

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609  
研究種目：挑戦的研究(萌芽)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K21410  
研究課題名(和文) 生体ストレスによる発がん誘導の新規モデルの検証

研究課題名(英文) Carcinogenesis induced by biological stresses

## 研究代表者

正井 久雄 (MASAI, Hisao)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・所長

研究者番号：40229349

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)：種々の細胞ストレス(高温、酸化、ヒ酸塩、浸透圧、低酸素、LPSなど)は、複製ストレス応答経路を活性化する。複製を阻害するヒドロキシ尿素と同様に、ヒ素塩、高温、過酸化水素は、DNA複製を強く阻害した。他のストレスは、DNA複製を顕著に阻害しなかったが、いずれもChk1を活性化し、DNA損傷を誘導した。さらに、一般にS期におけるChk1活性化はClaspinに強く依存したが、G1期における活性化のClaspin依存性は低かった。又、細胞ストレスに対する統合的な応答経路に關与するGCN2、HRIキナーゼが高温におけるChk1活性化に必要とされることが明らかとなった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスは、身体の機能に大きな影響を与える。一方、複製ストレスは、ゲノム不安定性の誘導を介して発がんの究極的な原因となる。細胞は、それを取りまく環境の変化(温度変化、酸素レベルの変動、細菌感染、酸化ストレスなど)にตอบสนองして、種々のシグナル経路を発動し、適応を図る。本研究成果では、環境ストレスと複製ストレスのcross talkの存在を証明し、生体ストレスの蓄積が、発がんなどの疾患に至る分子経路を明らかにした。これらの発見は、人の発がんの予防のための新たな方策を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Various biological stresses activate replication checkpoint. Some (high temperature, oxidative stress and arsenate) inhibit DNA replication, while others activate Chk1 without affecting replication. They activate Chk1 both in G1 and S phases in Claspin-independent and -dependent manners, respectively. Furthermore, GCN2, HRI kinases involved in Integrated stress response pathway are required for stress-induced Chk1 activation. These results suggest cross talks between replication checkpoint and stress-induced responses, pointing to a potential mechanism whereby biological stresses may induce genomic instability.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：熱ショック 酸化ストレス 浸透圧ストレス 栄養ストレス Claspin Chk1 DNA複製チェックポイント 統合的ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、ゲノム変化の蓄積により引き起こされる。その要因の2/3はDNA複製の過程で起こることが、大規模な疫学的研究から明らかになっている ( Science, 347:78-81; 355:1330-1334 )。一方、細胞モデルの研究から、ゲノム変動の引き金を引くのはDNA複製ストレス--すなわちDNA複製過程の障害--であると提唱されている(Nature, 43:4864-870;434:907- 913)。DNA複製は正常増殖をしている際にも種々の外的・内的要因により障害をうける。細胞は複製ストレス応答システムを内蔵しており、複製障害に対応し、ゲノム全体の複製を完了させる。このシステムの破綻はDNA損傷を引き起こし、損傷応答の不全と重なると、ゲノム変動が蓄積しがん化に至る。複製障害に応答して活性化される、進化的に保存されたATR-Claspin-Chk1経路でClaspinは複製ストレスシグナルを受け取るATRキナーゼから、そのシグナルを細胞周期制御因子へと伝えるChk1キナーゼへと仲介する役割を果たす。Chk1キナーゼのS317のリン酸化はClaspinに依存して起こり、この経路の活性化の目印となる。

一方、種々の細胞ストレス(高温、酸化、浸透圧、低酸素、LPSなど)がClaspinに依存したChk1の活性化を誘導することを見出した。この事実は、複製とは一見関連していない細胞ストレスを短時間与える事により、複製障害が誘起され、複製ストレス応答経路が活性化される事を示唆した。

## 2. 研究の目的

がんは、ゲノム変化の蓄積により起こる。ゲノム変動の引き金は、DNA複製過程の障害が引く。複製障害に応答して、進化的に保存されたATR-Claspin-Chk1経路が活性化される。Claspinは、上流のATRキナーゼからのシグナルを、Chk1キナーゼ(細胞周期進行を調整する)へと仲介する。我々は、種々の細胞ストレス(高温、酸化、浸透圧、低酸素、LPS等)により、Claspinに依存してChk1の活性化が起こる事を発見した。この事実は、複製とは関連しない細胞ストレスにより、複製障害が誘起され、その結果ゲノム損傷を引き起こし、最終的に発がんの原因となるゲノム変動を蓄積するという道筋を示唆する。そこで、本研究では、『生体に与えられる種々の細胞ストレスにより、DNA複製が干渉を受け、複製障害を受ける事が、がん発生の根本原因である』という仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 種々の生体ストレスが、複製障害を誘導するかどうかを検証する

DNA fiber法を用いて、ストレス後に複製フォーク進行が阻害されるかを調べる。又、ストレス存在下で、複製フォークの進行速度或いは複製起点間の距離が変化するかを調べる。

ストレス後に、複製ストレスの指標のひとつである、一本鎖DNAが検出されるかを調べる。

ストレス後に、DNA損傷が増加するかを調べる(DSBを検出する $\gamma$ H2AXリン酸化マーカー)

### (2) ストレス応答制御因子と複製ストレス応答のクロストークを検証する

種々のストレス応答に關与するシグナル伝達分子のノックダウンを行い、対応するストレスによるClaspin-Chk1活性化に及ぼす影響を調べる。

これらのシグナル分子とATR-Claspin-Chk1との相互作用を調べる。

### (3) 生体ストレスによる複製障害誘導のメカニズムを調べる

細胞内のヌクレオチド前駆体の減少は複製障害の大きな原因となる。ストレス添加により細胞内ヌクレオチド前駆体の変動するかを検討する。

複製と転写の衝突は、DNA-DNAハイブリッドを含むR-loop構造を形成することにより複製障害を生じることが知られている。RNaseHの発現によるR-loopの減少が、ストレス添加によるChk1活性化の低下をもたらすかを検討する。

(4) ストレスによる腫瘍形成促進をモデル動物で検証する

各種のストレスを与えたヒト細胞(p53欠損細胞, 不死化した細胞など)をヌードマウスに移植 (Xenograft) し、腫瘍発生効率に及ぼすストレスの影響を測定する。

4. 研究成果

(1) 生体ストレスによる複製ストレスチェックポイントの活性化 (Hsiao et al. *Biomolecules*, 2023)

酸化、浸透圧、高温、細菌感染、砒素、低酸素および高グルコースを含むさまざまな生体ストレスは、複製ストレスチェックポイント誘導のマーカである Chk1 を活性化した。また、DNA 損傷のマーカである  $\gamma$ H2AX リン酸化マーカを誘導した (図1)。

複製阻害を介した複製チェックポイントの活性化

調べたストレスの中で酸化、高温、砒素は DNA 複製を阻害した (図2)。従って、複製チェックポイント活性化の少なくとも一部は、DNA 複製阻害により誘導されているものと考えられる。

複製阻害の不在下での複製チェックポイントの活性化

浸透圧、細菌感染、砒素、低酸素および高グルコースは複製を大きく阻害しないにも関わらず、Claspin 依存的に Chk1 を活性化した (図2と図3)。更に、Fucci 細胞を利用して、細胞周期特異的な Chk1 活性化を調べた結果、Claspin は、S 期での Chk1 の活性化には必要とされるが、G1 期における活性化は Claspin に依存しないことが明らかになった (図4)。

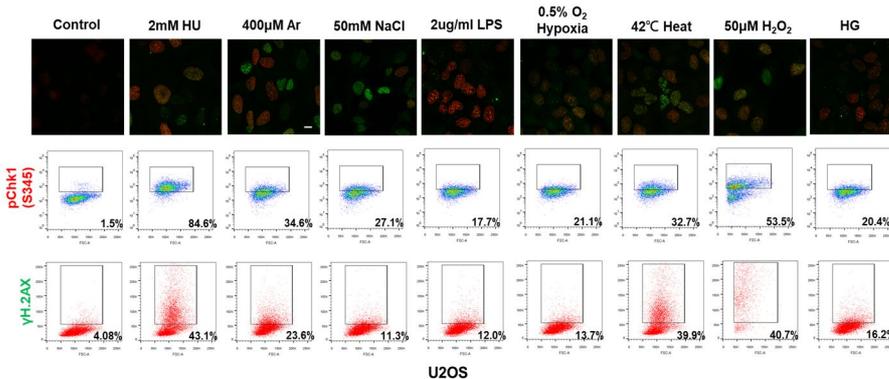


図1 種々の生体ストレスが複製チェックポイントと DNA 損傷と Chk1 活性化に及ぼす影響。U2OS 細胞を種々のストレスで処理し、DNA 損傷のマーカである H2AX リン酸化マーカおよびチェックポイント活性化の指標である Chk1 S137 シグナルを FACS で解析した。

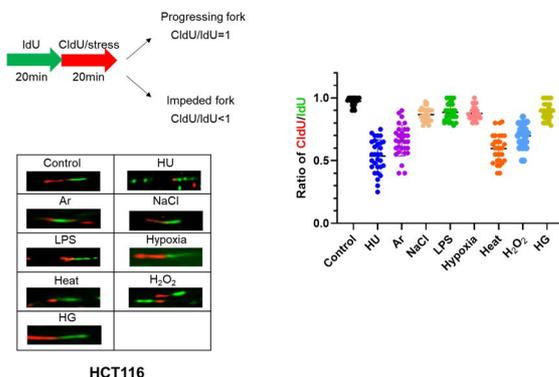


図2 種々の生体ストレスが DNA 複製に及ぼす影響。HCT116 細胞に種々の生体ストレスを与

え、複製フォークの伸長に及ぼす影響を DNA fiber アッセイで測定した。複製ストレスを与える HU の他に、浸透圧、高温、酸化ストレスにより複製フォーク進行が阻害された。

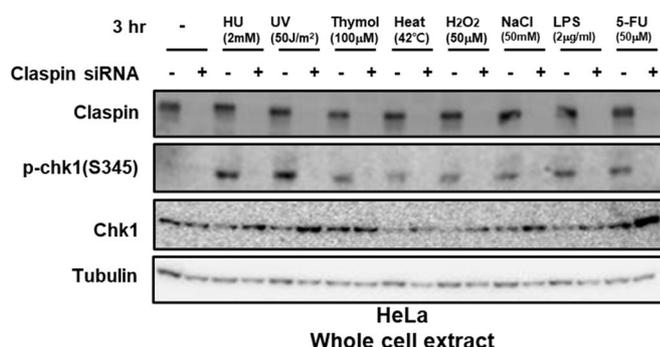


図3 種々の生体ストレスによる複製ストレスチェックポイント活性化の Claspin 依存性。siRNA で Claspin 発現を抑制した HeLa 細胞と control 細胞を種々のストレスに暴露して、Chk1 活性化(リン酸化 Chk1)を測定した。いずれのストレスによっても、Chk1 活性化は Claspin のノックダウンにより減少した。

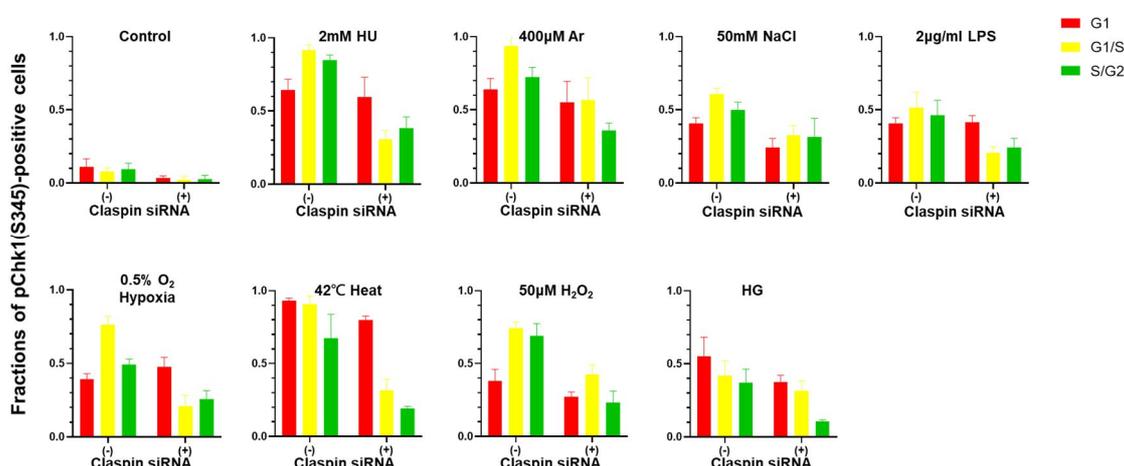


図4 種々の生体ストレスによる Chk1 活性化の Claspin 依存性の、細胞周期制御。種々の生体ストレスで処理された U2OS Fucci 細胞において、Claspin siRNA の有無で、各細胞周期における Chk1 のリン酸化を測定した。Chk1 S345 陽性の細胞の割合を測定した。Claspin は、G1/S、S/G2 細胞での Chk1 活性化は、いずれのストレスによっても Claspin siRNA により減少したが、G1 期の Chk1 活性化は、大きく影響されなかった。

#### 高温処理による複製チェックポイント活性化のメカニズム

高温処理は、DNA 複製を強く阻害するが、G1 期においても Chk1 を強く活性化した。また、高温処理により、Claspin の過剰リン酸化が誘導された(図5)。更に ISR(Integrated Stress Response)に關与する eIF2 キナーゼ (PERK、GCN2、PKR、および HRI) を全て欠損する MEF 細胞は、熱による Chk1 活性化および Claspin の過剰リン酸化が減少した。しかし、GCN2 のみを発言する MEF 細胞においては、回復した(図5)。更に、GCN2 及び HRI は in vitro で Chk1 をリン酸化して、Chk1 を活性化する(図6)。

これらのの結果は複製ストレス経路と ISR のクロストークを示唆する。他の生体ストレスによる Claspin-Chk1 活性化においても ISR の關与が示唆された。

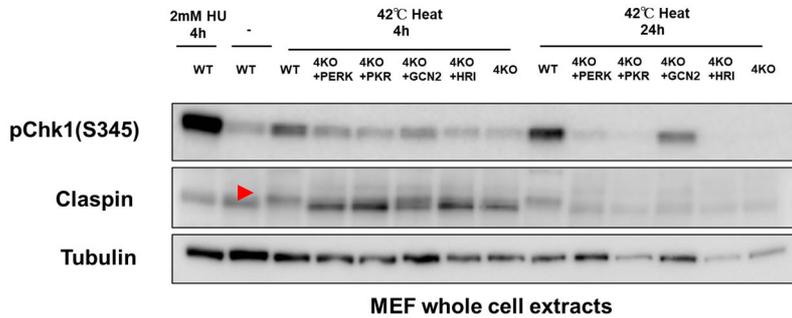


図5 高温ストレスに対する Chk1 活性化および Claspin の過剰リン酸化の eIF2 キナーゼの影響。MEF 細胞(野生型[wt]、あるいは eIF2 キナーゼ欠損 4 種類を全て欠損[4KO]あるいは eIF2 キナーゼ 1 種類のみを発現する 4KO [4KO+PERK, 4KO+PKR, 4KO+GCN2, 4KO+HRI])を 42°C で 3 時間処理し、Chk1 のリン酸化及び内在性 Claspin のリン酸化 (赤色矢印) を調べた。

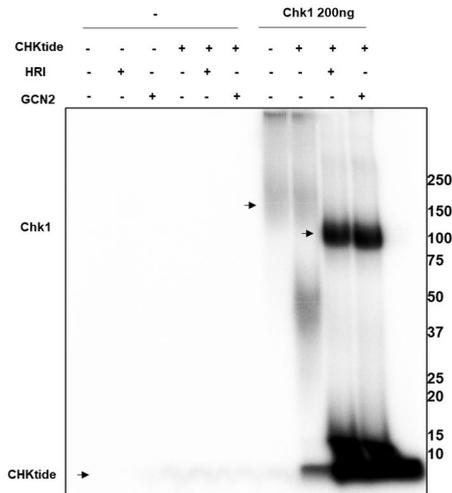


図6 In vitro における eIF2 キナーゼが Chk1 に及ぼす影響の解析。精製した Chk1 による CHKtide(Chk1 の基質)のリン酸化反応に、HRI 及び GCN2 キナーゼを加え、Chk1 及び CHKtide のリン酸化への影響を調べた。二つの eIF2α キナーゼにより CHKtide によるリン酸化反応が著しく促進された。

#### 【まとめ】

本研究において、種々の生体ストレスが、ヒト細胞において複製チェックポイントを活性化することを見出した。これらのストレスは、直接 DNA 複製を阻害する事により複製チェックポイントを活性化するものと、複製は阻害しないが Chk1 を活性化するものの 2 種類に分けられた。

更に、細胞周期 indicator を用いた実験から、Chk1 は S 期のみでなく、G1 期にも活性化される事が明らかとなった。そして G1 期の Chk1 活性化は Claspin に大部分依存しない事が示された。Claspin に依存しない Chk1 の活性化は、別のメディエーターの存在を示唆する。また、複製の非存在下で Chk1 が活性化されるメカニズムは不明である。ストレスが誘導する転写による RNA-DNA hybrid の生成をもたらす DNA 損傷、あるいは、ストレスにより誘導されるクロマチン構造の変化などが、Chk1 活性化のシグナルとなる可能性を現在検証している。

本研究の成果から、生体ストレス応答経路と複製ストレスチェックポイント経路とのクロストークの存在が示唆された。高温による Chk1 の活性化に Integrated Stress Response に関与する eIF2 キナーゼの GCN2 が関与することが明らかとなった。実際、GCN2 は Chk1 のキナーゼ活性を活性化する可能性を示した。

これらは、これまで全く知られていない新たなシグナル経路であり、生体ストレスが、複製ストレス経路を介してゲノム安定性を制御する新たなメカニズム解明に大きな洞察を与える。

本研究では、生体ストレスによる複製チェックポイント誘導のメカニズムの詳細な解明までに至らず、計画していた実験は現在進行中である。又、計画していた動物を用いた実験については、結果を出せるところまで到達しなかったが、現在個体レベルでの検証を進めている。

なお、本報告書では紙面の都合で記載できなかったが、血清飢餓からの増殖再開時の PI3K-PDK1-mTOR 経路の活性化に Claspin が必須であることを発見し、報告した (Yang et al. *Mol. Cell. Biol.* 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Hsiao Hao-Wen, Yang Chi-Chun, Masai Hisao	4. 巻 2
2. 論文標題 Roles of Claspin in regulation of DNA replication, replication stress responses and oncogenesis in human cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Instability & Disease	6. 最初と最後の頁 263 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s42764-021-00049-8	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 Yang Chi-Chun, Masai Hisao	4. 巻 43
2. 論文標題 Claspin is Required for Growth Recovery from Serum Starvation through Regulating the PI3K-PDK1-mTOR Pathway in Mammalian Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10985549.2022.2160598	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 Hsiao Hao-Wen, Yang Chi-Chun, Masai Hisao	4. 巻 13
2. 論文標題 Claspin-Dependent and -Independent Chk1 Activation by a Panel of Biological Stresses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 125 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13010125	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10件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Chi-Chun Yang, Hisao Masai
2. 発表標題 Claspin is required for growth recovery from serum starvation through regulating the PI3K-PDK1-mTOR pathway.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference, DNA METABOLISM, GENOMIC STABILITY & HUMAN DISEASE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang Chi-Chun and Masai Hisao
2. 発表標題 Claspin, a key regulator of replication checkpoint, is differentially regulated in cancer and non-cancer cells.
3. 学会等名 11th international symposium on DNA Damage Response & Human Disease (isDDRHD-2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正井 久雄、田中 卓、鷺 朋子、深津 理乃、関 由美香
2. 発表標題 G4/RNA-DNAハイブリッドに依存する環状染色体DNAの複製機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masai H, Iguchi T, Ito S, Kakusho N, Fukatsu R, OjiA, Hiratani I, Sasanuma H.
2. 発表標題 Regulation of replication timing and DNA repair by nuclear membrane tethering of Rif1.
3. 学会等名 13th isDDRHD (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム動態プロジェクトホームページ  
<https://www.igakuken.or.jp/genome/>

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