

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07212

研究課題名(和文) Mycが誘導する複製・転写ストレスの増強による治療-G4リガンドを中心に

研究課題名(英文) G-quadruplex in Myc-induced replication and transcription stresses; as a potential therapeutic target.

研究代表者

関本 隆志 (Sekimoto, Takayuki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20436322

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)：がん遺伝子Myc活性化は、DNA二重鎖切断(DSB)の生成につながる複製・転写ポリメラーゼの動態異常、すなわち「複製ストレス」や「転写ストレス」を引き起こす。我々はMyc誘導性DSBについて研究し、以下のことを見出した。(1) Myc活性化細胞において、複製と転写の両方に依存してグアニン四重鎖構造(G4)が増加した。(2) Myc活性化細胞において、G4安定化剤はDSB形成と細胞死に対する感受性を高めた。(3) Pol IIの進行を制御する転写関連CDK(CDK7, CDK9)の阻害剤が、Myc活性化細胞においてDSBを誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Mycは代表的ながん遺伝子であるが、これを直接標的とする抗がん剤の候補は見つかっていない。我々が見出したG4リガンドを中心としたMyc活性化細胞におけるDSB増加による細胞死誘導機構は、これに変わる新規治療法の開発に繋がる事が期待される。

一方、転写関連CDK(CDK7, CDK9)阻害剤は臨床試験が進行中であるが、その作用機序は主に遺伝子発現の変化によるとされている。我々が見出したDSB形成を介した細胞死増加のメカニズムは新たな作用機序である可能性が高く、非常に興味深い。

研究成果の概要(英文)：Oncogenic activation of replication or transcription induces generation of double-strand breaks (DSBs) and genomic instability. Guanine-quadruplex (G4) DNA, four-stranded structures formed by single-stranded G-rich sequences, is a potential source of these stresses. Importantly, G4-ligands, which preferentially bind and stabilize G4s, exhibit cytotoxic effects in several types of tumors. These findings prompted us to study the role of G4 in oncogene-induced stresses.

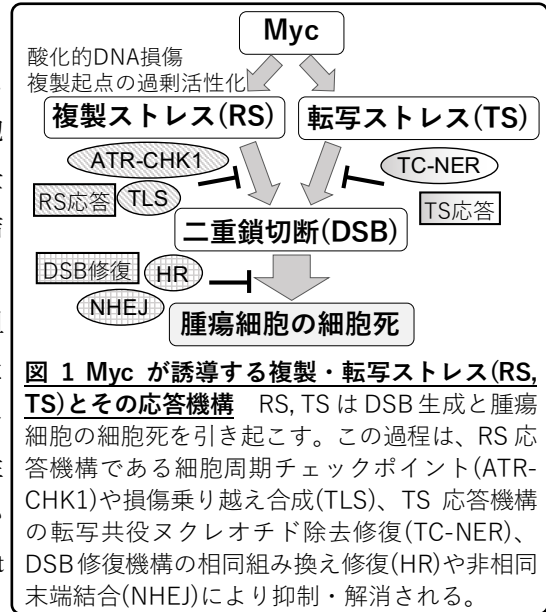
We report several lines of evidence that increased G4s partly accounts for Myc-induced stresses. (1) Myc activation increased G4 structures in a replication- or transcription-dependent manner, respectively. (2) Treatment with G4-ligands synergistically increased Myc-induced DSB formation and cell death. (3) Inhibitor of transcription related CDK7/9 raised Myc-induced DSB and cell death. These results propose that G4-ligands are effective drugs to boost Myc-induced replication and transcription stresses.

研究分野：分子細胞生物学

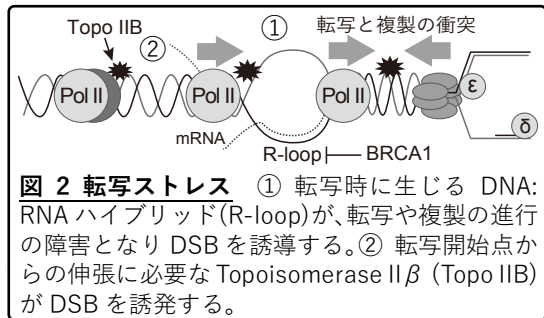
キーワード：複製ストレス 転写ストレス 発がん c-Myc グアニン四重鎖 Polymerase

1. 研究開始当初の背景

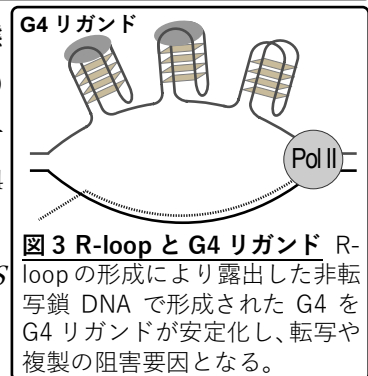
がん遺伝子の活性化などの発がんシグナルは、複製開始点の過剰活性化、DNA再複製、酸化ストレス、ヌクレオチド不足や転写・複製装置の衝突などを原因とするDNA損傷を引き起こし、複製フォークを遅延・停止させる(発がん性複製ストレス{replication stress}: 発がんRS)。このように腫瘍細胞で「複製ストレス」(replication stress, RS)が高まる仕組みやこれを増強する薬剤の研究は、治療開発に結実しつつある(Kotsantis et al., *Cancer Discov* 2018)。例えば、RSを抑制・解消する代表的分子ATRの阻害剤は、抗がん剤として臨床治験中である。我々は損傷乗り越えDNA合成(TLS)に関与するポリメラーゼ η (Pol η)を研究し、最近、Pol η ががん遺伝子誘導性RSへの耐性を高め、薬剤標的候補となることを見いだした(Kurahshima et al. *J Cell Sci* 2018; Sekimoto et al., *Mol Cell Biol* 2015)。



グアニンに富む1本鎖DNAはグアニン四重鎖(G-quadruplex, G4)構造と呼ばれる高次構造を形成する。G4構造に結合し安定化させる化合物(G4リガンド)がG4形成の亢進を示す腫瘍に高い抗腫瘍効果を示す事が報告され(Wang et al., *Nat commun* 2019; Hansel-Hertsch et al. *Nat genet* 2020)、注目を集めている。実際、G4リガンドの一つCX-5461はすでに抗がん剤として臨床治験が進行中である。最近の研究から、G4構造は複製フォーク進行を阻害し複製ストレスの原因となることが示唆されており、がん遺伝子誘導性RSへの関与に興味もたれる。



加えて、最近、がん遺伝子 c-Myc (Myc) や G4 が RS だけでなく、「転写ストレス」(transcription stress, TS)に関与することを示唆する報告が相次いでいる。例えば、Myc 活性化が転写ポリメラーゼ (Pol II) の動態異常に伴って、転写時に生ずる DNA:RNA ハイブリッド(R-loop)の異常な蓄積を引き起こし、これを相同組み換え修復の中心分子 BRCA1 が抑制する(Herold et al., *Nature* 2019)(図 1, 2)。一方、G4 リガンドによる DSB の誘導が、R-loop 形成(図 3)や、転写に伴う Topoisomerase II(Topo II)作用に依存する(Magis et al., *PNAS* 2019)。しかし、発がん遺伝子の誘導する TS に与える影響はほとんど解明されていない。



2. 研究の目的

我々は発がんシグナルが誘導する RS 応答についての研究をすすめ、複製異常の主な現象の一

つである DNA 再複製に Pol η をはじめとする Y-family ポリメラーゼが関与する事を報告した (Sekimoto et al., *Mol Cell Biol* 2015)。続いて、Pol η と構造特異的エンドヌクレアーゼ複合体 Mus81/EME2 が c-Myc による RS を軽減し、c-Myc 高発現細胞において Pol η と Mus81/EME2 の抑制が合成致死の関係にあることを報告した(Kurashima et al., *J Cell Sci* 2018)。この過程において、Pol η foci 形成を指標に Myc が誘導する RS の原因を調べたところ、cdc45 を介した複製起点の過剰活性化では Pol η foci の増加が見られたが、酸化的 DNA 損傷や dNTP の欠乏、転写と複製の衝突では Pol η foci 形成が見られなかった。この様に、Myc による RS を引き起こす直接の原因など不明な点は多い。

近年、G4 を認識する抗体が開発され(Biffi et al., *Nat Chem* 2013; Henderson et al., *NAR* 2013)、その動態や生理的意義の解明が著しく進み、複製や転写、翻訳など様々な生命現象の制御に関与することが報告されてきた。抗 G4 抗体を用いた免疫染色において、S 期において G4 foci が増加し、複製阻害剤処理により G4 foci が減少すると報告された(Biffi et al., *Nat Chem* 2013)。さらに、HR に関与する Rad51 や BRAC1/2 の発現抑制、欠損細胞は G4 リガンドに対する感受性を増加させること(Zimmer et al., *Mol Cell* 2016; Xu et al., *Nat Commun* 2017)、G4 リガンドが R-loop を介して DSB を増加させること(Magis et al., *PNAS* 2019)、神経芽腫細胞において N-Myc が R-loop を増加させることが報告された(Herold et al., *Nature* 2019)。これらのことから、我々は Myc による RS に G4 が関与するという着想に至った。この仮説を検証したところ、Myc 活性化により G4 が増加した。興味深いことに、複製阻害剤だけでなく転写阻害剤処理でも Myc による G4 増加を抑制した。これらの知見から、Myc 誘導性 RS だけでなく、TS においても G4 が関与する可能性が示唆された。そこで、本研究では、Myc 誘導性 RS や TS における G4 の働きの解明を目指す。

3. 研究の方法

タモキシフェン感受性のエストロゲンレセプターリガンド結合ドメインと Myc 融合タンパクを定常的に発現したヒト骨髄腫由来低悪性細胞株 U2OS (U2OS/Myc-ER)、ヒト不死化繊維芽細胞 OUMS (OUMS/Myc-ER) を作製した。この細胞は、4-hydroxytamoxifen (4OHT) 添加により Myc 発現・活性化を誘導できる。このモデル細胞系において、G4 リガンド処理が Myc 誘導性 RS や TS に与える影響を解析する。

4. 研究成果

① Myc 活性化は複製促進を介して G4 形成を促進し、G4 リガンド処理は Myc による RS 反応を増強する

G4 を特異的に認識するモノクローナル抗体により核内 DNA の G4 構造を染色したところ、4-OHT 処理によって G4 シグナルの増加が見られた。DAPI 染色による DNA 量の計測や PCNA 染色、チミジンアナログ取り込みから細胞周期との関連を解析したところ、主に S 期の細胞で G4 シグナルが増加していた。また、Cdc45 過剰発現により複製起点の活性化、すなわち Myc による複製活性化ミミックにより G4 シグナルが増加した。次に、G4 リガンドの Myc 活性化に対する影響を解析した。Myc 活性化後に G4 リガンド Pyridostatin(PDS)を処理し、PDS 処理 24, 48 時間後に DNA 二重鎖切断 (DSB) 形成を測定した。Myc 活性化、PDS 単独処理でも DSB が増加したが、両者の処理によりそのシグナルは相乗的に増加した。加えて、複製阻害剤処理はこの DSB を減少させた。同様に、4OHT/PDS 処理は Myc 活性化、PDS 処理による細胞死を増強した。

また、別の G4 リガンド(Phen DC3)でも同様の結果が得られた。以上の結果から、Myc による複製活性化を原因として G4 が形成され、G4 リガンド処理は Myc 誘導性 RS 反応を増強し、DSB 形成、細胞死を増加させたことを示唆する。

② Myc による G4 増加に対する応答に Pol η が関与する

我々が報告した Myc による RS の軽減に Pol η が関与することに加え、In vitro において、Pol η が G4 を含む鋳型の複製に関与することが報告された(Eddy et al., *Biochemistry* 2016)。以上のことから、Myc による G4 増加に対する応答に Pol η が関与する可能性を考え、U2OS/Myc-ER 細胞に GFP-Pol η を定常的に発現させた細胞を作成し解析をおこなった。PDS 処理は単独でも Pol η の核内集積を増加させたが、4OHT との同時処理によりその集積は増強された。加えて、Pol η 発現抑制は 4OHT/PDS 処理による細胞死を増強させた。これらの結果より、Myc による G4 増加に対する応答に Pol η が関与することが示唆される。

上記、①、②をまとめて、現在論文投稿を準備中である。

③ Myc による TS と G4、転写関連 CDK との関連性

複製阻害剤だけでなく転写阻害剤処理でも Myc による G4 増加を抑制した。このことから、Myc 誘導性 TS と G4 の関連を検証しているが、Myc による複製活性化と転写活性化を切り分けることが困難で、解析を進めることができていない。今後、細胞全体の転写活性を上昇させた時の G4 増加程度や G4 リガンドによる影響など解析を進める。

上記の解析を進める過程で、RNA Polymerase (Pol II)の進行を制御する転写関連 CDK (CDK7, CDK9)阻害剤処理が Myc 活性化細胞において DNA 二重鎖切断を増加させ、細胞死を誘導する事を見いだした。この結果は、CDK7/9 阻害剤が Myc 誘導性 TS 増強を介して抗腫瘍効果を示す可能性を示唆しており、現在、詳細な分子機構を解析中である。CDK7/9 阻害剤は臨床治験が進行中であるがその作用機序は主に遺伝子発現の変化によるとされており (Chou et al., *Cancer Discov* 2020)、我々が見出した DSB 生成の促進による細胞死増加は興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 関本隆志
2. 発表標題 Myc誘導性複製ストレスにおけるグアニン四重鎖構造は治療標的になり得るか
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関本隆志
2. 発表標題 がん遺伝子c-Mycが誘導する複製ストレスにおけるグアニン四重鎖構造の役割
3. 学会等名 第9回 DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Sekimoto
2. 発表標題 G-quadruplex in Myc-induced replication stress; as a potential therapeutic target
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関本隆志
2. 発表標題 がん遺伝子Mycが誘導する複製ストレスにおけるグアニン四重鎖の役割
3. 学会等名 Genome Damage Network Workshop 2021 ~Online Retreat~
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所
<https://www.imcr.gunma-u.ac.jp>
群馬大学生体調節研究所生体膜機能分野
<http://makukinou.showa.gunma-u.ac.jp/index.html>

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