atsushi、Fujiki Ryoji、Nakajima Nakako Izumi、Kaneda Atsushi、Tashiro Satoshi、Sassa Akira、Ura Kiyoe	４．巻 29
２．論文標題 Dose‐dependent effects of histone methyltransferase NSD2 on site‐specific double‐strand break repair	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Genes to Cells	６．最初と最後の頁 951～965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13156	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0件

〔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
研究分担者	浦　聖恵 (Ura Kiyoe) (80289363)	千葉大学・大学院理学研究院・教授 (12501)	

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