

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24710061

研究課題名(和文) 抗がん剤によるDNA二本鎖切断の修復経路操作と細胞死誘導の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell death and repair pathway choice of DNA double-strand breaks caused by anti-cancer drug

研究代表者

逆井 良 (Sakasai, Ryo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10549950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの二本鎖切断(DSB)は非常に細胞毒性の強いDNA損傷であり、抗がん剤によっても誘導され、がん細胞を殺す目的で使用される。抗がん剤カンプトテシン(CPT)は、増殖している細胞においてDNAの複製を介してDSBを誘導する。しかし、DNA複製を介したDSB(RM-DSB)に対する細胞応答はよくわかっていなかった。本研究では、RM-DSBの修復経路の制御メカニズムを解析した結果、翻訳後修飾の一つであるユビキチン化を調節する因子であるUbch5cがRM-DSBの修復経路に関与しており、染色体異常を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand breaks (DSBs) are severe DNA damage that can be caused by anti-cancer drug to kill cancer cells. Camptothecin (CPT) causes DSB via DNA replication in growing cells. However, cellular responses to DNA replication-mediated DSB (RM-DSB) had not been revealed. In this study, we analyzed regulatory mechanisms of RM-DSB repair pathway and discovered that Ubch5c, a E2 ubiquitin-conjugating enzyme, is involved in NHEJ pathway of RM-DSB repair leading to chromosomal aberration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA二本鎖切断 非相同末端連結 相同組換え カンプトテシン ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

放射線等による DNA 二本鎖切断 (DSB) は非常に細胞毒性が強く、迅速かつ適切に修復される必要がある。DSB は大きく、非相同末端連結 (NHEJ) と相同組換え (HR) の二つの経路で修復され、いずれの経路も DSB に対する細胞生存に重要な機構である (図 1)。

一方、DNA 複製を介した DSB (Replication-Mediated DSB: RM-DSB) の場合は、DNA 末端を一つしか持たないため、NHEJ 経路がキャンセルされて HR が優位に働くことで修復されると考えられている。NHEJ が RM-DSB の修復に関与した場合には染色体異常を引き起こし、細胞死を招く事が示唆されている (図 1)。

カンプトテシン (CPT) は、topoisomerase I を阻害して、効率的に RM-DSB を誘導する抗がん剤であり、RM-DSB に対する修復経路についての知見や、効率的な細胞死誘導は、がん化学療法の機序や効果を考える上で非常に重要となる。

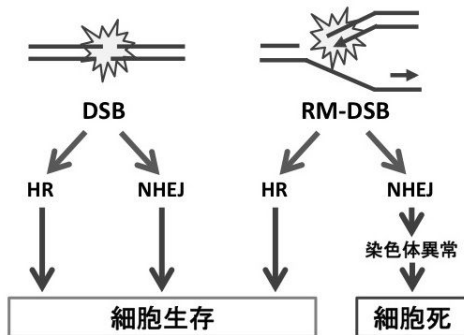


図1 修復経路による細胞運命の違い

2. 研究の目的

本研究では、RM-DSB に対する修復経路選択の制御因子を明らかとし、その操作により NHEJ を誘導する事で、効率的な細胞死誘導系の構築を目指す。本研究では二つのアプローチから NHEJ への誘導を試み、細胞運命への影響を検討する。

(1) NHEJ が抑制されることで細胞が CPT に対し抵抗性になる事が報告されており、NHEJ のキャンセルを阻害する事で、HR 経路が抑制され、NHEJ を介した細胞死を誘導できる可能性が考えられる。そこで、HR 抑制因子である 53BP1 に注目し、53BP1 を RM-DSB 部位へとどめ NHEJ を誘導するための因子を同定し、NHEJ への誘導について解析する。

(2) 一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA のリン酸化が HR に抑制的に働くことが示唆されており、上流のキナーゼ DNA-PK の活性化がプロテアソーム阻害剤で抑制されることから、ユビキチン化因子が DNA-PK-RPA 経路を介して HR を抑制している可能性が考えられる。そこで、ユビキチン化因子を同定し、RM-DSB の修復経路への影響について解析する。

(3) 上記 1 および 2 の研究で見出された因子が、実際に抗がん剤感受性に影響しうるか

どうか、細胞死誘導能の確認と、染色体異常の誘発について解析する。

3. 研究の方法

本研究では RM-DSB に注目し、RM-DSB 修復経路を操作し、効率的な細胞死誘導系を構築するため、(1) NHEJ キャンセルの抑制による NHEJ 誘導の解析、(2) HR 抑制による NHEJ 誘導の解析、(3) 修復経路選択の破綻による細胞死誘導の解析、の 3 点について解析を行う (図 2)。

(1) NHEJ キャンセル阻害による NHEJ 誘導の解析: これまでの報告から、DNA 末端に集積した 53BP1 が DNA 末端の削り込み反応 (DNA end resection) をブロックしていると考えられる。DSB への 53BP1 の局在は、DNA 損傷後のヒストン H2A の poly-Ub 化、及び、H4Lys20 のジメチル化 (H4K20me2) が必要である。そこで、脱ユビキチン化/メチル化の阻害が 53BP1 を RM-DSB へ留まらせ (53BP1-trap)、HR の抑制と NHEJ の亢進が促されるか、以下の様に解析する。

ヒストン H2A 脱ユビキチン (Ub) 化因子と 53BP1-trap の解析: 最近、OTUB1 や BRCC36 及び USP3 が H2A の poly-Ub 化の抑制や分解に関与する事を示唆する報告がなされた。これらの因子が H2A の poly-Ub を抑制して、HR を誘起する可能性が考えられる。そこで、これらの因子を RNAi で抑制し、53BP1 の核内 foci、および、NHEJ マーカーとして DNA-PK の自己リン酸化 (活性化) で解析する。HR 経路については、End resection のマーカーである RPA34 の foci 及びリン酸化、Rad51 の foci 形成により解析する。

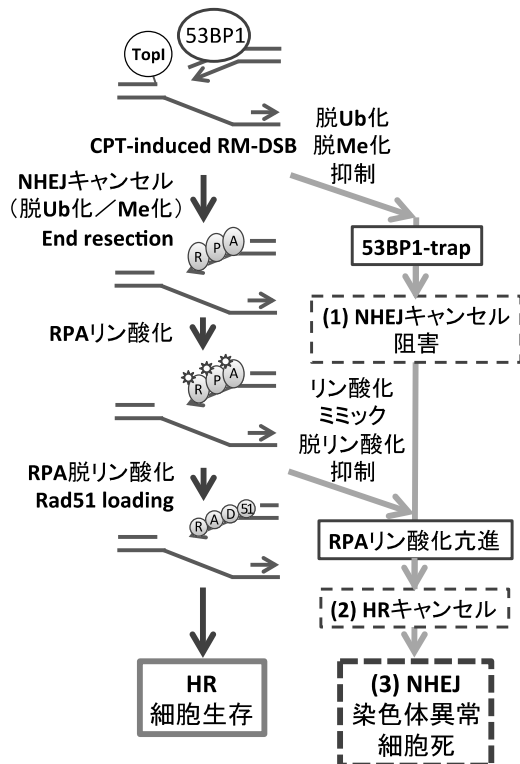


図2 細胞死誘導戦略スキーム

ヒストン脱メチル化酵素(HDM)の探索: H4K20me2 に関しては、53BP1 foci への必要性や責任酵素が示されているが、脱メチル化に関しては報告がない。メチル化リジン残基に対する HDM の LSD1 や JmjC といった共通のドメインを持つタンパク質に注目し、53BP1 foci や H4K20me2 を指標とした siRNA ライブラリー、及び、プロテオーム解析により、53BP1-trap の標的 HDM を探索する。候補因子について、脱 Ub 化因子と同様に NHEJ-HR 経路について解析を行う。

(2) RPA リン酸化による HR 抑制機構の解析: RPA34 の DNA-PK を含むキナーゼによるリン酸化が HR に対し抑制的に働くことが示唆されている。これらのリン酸化部位に変異を導入し、NHEJ-HR 経路選択への影響を研究(1)と同様に解析する。

また、Ub E3 リガーゼである RFWD3 が RPA リン酸化に関わる事、及び、DNA-PK 活性化がユビキチン・プロテアソーム系により制御されている事から、CPT による DNA-PK 活性化への RFWD3 の影響について、自己リン酸化を指標に RNAi により解析する。RFWD3 の関与が認められれば、NHEJ-HR 経路への影響についても同様の解析を行う。

(3) NHEJ-HR 経路操作が招く細胞死への影響解析: 脱ユビキチン化/メチル化の阻害及び RPA リン酸化亢進により、HR 経路の抑制及び NHEJ への誘導が見られた場合、CPT による細胞死が亢進するかどうか、CPT 感受性を解析する。また、抗がん剤として開発が進む PARP 阻害剤も RM-DSB により抗腫瘍効果を示すと考えられている事から、PARP 阻害剤についても同様の検討を行う。

さらに、NHEJ が染色体異常を引き起こす事が予想されるため、mitotic spread 法により、染色体異常についても解析する。また、NHEJ 因子の阻害剤や RNAi により、観察された染色体異常が NHEJ に依存しているかどうか明らかにする。

4. 研究成果

(1) 53BP1 に注目し、NHEJ キャンセル阻害を狙った 53BP1-trap に関しては、53BP1 の核内 foci の解析が難しく、当初の予定通りには進まなかった。

まず、ヒストン H2A のユビキチン化抑制因子群については、OTUB1 と BRCC36 について検討を行ったが、53BP1 foci に変化は見られなかった。この際に予想された変化は、53BP1 foci が遷延することであったが、53BP1 は一度 DSB 部位に集積したのち、徐々に周辺部位へと広がっていき、ドーナツ状になることが超高解像度顕微鏡を使った研究により明らかにされた(文献1)。したがって、53BP1 は一度集積してしまった後の foci の消失に関しては、解析が難しく、その解釈も難解になる。

同様の問題は、ヒストン脱メチル化酵素の同定においてもみられた。53BP1 foci を指標に

siRNA ライブラリーによるスクリーニングを予定していたが、上記理由から変更し、RPA のリン酸化を指標にスクリーニングを行った。DNA end resection が進んで HR へと流れれば、RPA のリン酸化は亢進することが予想された。本スクリーニングにより PHF8 が候補遺伝子として同定されたが、その後の確認実験では PHF8 をノックダウンしても CPT による DSB 応答に影響は見られなかったことから、現段階では 53BP1 の挙動を制御する HDM の同定には至っていない。RIF1 は、DSB 発生時に 53BP1 依存的に集積し、resection が進行すると外れると考えられる。そこで今後は、RIF1 foci を指標に再度スクリーニングを実施する予定である。

(2) RPA リン酸化をターゲットとした DSB 修復経路選択に関する解析については、まずは RFWD3 についての解析と、上流のキナーゼである DNA-PK を制御するユビキチン化因子の同定から進めており、リン酸化部位の変異体による解析までは進んでいない。

まず、RFWD3 に関しては、ノックダウンにより影響は見られず、RFWD3 以外の E3 リガーゼが DNA-PK-RPA 経路に関与すると考えられる。しかし、E3 リガーゼは非常に多くの遺伝子が存在することから、E2 ユビキチン結合酵素(36 遺伝子)に対して siRNA スクリーニングを行った。DNA-PK の自己リン酸化と RPA のリン酸化を指標にして実施し、UbcH5c を同定した。UbcH5c ノックダウン細胞では、CPT による RM-DSB 誘導時には DNA-PK の活性化および RPA のリン酸化が減弱したが、通常の DSB 誘導時には影響は見られなかったため、UbcH5c は RM-DSB に特異的な DNA-PK-RPA 経路制御因子と考えられる。UbcH5c は UbcH5 ファミリーに属し、他に UbcH5a, UbcH5b が存在し、DNA 配列も非常に近い。RT-PCR による解析から、使用した UbcH5c に対する siRNA は他の UbcH5 ファミリーにも作用しており、これらのことから、UbcH5c に限定的というわけではなく、UbcH5 ファミリーによる制御と考えられる。

(3) 細胞死および染色体不安定性についての解析は、まずは染色体異常の解析から行った。染色体異常は、CPT 処理後に M 期の細胞を回収して染色体標本を作成し、特に Radial chromosome について解析した。また、NHEJ の効果を観察しやすくするため、end resection 因子である CtIP をノックダウンした細胞を用いた。DNA-PK 阻害剤で処理することで Radial chromosome が減少したことから、NHEJ に起因する染色体異常であることを確認した。UbcH5c ノックダウン細胞でも、DNA-PK 阻害剤と同様に Radial chromosome が減少したことから、確かに UbcH5c は DNA-PK 経路の制御を介して、RM-DSB からの染色体異常を誘発しうると考えられる。さらに、53BP1 ノックダウンでも減少したことから、UbcH5c-DNA-PK 経路は 53BP1 依存的に染色体異常を引き起こし、細胞死を誘導していると

考えられる。

UbcH5c は非常に多機能な E2 コピキチン結合酵素であり、様々な細胞内機能に関与することが報告されている。そのため、細胞死の検討結果の解釈が難解になることが予想されたため、UbcH5c とともに働く E3 コピキチンリガーゼの探索を先に行い、E3 リガーゼが同定されたのちに細胞死の検討を進める予定である。なお、E3 リガーゼはすでに同定済みであり、CPT 感受性の検討へと進みたいと考えている。

本解析から UbcH5c 経路は NHEJ に関与することが示唆されるが、実際に RM-DSB の修復に NHEJ 経路がどの程度寄与するかについて、DNA 損傷マーカーである H2AX のリン酸化を指標に解析した。DNA-PK 阻害剤により NHEJ を抑制しても、特に修復に影響は見られなかったが、CtIP ノックダウン細胞では、DNA-PK 阻害剤の影響がみられ、end resection を抑えることで NHEJ へと修復経路が写っていることが確認できた。この結果は、CtIP ノックダウンで radial chromosome が観察しやすくなることと一致した結果である。興味深いことに、Rad51 ノックダウンにより HR 経路を抑制しても、RM-DSB の修復には影響はほとんど見られなかった。これまで、RM-DSB は主に HR で修復されると考えられてきたが、実際の寄与度はそこまで高くないのかもしれない。したがって、NHEJ でも HR でもない修復経路が主経路として存在している可能性が考えられる。この経路のメカニズムが明らかになれば、その関与因子は新たな抗がん剤の抗腫瘍効果奏功因子として期待される。

<引用文献>

1. Chapman JR et al. JCS (2013), 125, 3529

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1件)

Ryo Sakasai and Kuniyoshi Iwabuchi, The distinctive cellular responses to DNA strand breaks caused by a DNA topoisomerase I poison in conjunction with DNA replication and RNA transcription. Genes and Genetic Systems (2015) 187-194 査読有

[学会発表](計3件)

Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Mitsumasa Hashimoto, Kuniyoshi Iwabuchi, Ubiquitin-dependent activation of DNA-PKcs leads to chromosomal aberration in response to one-ended DNA double strand breaks. ICRR2015 平成 27 年 5 月 25 日～29 日 京都国際会館(京都府京都市)

Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Mitsumasa Hashimoto, Kuniyoshi Iwabuchi, Ubiquitin-dependent activation of DNA-PKcs in response to DNA replication-mediated DNA double strand breaks. The 9th 3R Symposium 平成 26 年 11 月 17 日～21 日 御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市)

逆井良、松井理、砂谷優美、橋本光正、岩淵邦芳、コピキチン化を介した DNA-PKcs 活性化機構、日本放射線影響学会第 57 回大会 平成 26 年 10 月 1 日～3 日 かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

[その他]

ホームページ等

<http://kmu-bc1.jimdo.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

逆井 良 (SAKASAI, Ryo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10549950

(2)研究協力者

柴田 淳史 (SHIBATA, Atsushi)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：30707633