

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570180

研究課題名（和文） DNA 損傷回復制御機構の解明：細胞は如何にして DNA 損傷から回復するのか？

研究課題名（英文） Defining the molecular mechanism of checkpoint recovery from DNA damage.

研究代表者

小西 昭充（KONISHI AKIMITSU）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：50381877

研究成果の概要（和文）：遺伝情報を保存している染色体 DNA の損傷は細胞生存に有毒なため、DNA に損傷が加わると損傷応答システムが起動し修復にあたる。しかし、損傷が修復された後は起動していたシステムを終了させる必要がある。本研究は、どうやって細胞が DNA 損傷応答システムを終了させて元通りに回復していくか仕組みを明らかにした。

さらにこの回復を妨げる薬剤が癌細胞の増殖を妨げることを見いだした。これらの発見は新しいタイプの抗がん剤の開発につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This project aims to understand how cells recover from DNA damage and to define the therapeutic potential for anti-cancer drug. We identified the inhibitors for the DNA damage recovery processes and revealed their molecular mechanism. Moreover, our newly identified drugs could inhibit the tumor cell growth. These findings will contribute to develop a novel strategy against cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、DNA 損傷チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の収納された染色体 DNA の損傷は細胞にとって非常に有害であり、DNA 損傷を感知して傷の修復を行う DNA 損傷応答システムは高度に保存された必須の生命システムの一つである。染色体 DNA の損傷

がおこると、損傷チェックポイントが活性化され、DNA 修復と細胞周期のコントロールをコーディネートして損傷部位の修復を行う。その後、損傷部位の修復が正しく完了すると、細胞は停止させていた細胞周期を再開させ、もとの状態に復帰する。

損傷チェックポイントの活性化機構、DNA 修復、細胞周期コントロールにいたる経路の解析は進んでいるが、DNA 修復が終了した後、細胞周期がどのように再開していくかの分子メカニズムは、ほとんどわかっていない (図 1)。

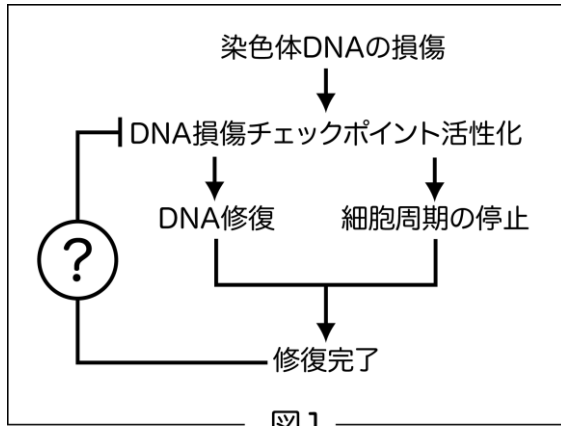


図 1

2. 研究の目的

本研究は細胞がどのようにして染色体 DNA が正しく修復されているかを感知し、細胞周期を正常化していくのかという問題について取り組んだ。

研究期間内で、次の 3 つのポイントの解明を目指した。

- (1) DNA 損傷からの回復経路に関与する因子の探索
- (2) DNA 損傷回復経路の果たす生理的役割についての解析
- (3) DNA 損傷回復経路の制御による抗腫瘍効果への検討

3. 研究の方法

(1) 細胞周期回復機構関連分子の同定

回復機構を阻害する低分子化合物のスクリーニングによってこの経路に関与する分子を同定する。

(2) 細胞周期回復機構の生理的役割

(1) により同定された分子について、その特異的阻害剤、RNAi による機能阻害を行い、DNA 損傷反応、DNA 損傷回復機構における機能を調べ、細胞周期回復機構が果たす生理的役割を解明する。

(3) 回復機構の制御による抗腫瘍効果の検討

細胞周期回復機構が破綻した場合、非可逆的な増殖停止や細胞死が誘導されることが予測される。(1) の低分子化合物スクリー

ング候補化合物による抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* での解析により検討する

4. 研究成果

(1) 細胞周期回復機構関連分子の同定

約 12,000 種の低分子化合物ライブラリーを用いたケミカルスクリーニングを行った。その結果、細胞周期回復機構を阻害する候補化合物 33 種類を同定した (図 2)。

この最終候補化合物に関してケミカルデータベースを用いた解析を行い、複数の化合物が共通して標的とする細胞周期回復機構に関与する候補因子 1 種類 (以下 CTF と略す) を同定することが出来た。

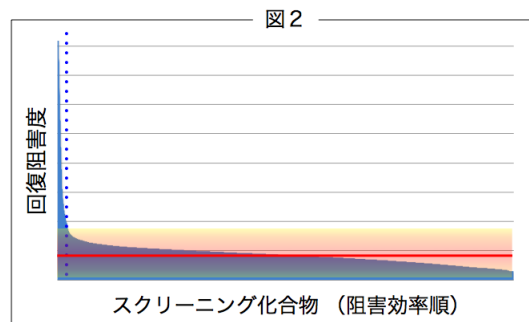


図 2

(2) 細胞周期回復機構の生理的役割

特異的阻害剤を用いて CTF の活性を阻害すると、DNA 二本鎖損傷および DNA 複製ストレスによる DNA 損傷チェックポイントの回復が著明に阻害された (図 3)。

RNAi 法により CTF の発現を抑制すると DNA 二本鎖損傷による DNA 損傷チェックポイントの回復が著明に遅延した。この阻害効果は DNA 修復反応には非依存的であった。

これらの結果からこの候補因子が DNA 損傷からの細胞周期回復機構を特異的に制御する分子であることを明らかにした。

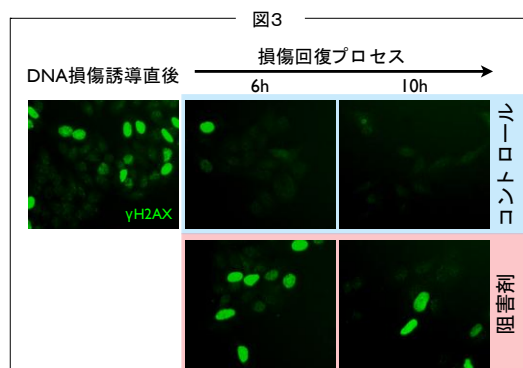
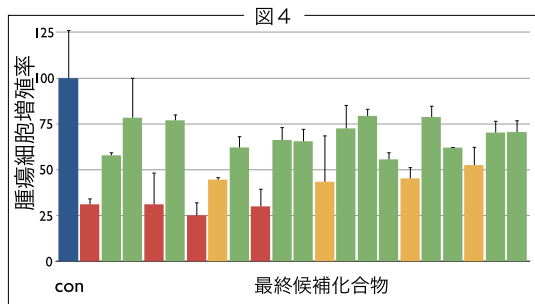


図 3

(3) 回復機構の制御による抗腫瘍効果の検討

ケミカルスクリーニングにより同定した最終候補化合物についてその腫瘍細胞増殖抑制能を解析した。解析の結果、DNA 損傷チェックポイントの回復を阻害する化合物の多くは、単独で著明な腫瘍細胞増殖抑制効果を有していた (図4)。



詳細な解析により、腫瘍細胞増殖抑制は DNA 複製時に DNA 損傷チェックポイントの活性化が亢進されたためであることが分かった。さらに、マウス癌移植モデルを用いた解析から候補化合物のうち、個体レベルで腫瘍増殖を抑制する化合物を同定することができた。

以上の結果から、本研究では細胞周期回復機構に対する複数の低分子化合物、およびその標的となる細胞周期回復機構に関与する分子の同定に成功した。さらに、本研究で同定された低分子化合物による腫瘍増殖抑制効果の解析結果から、細胞周期回復機構が新しい抗癌剤ターゲットとなる可能性を示すことが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., and Tsujimoto, Y. (2010). Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070-2082. (査読有り)
- ② Konishi, A., Arakawa, S., Yue, Z., and Shimizu, S. (2012). Involvement of beclin 1 in engulfment of apoptotic cells. *J Biol Chem* 287, 13919-13929. (査読有り)

[学会発表] (計8件)

[招待講演]

- ① Konishi A., 「Checkpoint Recovery from

DNA damage」, MEXT Priority Research Project 国際シンポジウム, 2010年11月6日、名古屋

- ② Konishi A., 「Checkpoint recovery from DNA damage」, 日本癌学会学術集会, 2012年9月21日、札幌
- ③ Konishi A., 「DNA 損傷チェックポイントの回復機構」, 日本分子生物学会年会, 2012年12月11日、福岡

[一般講演]

- ④ 小西昭充、荒川聡子、清水重臣、『オートファジー因子 Beclin1 によるアポトーシス細胞除去の制御』, 日本 Cell Death 学会, 2010年7月31日、名古屋
- ⑤ Konishi A., Shimizu S, de Lange T, 『TRF2 BASIC DOMAIN INTERACTS WITH NUCLEOSOMAL HISTONES TO STABILIZE CHROMOSOME ENDS』, 分子生物学会年会, 2010年12月8日、神戸
- ⑥ 小西昭充、清水重臣、Titia de Lange、『TRF2 BASIC DOMAIN INTERACTS WITH NUCLEOSOMAL HISTONES TO STABILIZE CHROMOSOME ENDS』, 研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2011年6月9日、東京
- ⑦ Konishi A., Shimizu S, de Lange T, 『TRF2 BASIC DOMAIN INTERACTS WITH NUCLEOSOMAL HISTONES TO STABILIZE CHROMOSOME ENDS』, 分子生物学会年会, 2011年12月15日、横浜
- ⑧ 小西昭充、清水重臣、Titia de Lange、『テロメア結合蛋白 TRF2 のコアヒストンとの相互作用による染色体末端安定化機構』, 染色体ワークショップ, 2012年1月25日、仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 昭充 (KONISHI AKIMITSU)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：50381877

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

