

令和 6 年 6 月 25 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：21K07727

研究課題名（和文）新規リアルタイムDNA損傷修復応答検出システムの構築と腫瘍内DNA損傷応答の解析

研究課題名（英文）Construct of realtime DNA damage-repair response detection system and analysis of intratumor DNA damage-repair response

研究代表者

小林 稔（Kobayashi, Minoru）

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：40644894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではDNA損傷修復関連タンパク質と分割ルシフェラーゼタンパクの融合遺伝子を作成することでDNA損傷修復活性をルシフェラーゼ活性としてモニター出来る系の開発を目指して研究を行った。ホタルルシフェラーゼを基にした分割ルシフェラーゼの系で遺伝子構築を行ったものの、温度や薬剤投与による非特異的な反応が起こるといった問題が生じた。そのため、使用する分割ルシフェラーゼをNanoLucを基にしたNanoBitシステムに変更することで非特異的な反応を抑えることに成功し、DNA損傷修復活性を発光で検出する系の礎を築いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでDNA損傷修復活性を定量する方法は限られており、経時的・定量的な解析が困難であった。そこで、本研究では定量性に優れ、細胞や動物個体を殺さずに検出可能な発光タンパクであるルシフェラーゼを基にした分割ルシフェラーゼ系を用いてDNA損傷や修復活性を検出する系の構築を試みた。当初予定していたホタルルシフェラーゼを基にした系では非特異的な反応の影響が大きかったため、NanoLucを基にしたNanoBitに系を変更することで非特異的な反応を低減したDNA損傷修復活性検出系の構築の礎を築いた。今後この系をさらに発展させていく予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, I try to construct assay system for detection of DNA damage repair responses using split luciferase fused with DNA damage response protein. First, I used firefly luciferase-based split luciferase system, but I had problem to unexpected response such as temperature and non-specific drug-dependent luminescence increment. So, I changed split luciferase system from firefly luciferase-based system to NanoLuc-based NanoBit system and I succeeded reduce unexpected response. Now I continue to develop convenient DNA-damage response-detection system using NanoBit-based split luciferase for much convenience.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷修復

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷には様々な種類の損傷があることが知られているが、その中でも、DNA 二重鎖切断 (double-strand-break : DSB) は最も生物作用に大きな影響を及ぼすと考えられている。この DNA 二重鎖切断は主に、非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) と呼ばれる、正確性が低く変異を誘発しやすいものの、素早く働く修復機構と、相同組み換え (homologous recombination: HR) と呼ばれる、NHEJ と比較して、遅いが正確性の高い修復機構の 2 種類の修復機構によって修復される。

これら 2 つの DNA DSB 修復経路の使い分けに、細胞周期などが関与することが知られている。しかしながら、NHEJ と HR、2 つの修復経路が腫瘍組織内において、様々な治療に対してどのように使い分けられているのかについては、未だ明らかになっておらず、抗がん剤や放射線治療などに対する抵抗性が、どのような細胞で、どのようなメカニズムによってもたらされているのか未だ明らかになっていない。

しかしながら、これまでの DNA 損傷や修復を検出する系は、細胞や組織を固定し、DNA 損傷マーカーを免疫染色などで検出する方法が主に用いられており、経時的な観察や定量的な解析が困難であり、特に腫瘍組織のような複雑かつ刻一刻と変化する微小環境下で、DNA 損傷がどのように発生し修復されるか、その過程を測定することは事実上不可能であった。

2. 研究の目的

上記の問題点を解決するためには、DNA 損傷や 2 種類の修復経路の活性を腫瘍内など生体組織内で経時的に・かつ定量的に検出できる系が必要である。

このことから我々は、定量的に優れ、細胞や動物を殺すことなく検出可能な発光タンパク質であるルシフェラーゼを用いて、DNA DSB および NHEJ、HR をそれぞれ定量的・経時的に検出できる系の構築を目指す。この系を用いて腫瘍を抗がん剤や放射線で処理した時の DNA 損傷やその修復過程を経時的に観察するとともに、そこで得られた知見を基に、放射線の分割照射タイミングの最適化を行うことや、DNA 損傷修復の阻害剤を投与することで、治療効果の増強を目指す。以上の研究を通じて、がんの抗がん剤や放射線に対する抵抗性の克服につながるデータを収集することを目的とした研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 分割ルシフェラーゼを用いた DNA 損傷修復活性依存的にルシフェラーゼ活性を発揮するたんぱく質を発現する細胞の作製

ルシフェラーゼは特定の位置で二分割すると、その活性が失われるが、分割した二つの断片が近接すると再構成することで活性が回復することが知られている。本研究ではこの特性を利用して、ホタルルシフェラーゼ、もしくは NanoLuc を分割したものと、DNA DSB および NHEJ、HR に関わる因子を融合した融合遺伝子を作成した。該当遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて HeLa 細胞や 293TN 細胞に導入、該当遺伝子を恒常的に発現する細胞株を作成した。

(2) DNA 損傷修復活性を *in vitro* で経時的に測定する系の構築

上記で作成した細胞を 96 well plate に播種し一晩培養した後、基質となる luciferin を培養液に加え、30 分毎に plate reader を用いて測定、測定開始より 1 時間後の測定の後、DNA

損傷を誘導する薬剤を加え、測定を継続、発光の経時変化を測定した。

(3) DNA 損傷発現を *in vivo* で経時的に測定する系の構築

上記で作成した細胞を nude マウス皮下に移植し固形腫瘍を作成した。移植したマウスに luciferin K (10mg/mL in PBS) を 100 μ L i.p.を行い、10 分後に IVIS を用いて発光量の測定を行った。その後、ガンマセルを用いて線 6Gy を照射、照射後各タイムポイントにおいて luciferin K (10mg/mL in PBS) を 100 μ L i.p.を行い、10 分後に IVIS を用いて発光量を経時的に測定した。

4. 研究成果

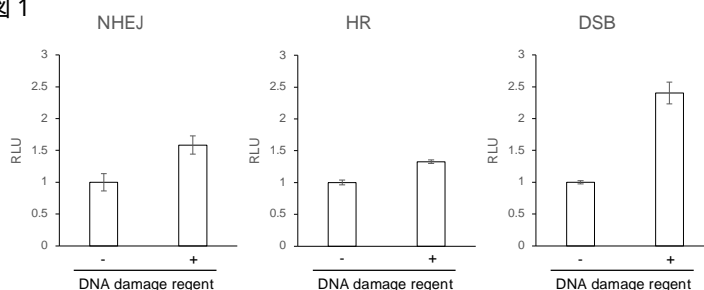
(1) ホタルルシフェラーゼを基にした分割ルシフェラーゼを用いた DNA 損傷修復検出系の構築

DNA 二本鎖切断や DNA 二本鎖切断修復経路を特異的に検出することが可能なレポーター遺伝子のセットを作成するために、分割ルシフェラーゼと融合するタンパク質の候補を、DNA 二本鎖切断発生時に集積するマーカーとして使用されているタンパク質や、各損傷修復経路特異的に集積するタンパク質の中から選出を行った。

上記で選出したそれぞれのタンパク質とホタルルシフェラーゼを基にした分割ルシフェラーゼと融合したタンパク質を作成するにあたり、分割ルシフェラーゼの N 末端側と C 末端側を、選択したタンパク質の N 末端側、C 末端側のどちらに結合させるかの組み合わせや、分割ルシフェラーゼとタンパク質の間のリンカーの有無によって、それぞれにおいてどの組み合わせが DNA 損傷を誘発する薬剤処理によるルシフェラーゼ活性上昇が最も大きいかを検討した。検討の結果、最も薬剤処理によるルシフェラーゼ活性上昇が大きかったものについて、融合タンパク質を恒常的に発現させるためのレンチウイルスベクターの構築を行った。

上記で最も効率が高かったものを用いて構築したレンチウイルスベクターを用いて、融合タンパク質を恒常的に発現する細胞を作成し、同一細胞を用いて DNA 損傷を誘発する薬剤の投与や除去によるルシフェラーゼの活性変化を確認した。その結果、それぞれの融合タンパク質を恒常的に発現する細胞において、薬剤投与によるルシフェラーゼの活性上昇、および薬剤除去による上昇した活性がベースラインまで低下することを確認出来たことから、レポーター遺伝子が DNA 二本鎖切断および修復活性を特異的に検出可能であることが示唆された(図 1)。

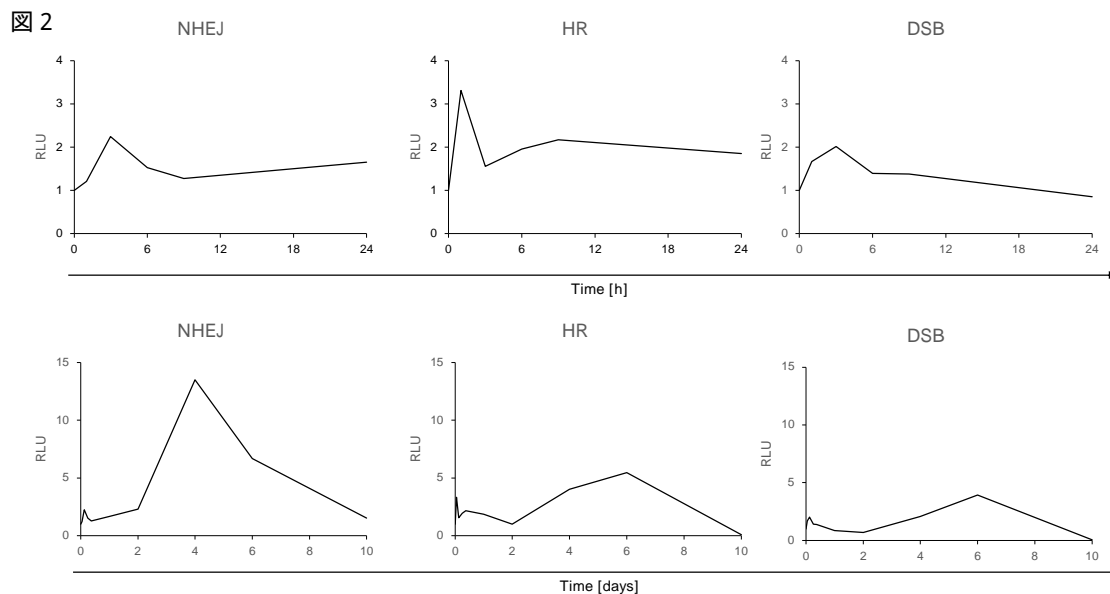
図 1



(2) 分割ルシフェラーゼ系を用いた *in vivo* における DNA 損傷修復活性の検出

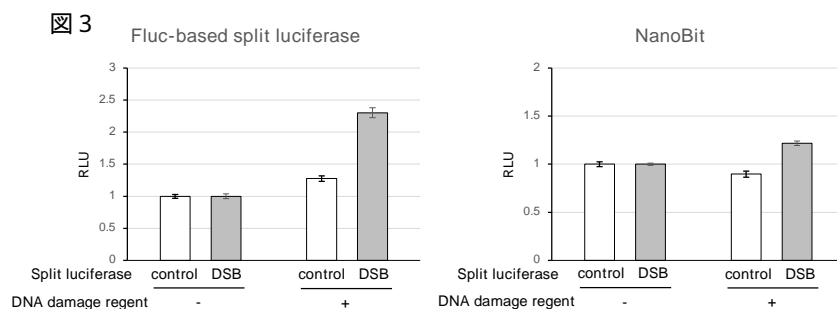
上記実験で作成した分割ルシフェラーゼ融合遺伝子を恒常的に発現する細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍を作成した。作成した担がんマウスに対して放射線照射を行い、マウスに対して放射線照射後、様々なタイムポイントでルシフェリンを投与することで、腫瘍組織における放射線照射後の発光強度の変化を計測した。その結果、放射線照射後に一過的にル

シフェラーゼの発光強度が増加し、その後減少するという、過去の知見と一致する結果が得られた。さらに、長期的な観察でも発光強度の変動が観察された(図2)。これらの結果から、作成した分割ルシフェラーゼ融合遺伝子が DNA 損傷修復応答を *in vivo* でも観察できることが示唆された。



(3) NanoBit による DNA 損傷修復検出系の最適化

上記の結果の一方で、実験を実施している過程で、ホタルルシフェラーゼを基にした分割ルシフェラーゼを用いた系は温度によって大きく変化すること、また分割ルシフェラーゼのみを発現する陰性対象群でも薬剤添加によって活性が変化してしまい、目的の減少を特異的に検出するのに支障をきたす問題が見出された。この問題を解決するために、分割ルシフェラーゼをホタルルシフェラーゼ由来のものから PROMEGA 社から販売されている NanoLuc を基にした分割ルシフェラーゼシステムである NanoBit システムを利用して作成した融合遺伝子を工場発現する細胞を作成した。その結果、非特異的な反応を低減することが出来た(図3)。一方で特異的な反応も減弱してしまったため、さらなる系の改善を目指し検討を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koyasu Sho, Horita Shoichiro, Saito Keisuke, Kobayashi Minoru, Ishikita Hiroshi, Chow Christalle CT, Kambe Gouki, Nishikawa Shigeto, Menju Toshi, Morinibu Akiyo, Okochi Yasushi, Tabuchi Yoshiaki, Onodera Yasuhito, Takeda Norihiko, Date Hiroshi, Semenza Gregg L, Hammond Ester M, Harada Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 ZBTB2 links p53 deficiency to HIF-1-mediated hypoxia signaling to promote cancer aggressiveness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e54042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202154042	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 -

1. 著者名 Haitani Takao, Kobayashi Minoru, Koyasu Sho, Akamatsu Shusuke, Suwa Tatsuya, Onodera Yasuhito, Nam Jin-Min, Nguyen Phuong Thi Lien, Menju Toshi, Date Hiroshi, Ogawa Osamu, Harada Hiroshi	4. 巻 528
2. 論文標題 Proteolysis of a histone acetyl reader, ATAD2, induces chemoresistance of cancer cells under severe hypoxia by inhibiting cell cycle progression in S phase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 76 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.12.028	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 -

1. 著者名 Suwa Tatsuya, Kobayashi Minoru, Shirai Yukari, Nam Jin-Min, Tabuchi Yoshiaki, Takeda Norihiko, Akamatsu Shusuke, Ogawa Osamu, Mizowaki Takashi, Hammond Ester M., Harada Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e148135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.148135	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 Shirai Yukari, Chow Christalle C. T., Kambe Gouki, Suwa Tatsuya, Kobayashi Minoru, Takahashi Itsuki, Harada Hiroshi, Nam Jin-Min	4. 巻 13
2. 論文標題 An Overview of the Recent Development of Anticancer Agents Targeting the HIF-1 Transcription Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2813 ~ 2813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13112813	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 Suwa Tatsuya, Kobayashi Minoru, Nam Jin-Min, Harada Hiroshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Tumor microenvironment and radioresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-021-00640-9	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 灰谷 崇夫、小林 稔、原田 浩
2. 発表標題 Decreased expression levels of a histone acetyl reader, ATAD2, induces chemoresistance of cancer cells under severe hypoxia by inhibiting cell cycle progression in S phase
3. 学会等名 第18回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤田 直也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 がん微小環境に1細胞レベルで挑む	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院 生命科学研究科 がん細胞生物学分野 http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/</p>

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	原田 浩 (Harada Hiroshi) (80362531)	京都大学・生命科学研究科・教授 (14301)	

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