

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07148

研究課題名(和文) ホルモン刺激に応じて一過性に発癌関連遺伝子の転写を誘導するDNA配列の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of genomic elements that promote hormone-responsive transient expression of oncogenes

研究代表者

山田 真太郎 (Shintaro, Yamada)

京都大学・生命科学研究科・特任講師

研究者番号：20837869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：性ホルモンの受容体は、転写因子として様々な遺伝子の転写を制御する。性ホルモン刺激後の転写応答時には、標的遺伝子の転写制御配列(プロモーターとエンハンサー)でゲノム切断がDNA topoisomerase II依存的にしばしば発生する。細胞がこのゲノム切断を効率よく再結合できないと、性ホルモン刺激後の転写応答が大きく変わる。本研究では、男性ホルモンであるアンドロゲンに暴露した前立腺癌細胞の早期転写応答を解析した。その結果、難治性のゲノム切断が蓄積する変異体(TDP2)では、c-MYC癌遺伝子などの早期転写応答が亢進することを見出した。また、それら早期転写応答と相関するエンハンサーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ゲノム切断修復酵素が欠損した時の、外的刺激への転写応答変化を全ゲノムで解析した。その結果、TDP2と同様にゲノム切断の修復が異常になるATMやBRCA1、BRCA2の変異の保因者が前立腺癌を起こしやすい原因の一つが、アンドロゲン暴露時のエンハンサーの異常による発癌遺伝子の異常な転写応答である可能性が推察された。得られた成果は、ATM、BRCA1、BRCA2などのDNA損傷修復遺伝子の変異の保因者が、乳癌や卵巣癌、前立腺癌を発症しやすいか、その問いに答える分子メカニズムを解明するための基盤になる。

研究成果の概要(英文)：Receptors for sex hormones regulate transcription of various genes as transcription factors. During the transcriptional response after sex hormone stimulation, genomic breaks often occur at transcriptional regulatory sequences (promoters and enhancers) of target genes in a DNA topoisomerase II-dependent manner. If cells are unable to efficiently recombine these genomic breaks, the transcriptional response after sex hormone stimulation is greatly altered. In this study, we analyzed the early transcriptional response of prostate cancer cells exposed to the male hormone androgen. We found that mutants that accumulate refractory genomic truncations (TDP2) have enhanced early transcriptional responses, such as the c-MYC oncogene. Moreover, we identified enhancers whose activities correlate with those early transcriptional responses.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：性ホルモン DNAトポイソメラーゼ DNA二重鎖切断 DNA修復 乳癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 性ホルモンによる転写制御と DNA topoisomerase II

性ホルモンの受容体は、ホルモンに結合すると転写因子として様々な遺伝子の転写を制御する。性ホルモン刺激後 30 分の転写応答時に、標的遺伝子の転写制御配列 (プロモーターとエンハンサー) でゲノム切断が DNA topoisomerase II (TOP2、図 1) 依存的にしばしば発生する (図 1, ④, 既知)。応募者は、非同相末端結合 (図 1, ⑥) が、この切断を再結合することを過去に見つけた。

(2) エンハンサーとは?

エンハンサーは、数百塩基の長さであり、各遺伝子に複数個存在する。活性化されたエンハンサーはプロモーターに近接してプロモーターからの転写を活性化 (図 2)。既知のエンハンサー (9.3 万) の 10 倍以上の未知エンハンサーが存在する (*Trends Genet.* 2016, PMID: 26780995)。

(3) エンハンサーの、従来の検出法の弱点

エンハンサーは、ヒストンコードの分布やクロマチンの凝集度、レポーターアッセイから網羅的に解析された。その結果、同定されたエンハンサーは事実上 全部、恒常的に活性化しているタイプである。増殖因子等を加えた時に一時的に活性化される遺伝子 (例、発癌遺伝子、*c-MYC* はエストロゲン曝露中に曝露直後直後から 2 時間だけ転写) の活性化に必要なエンハンサーは、これまで全く不明である。

(4) 最新エンハンサー検出法: エンハンサー同定だけでなく機能 (どの細胞外刺激でいつ活性化するか) も解明可

上記の弱点を克服したのがエンハンサー RNA (eRNA) の発見である (*Nature* 2014, PMID: 24670763)。デンマークの研究者は転写開始点のトランスクリプトーム解析 (CAGE 法) の理研データベース (FANTOM) から eRNA を発見した研究協力者の村川泰裕教授 (京大と理研の兼任) は、合成中の RNA のみ deep sequencing する NET-CAGE 法を開発した (*Nature Genet* 2019, PMID: 31477927)。従来のトランスクリプトーム解析では、細胞質の mRNA の蓄積量を測定するため、mRNA の合成速度を測定できない。NET-CAGE 法は、細胞核内で合成中の nascent RNA のみ解析するため早期転写応答速度を継続的に正確に解析できる。

従来のトランスクリプトーム解析では、エンハンサーの eRNA 合成から 30 分-1 時間遅れて遺伝子の mRNA 合成が始まると結論した (*Science* 2015, PMID: 25678556, MCF-7 に HRG 因子追加後に eRNA と mRNA を継時解析)。村川教授は、NET-CAGE 法により、eRNA と mRNA の合成が全く同じタイミングで ON→OFF されることを見出した。「全く同じタイミング」故に、どのエンハンサーがどの転写開始点 (1 つの遺伝子に平均 5 箇所転写開始点が存在) を推定可能である。NET-CAGE 法のこの優位性を使うことにより、増殖刺激早期応答に必要なエンハンサーとそれが制御する遺伝子の組み合わせを網羅的に同定できる。

(5) 増殖因子を添加直後に遺伝子が活性化されるのに DNA topoisomerase II (TOP2、図 1) が必要

TOP2 酵素はゲノム DNA の切断と再結合 (図 1, ①⇔②) を高速度に繰り返す。TOP2 は生存に必須であり、その阻害剤はゲノム切断 (図 1, ④) を起こし副次反応 (例、p53 活性化) も起こす。故に TOP2 触媒の機能解析は困難である。状況証拠から TOP2 は増殖因子添加直後に、エンハンサーとプロモーターが近接し転写が活性化 (図 2) するのに必要と推定されている。

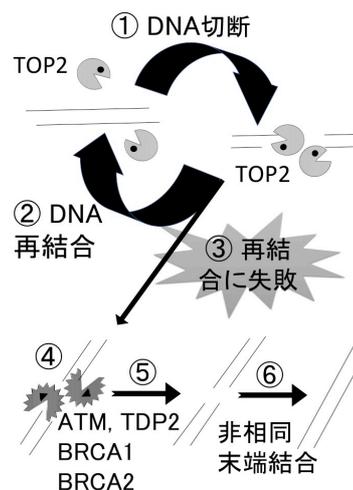


図 1 DNA トポイソメラーゼ II (TOP2) は DNA の切断 (①) と再結合 (②) を高速で繰り返す。TOP2 は、切断した部位から別の DNA 鎖を通過させて、DNA 間のもつれを解消する。TOP2 が再結合に失敗する (③) と、DNA の再結合を DNA 修復経路 (非同相末端結合) が行う。DNA 再結合の前に ATM、BRCA1、BRCA2 が切断端から TOP2 を剥ぎ取る (応募者らの発見)。

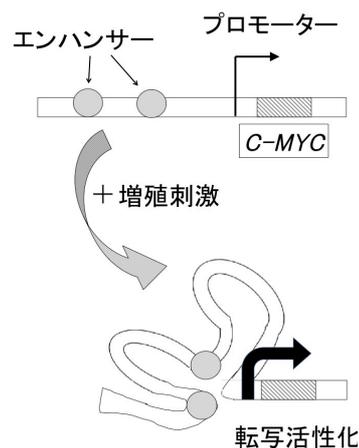


図 2 増殖刺激による遺伝子発現誘導時、転写制御配列であるエンハンサーが、転写開始点上流 (プロモーター) に近接し、転写 (右向き矢印) が活性化。エンハンサーは、遺伝子当たり複数箇所存在する。細胞・臓器特異的な遺伝子発現制御に関与する。

TOP2 は生理的状态でもしばしば切断の再結合に失敗する (図 1, ③)。失敗の結果生じた難治性切断 (図 1, ④、TOP2 が DNA 切断 5' 末端に共有結合) を迅速に修復 (④→⑤→⑥) できないと、エストロゲン曝露時の早期転写応答が大きく変化する。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景より、アンドロゲンやエストロゲンなどの性ホルモン受容体は、ホルモンに結合すると転写因子として様々な遺伝子の転写を制御すること、性ホルモン刺激後の転写応答時に、標的遺伝子の転写制御配列(プロモーターとエンハンサー)でゲノム切断が TOP2 依存的にしばしば発生すること、所属する研究室において、非相同末端結合が、この切断を再結合することが見つかったこと、細胞がこのゲノム切断を効率よく再結合できないと、性ホルモン刺激後の転写応答が大きく変わることも分かっていた。本研究の目的は、ゲノム切断の修復と早期転写応答とのクロストークの分子メカニズムを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1) 性ホルモン刺激後の転写応答時に生じるゲノム切断の修復に必要な因子を探索

研究開始当初の背景より、TOP2 酵素は、ゲノム DNA の切断と再結合を高速に繰り返すこと、また TOP2 はこの触媒反応にしばしば失敗し、TOP2 が DNA の 5' 末端に共有結合した難治性のゲノム切断が生じることが所属研究室で明らかになっている。このゲノム切断の修復に関与する遺伝子を同定するため、ゲノム修復遺伝子の遺伝子破壊やノックダウンを行った。

具体的には、TOP2 阻害抗癌剤(エトポシド)に感受性となる変異体を探索した。エトポシドは TOP2-DNA 複合体を大量生産する。エトポシド処理後の TOP2-DNA を定量し、野生型より増加していれば、候補遺伝子が TOP2 依存的なゲノム切断の修復に関与すると結論した。

ゲノムの切断端 5' 末に結合した TOP2 を除去する反応の機序は、相同組換え修復経路の最初のステップ(切断端から 5' 末 1 本鎖 DNA を削除)と似ている (図 3)。所属研究室において、MRE11 と BRCA1 が相同組換えだけでなく、TOP2 の除去にも関与することが分かっていた (*Mol Cell*, 2016; *PNAS USA*, 2018; *iScience* 2020)。相同組換え修復の最初のステップ(5' 末 1 本鎖 DNA を削除)に関与するタンパク質が同時に TOP2 除去にも関与すると着想した。相同組換え修復の最初のステップに関与する遺伝子を標的に、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊や、shRNA を用いたノックダウンを行った。

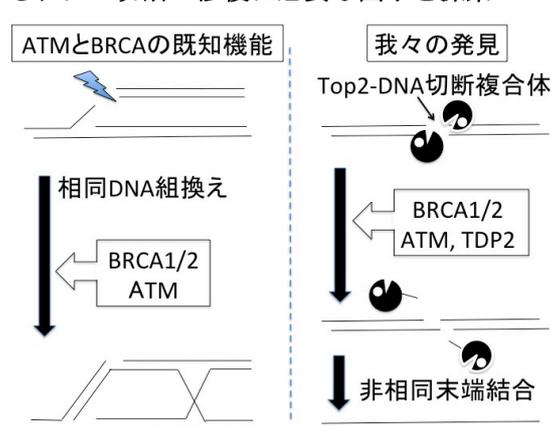


図 3 (左) ATM と BRCA1、BRCA2 は、相同組換え修復により、ゲノム切断の再結合を S/G2 期に促進する。(右) 先行研究により、応募者らは、BRCA1 が、ゲノム切断 5' 末端に共有結合した TOP2 を、切断端から剥取って切断の再結合を促進することを発見した。

(2) 性ホルモン刺激後の転写応答時に生じるゲノム切断の修復に必要な因子が欠損したときの、性ホルモンへの転写応答の変化の解析

ゲノム切断修復酵素が欠損した時の、外的刺激への転写応答変化を全ゲノムで解析するため、男性ホルモンであるアンドロゲンに暴露した前立腺癌細胞(LNCaP、男性ホルモン受容体陽性)において *c-MYC* などの発癌遺伝子の早期転写応答を NET-CAGE 法により解析した。

4. 研究成果

遺伝子破壊やノックダウンを行い、性ホルモン刺激後の転写応答時に生じるゲノム切断の修復に必要な因子を探索した結果、難治性のゲノム切断が蓄積する ATM や TDP2 などの変異体が新たに得られた。

TOP2 の触媒反応の失敗で生じた難治性のゲノム切断が蓄積する TDP2 欠損株と、野生型株における前立腺癌細胞(LNCaP) のアンドロゲン刺激依存的なプロモーター活性を比較した結果、TDP2 欠損株では、野生型株と比べ、*c-MYC* などの発癌遺伝子の早期転写応答が亢進することを見出した。同様に、*c-MYC* などの発癌遺伝子のエンハンサー活性も亢進していた。このことから、アンドロゲン依存的な難治性のゲノム切断の修復により、アンドロゲンの標的エンハンサーの過剰な活性化が抑えられることで、アンドロゲン曝露時に起こる *c-MYC* などの発癌遺伝子の過剰発現が抑制されるメカニズムが推察された。

本研究により、TDP2 と同様にゲノム切断の修復に重要な ATM や BRCA1、BRCA2 の変異の保因者が前立腺癌を起こしやすい原因の一つが、アンドロゲン曝露時の発癌遺伝子の異常な転写応答である可能性が示唆された。得られた成果は、ATM、BRCA1、BRCA2 などの DNA の相同組換え修復に

関わる遺伝子の変異の保因者が、乳癌や卵巣癌、前立腺癌を発症しやすいか、その問いに答える分子メカニズムを解明するための基盤になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Akter Salma, Shimba Akihiro, Ikuta Koichi, Mahmud Md. Rasef Al, Yamada Shintaro, Sasanuma Hiroyuki, Tsuda Masataka, Sone Masakatsu, Ago Yukio, Murai Kenichi, Tanaka Hisashi, Takeda Shunichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Physiological concentrations of glucocorticoids induce pathological DNA double-strand breaks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 53 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12993	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 Najnin Rifat Ara, Al Mahmud Md Rasef, Rahman Md Maminur, Takeda Shunichi, Sasanuma Hiroyuki, Tanaka Hisashi, Murakawa Yasuhiro, Shimizu Naoto, Akter Salma, Takagi Masatoshi, Sunada Takuro, Akamatsu Shusuke, He Gang, Itou Junji, Toi Masakazu, Miyaji Mary, Tsutsui Kimiko M., Keeney Scott, Yamada Shintaro	4. 巻 42
2. 論文標題 ATM suppresses c-Myc overexpression in the mammary epithelium in response to estrogen	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111909 ~ 111909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111909	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 Manguso Nicholas, Kim Minhyung, Joshi Neeraj, Al?Mahmud Md Rasef, Aldaco Juan, Suzuki Ryusuke, Cortes-Ledesma Felipe, Cui Xiaojiang, Yamada Shintaro, Takeda Shunichi, Giuliano Armando, You Sungyong, Tanaka Hisashi	4. 巻 6
2. 論文標題 TDP2 is a regulator of estrogen-responsive oncogene expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 zcae016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/narcan/zcae016	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Rifat Najnin, Md Rasel Al Mahmud, Md Maminur Rahman, Hiroyuki Sasanuma, Naoto Shimizu, Salma Akter, Yasuhiro Murakawa, Scott Keeney, Shunichi Takeda, and Shintaro Yamada
2. 発表標題 ATM suppresses c-Myc overexpression in mammary epithelium in response to estrogens
3. 学会等名 86th Symposium: Genome Stability & Integrity (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rifat Najnin, Md Rasel Al Mahmud, Md Maminur Rahman, Shunichi Takeda, Hiroyuki Sasanuma, Naoto Shimizu, Salma Akter, Scott Keeney, and Shintaro Yamada
2. 発表標題 ATM Suppresses c-Myc Overexpression in the Mammary Epithelium in Response to Estrogens
3. 学会等名 Genome Integrity Discussion Group (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田真太郎
2. 発表標題 DNA損傷修復応答の破綻による臓器特異的発がん機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会 共催（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rifat Ara Najnin, Md Rasel Al Mahmud, Md Maminur Rahman, Shunichi Takeda, Hiroyuki Sasanuma, Hisashi Tanaka, Yasuhiro Murakawa, Naoto Shimizu, Salma Akter, Masatoshi Takagi, Takuro Sunada, Shusuke Akamatsu, Gang He, Junji Itou, Masakazu Toi, Mary Miyaji, Kimiko M. Tsutsui, Scott Keeney, Shintaro Yamada
2. 発表標題 ATM suppresses c-Myc overexpression in the mammary epithelium in response to estrogen
3. 学会等名 第 40 回染色体ワークショップ 第 21 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Rifat Ara Najnin, Md Raseel Al Mahmud, Md Maminur Rahman, Shunichi Takeda, Hiroyuki Sasanuma, Hisashi Tanaka, Yasuhiro Murakawa, Naoto Shimizu, Salma Akter, Masatoshi Takagi, Takuro Sunada, Shusuke Akamatsu, Gang He, Junji Itou, Masakazu Toi, Mary Miyaji, Kimiko M. Tsutsui, Scott Keeney, and Shintaro Yamada
2. 発表標題	ATM suppresses c-Myc overexpression in the mammary epithelium in response to estrogen
3. 学会等名	The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	山田真太郎
2. 発表標題	Genome-wide identification of androgyne-responsive enhancers and analysis of TOP2 function in enhancers
3. 学会等名	TOPO 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	山田真太郎、Md Raseel Al Mahmud、村川泰裕、武田俊一
2. 発表標題	TOP2-dependent DSBs at extracellular signal-specific enhancers and their effects on signal-induced transcription
3. 学会等名	EMBO Workshop DNA Topology in genomic transactions (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	山田真太郎、Md Raseel Al Mahmud、村川泰裕、武田俊一
2. 発表標題	細胞外シグナル特異的エンハンサーにおける TOP2 依存的ゲノム切断と転写への影響
3. 学会等名	第39回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
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			
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Cedars-Sinai Medical Center		
中国	Shenzhen University			