

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390289

研究課題名(和文) エピジェネティクス依存的発現分子による放射線感受性の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of radiation sensitivity by molecules expressed in epigenetics-dependent manners

研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA, Kiyoshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40200133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクス依存的な機序で体細胞に発現する分子が放射線などによるゲノム損傷に応答する機構に影響を及ぼす可能性を探るために、減数分裂特異的分子の体細胞における機能を解析した。その結果、その一つのタンパク質であるSYCE1は、一部のがんで発現していることが判明し、その発現はゲノム損傷応答を活性化し、相同組換え修復と非同源末端結合によるDNA二本鎖切断修復を促進することによって、放射線抵抗性を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To explore the possibility that molecules expressed in somatic cells in epigenetics-dependent manners affect the machinery responding to DNA damage induced by radiation and others, we investigated roles of meiosis-specific molecules in somatic cells. Our studies revealed that the meiosis-specific protein SYCE1 is expressed in some types of cancers and induces tolerance to radiation by promoting DNA double-strand break repair mediated by homologous recombinational repair and by nonhomologous end-joining through activation of the genome damage response.

研究分野：医学

キーワード：放射線治療生物学 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ゲノム損傷応答・修復の分子機構の研究は、放射線感受性を制御する重要な分子を同定することによって、それらに対する阻害剤を開発し、放射線増感によって治療の効果を高めることを目的としてきた。しかし、これらの研究の格段の進展にも関わらず、臨床応用では期待されるべき成果が得られていない。この問題を解決するために、本研究は、定常的には発現せずにエピジェネティックな原因によって一時的にがんが発現する分子の、生物学的意義を解明するものである。

このような、エピジェネティックな原因によって発現する分子の解析は、発生や分化、がんなどの疾患研究においては精力的に進められているが、放射線感受性の制御機構を理解するための基盤となるゲノム損傷応答・修復の領域においては、国内・国外においていまだに未開拓の分野である。他の領域では、エピジェネティクスの重要性が確立されつつあることから、ゲノム損傷応答・修復においても、今後重点的に研究を推進すべき課題と考えられている。このような背景から、本研究は同領域においては先駆的な位置づけがなされる。

2. 研究の目的

ゲノム損傷応答・修復は放射線感受性を制御する重要な機構であり、その主要な構成分子と情報伝達経路の解明は着実に進行している。これらの研究によって同定された分子は、すべて定常的に発現しているものであり、それらがゲノム損傷に応答して量的あるいは質的な変化が生じることが知られている。

一方、定常的には発現しない分子が、メチル化の異常などのエピジェネティクス依存性に発現する現象の存在が一般的には知られているが、ゲノム損傷応答・修復において、この存在と機能はほとんど解明されていない。このような分子が、定常的に発現しているどの分子に影響を及ぼして、放射線感受性をどのように修飾するのかを解明することによって、放射線治療の新たな増感法を開発するための基盤を確立することを、本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 減数分裂特異的分子の発現解析

定常時には体細胞においては発現しないが、がん化の過程においてはエピジェネティックな機序によって発現する可能性のある分子として、減数分裂特異的に発現する分子に着目し、その発現パターンを正常体細胞と各種のがん細胞株において解析する。

(2) ゲノム損傷作用に対する感受性試験

放射線感受性に影響を与える可能性のある減数分裂特異的発現分子の、体細胞におけるゲノム損傷に対する感受性試験を行う。そのために、精巣 RNA より解析の対象となる

遺伝子の cDNA を合成し、発現ベクターを複製する。次に、ヒト網膜正常上皮細胞(RPE)に、これらの発現ベクターを導入し、解析対象分子の発現細胞を得る。ノックアウト実験では、解析対象分子が発現しているがん細胞に siRNA を導入し、有意に発現が低下することを確認して、感受性試験を行う。感受性試験では、細胞を放射線、DNA 架橋剤等の抗がん剤で処理後に、低密度で培養を継続し、1 から 2 週間後に形成されるコロニーを計数することによって、生存率を評価する。

(3) ゲノム損傷応答経路の解析

エピジェネティックな機序によって発現する分子が、既知のゲノム損傷応答・修復機構のどの部位に作用して、結果として感受性を亢進させるのか、逆に抵抗性をもたらすのかを解明するために、これらの表現型の発現に最も直接的な影響を及ぼす関連分子の機能の評価を行う。ゲノム損傷の中で最も重篤なものは、DNA 二本鎖切断であり、それに対する主な修復機構として、非同相末端結合と相相組換え修復の2つの経路が知られている。これらの経路の変化を調べるために、前者においては 53BP1 の、後者においては RAD51 の核内フォーカス形成を、これらの抗体による蛍光免疫によって評価する。これらのどちらかで変化が確認された場合には、ゲノム損傷応答情報伝達経路の上流に存在する ATM の機能を、その自己リン酸化を反映するウェスタンブロット法によって解析する。

4. 研究成果

(1) 減数分裂特異的分子の発現

減数分裂特異的な構造で、父由来染色体と母由来染色体の組換えを行う際に形成されるシナプトネマ複合体を構成する分子の発現をスクリーニングしたところ、SYCE1 遺伝子の発現が線維肉腫と肺腺癌の細胞株で認められ、他のがん細胞と正常細胞では発現が極めて低レベルであることが判明した。

(2) SYCE1 のゲノム損傷感受性への影響

ゲノム損傷作用に対する感受性試験においては、SYCE1 が導入された正常細胞 RPE は、コントロールと比較して、約 1.5 倍の放射線抵抗性を示した。また、同細胞はシスプラチンに対しても、約 1.5 倍の抵抗性を示した。次に、これらの結果を確かめるために、SYCE1 が発現している線維肉腫細胞株においてノックダウン実験を行った。その結果、SYCE1 のノックダウンによって、放射線とシスプラチンに対する細胞の感受性が約 2 倍亢進することが判明した。これらの結果は、SYCE1 の発現は放射線とシスプラチンに対する体細胞の抵抗性を誘導することを示唆する。

(3) SYCE1 の DNA 修復への影響

相同組換え修復における中心的な分子である RAD51 の核内フォーカス形成は、放射線照射後に、SYCE1 発現細胞においてコントロール細胞よりも増加した。同様に、非相同末端結合を促進する 53BP1 の核内フォーカス形成は、放射線照射後に、SYCE1 発現細胞においてコントロール細胞よりも増加した。これらの結果は、SYCE1 の発現は、DNA 二本鎖切断に対する主要な 2 つの修復経路である相同組換え修復と非相同末端結合の両者を促進することを示唆する。

(4) SYCE1 のゲノム損傷応答への影響

ゲノム損傷応答において DNA 二本鎖修復機構の上流に存在する ATM の自己リン酸化は、SYCE1 発現細胞においてコントロール細胞よりも亢進した。そのために、ATM 阻害剤を用いて、上記の細胞表現型の ATM 機能低下による変化を検討した。その結果、SYCE1 発現によって亢進した放射線抵抗性は減弱するとともに、増加した RAD51 の核内フォーカス形成も低下することが判明した。これらの結果より、SYCE1 の発現は ATM の活性化を促進することによって DNA 二本鎖切断に対する修復機能を増強し、放射線やシスプラチンに対する抵抗性を誘導することが想定された。

(5) SYCE1 の発現機序

SYCE1 を含む減数分裂特異的分子は、通常は体細胞においては発現が抑制されているが、これはメチル化による発現制御によるものと考えられている。がん細胞でこれらが発現する場合には、低メチル化が原因と考えられており、これはエピジェネティクスの重要な機序である。したがって、メチル化を制御する機構が変化することによって、このようなエピジェネティック依存的発現分子が異所性に発現することが、放射線抵抗性の一つの機序となっていることが示唆された。

(6) ATM 機能の多様性と選択性

本研究においては、ATM の過剰な活性化が、放射線抵抗性の原因となることが示されたが、ATM の多様な機能を考慮すると、その下流に存在する経路の選択性が問題になる。たとえば、ATM はそのリン酸化活性によって 100 種類以上もの異なるタンパク質をリン酸化することが知られているが、その中には代表的ながん抑制分子である p53 があり、ATM は p53 を介して細胞周期の進行を制御するとともにアポトーシスも誘導する。SYCE1 が発現した場合には、現時点で細胞周期やアポトーシスの変化は観察されていないことから、その発現は多様な ATM の機能の中で、DNA 二本鎖切断に対する修復機能を選択的に活性化しているものと考えられる。

(7) SYCE1 と ATM の関係

SYCE1 と ATM の関係については、これらのタンパク質による複合体形成が観察されていないことから、現時点では直接的ではなく、間接的であると考えられる。そのために、間接的な関係を媒介する機序を理解することが次の課題となる。ATM はゲノム損傷が生じてから分のオーダーで急速に活性化が進行するため、SYCE1 が関係する ATM の活性化はそれよりも早い時期に存在する機序に対するものであると考えられる。それらの中では、クロマチン構造の変化が重要な役割を果たしていることが知られるようになったために、今後はこの現象を制御する機構の理解が必要になる。

(8) まとめと今後の展望

放射線治療の有効性を高めるために、物理工学的アプローチによって治療の高精度化が近年急速に発展しているが、今後は生物学的アプローチの実用化が課題となる。そのために、放射線の細胞への影響において最も古くから知られているゲノム損傷に対する生体の作用を理解することは必要不可欠である。これまで、その作用を媒介する分子機構の解明が進んできたが、それらはすべて体細胞において発現することが前提とされる分子を対象としてきた。それに対して、本研究は、体細胞においては通常発現していない分子でも、エピジェネティックな機序によって発現した場合には、放射線抵抗性を誘導することを示したものであり、この領域のこれからの研究対象をさらに拡大することにも貢献するものである。このような分子のがん治療における利点は、がん細胞には発現しているも、正常細胞では減数分裂を行っている生殖細胞を除いては発現が極めて低レベルであるために、その障害はがん細胞特異的に行うことが可能であることである。

これまでの放射線治療の高精度化においては、正常とがんとの区別が大きな課題であったが、本研究の成果は、生物学的アプローチによってその区別が可能となることを示唆するものである。本研究では、一つの分子の機能を追求することによってこのような方向性を示すことができたが、同じような機能を有した分子は他にも存在するものと考えられる。がん細胞における全般的な遺伝子発現の異常は、このような分子が症例毎に複雑に発現する可能性を意味するものであり、その組み合わせによる生物学的効果が、最終的には治療の標的になるものと考えられる。その点において、ATM がその上流と下流とのハブ的な役割を果たしていることが知られているために、その機能の選択性がなぜ生じているかを解明することが重要である。ATM そのものは巨大な分子であり、その機能の多様性を各ドメインによって分担するための分子レベルの容量は、十分に大きいものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Takaaki Yasuhara, Takahiko Suzuki, Mari Katsura, Kiyoshi Miyagawa: Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. *Nature Communications*, 5, 5426, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms6426

Noriko Hosoya, Kiyoshi Miyagawa: Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Science*, 105, 370-388, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/cas.12366

Yoshihiro Fujii, Matthew D. Genet, Erica J. Roybal, Nobuo Kubota, Ryuichi Okayasu, Kiyoshi Miyagawa, Akira Fujimori, Takamitsu A. Kato: Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks. *Oncology Reports*, 29, 2133-2139, 2013. 査読有
DOI: 10.3892/or.2013.2354

Atsushi Enomoto, Takemichi Fukasawa, Nobuhiko Takamatsu, Michihiko Ito, Akinori Morita, Yoshio Hosoi, Kiyoshi Miyagawa: The HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radiosensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition. *European Journal of Cancer*, 49, 3547-3558, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejca.2013.06.034

Stefan C. Genet, Yoshihiro Fujii, Junko Maeda, Masami Kaneko, Matthew D. Genet, Kiyoshi Miyagawa, Takamitsu A. Kato: Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner. *Journal of Cellular Physiology*, 228, 1473-1481, 2013. 査読有
DOI: 10.1002/jcp.24302

〔学会発表〕(計 4 件)

細谷 紀子、宮川 清: がんにおける非遺伝子変異的プロセスによる DNA 損傷応答シグナルの制御機構. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Noriko Hosoya, Kiyoshi Miyagawa: The cancer-testis antigen SYCE2 promotes DNA double-strand break repair through activation of ATM. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 09 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Kiyoshi Miyagawa: DNA repair and cancer therapy. The 3rd Asian Congress of Radiation Research. 2013 年 05 月 11 日, Beijing International Convention Center, Beijing (China)

細谷 紀子、宮川 清: The role for a meiosis-specific protein in regulating DNA damage response and chromosome stability in cancer. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、札幌市教育文化会館 (北海道札幌市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA, Kiyoshi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40200133