

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22131006

研究課題名（和文）発がんとはん治療に影響を与えるクロマチンリモデリングの制御機構

研究課題名（英文）Chromatin remodeling regulation involved in carcinogenesis and cancer therapy

研究代表者

河野 隆志（Kohno, Takashi）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：80280783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,100,000円

研究成果の概要（和文）：がん化におけるクロマチン制御異常の意義を明らかにし、その異常を利用した新たながん治療法を考案することを目的とした。独自に構築した非相同末端結合修復アッセイ系を用い、CBP/p300によるヒストンアセチル化がBRGを含むSWI/SNF複合体のDNA切断部位への集積を促すという修復開始の機構を明らかにした。肺発がんを促すRETがん遺伝子融合の発生をもたらす、DNA切断と誤った修復の機序を明らかにした。ドライバーがん遺伝子異常のない肺がんではクロマチン制御遺伝子BRG1の欠損がしばしば生じており、当該がんの合成致死治療標的としてBRG1パラログのBRM-ATPaseが有望であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the significance of dysregulation of chromatin remodeling and DNA break repair in carcinogenesis; and to propose a therapeutic strategy against cancers with chromatin remodeling dysregulation. Using an originally developed non-homologous end joining assay, a molecular process to start DNA strand break repair; histone acetylation by CBP/p300 leads to accumulation of SWI/SNF chromatin remodeling complex at DNA break sites. Molecular process of RET oncogene fusion driving carcinogenesis, consisting of DNA strand breaks and their illegitimate repair, was also elucidated. Lung cancers without driver oncogene aberrations preferentially showed inactivating mutations and loss/reduced expression of a chromatin remodeling gene, BRG1. BRM-ATPase, a paralog for BRG1, was identified as a therapeutic target by synthetic lethality against BRG-deficient cancer.

研究分野：がん個別化医療

キーワード：合成致死 クロマチン制御 がん治療 遺伝子融合

1. 研究開始当初の背景

がんの発生・進展には、染色体欠失・転座等のゲノム異常に伴うがん遺伝子の活性化・がん抑制遺伝子の不活性化が生じる。ゲノム異常の蓄積には、DNA 切断に対する修復の制御機構の破たんが関与すると考えられる。家族性乳がんではその分子機構が解明され、修復破たんの特性を生かし、DSB 誘発効果を持つ PARP 阻害剤を用いた分子標的治療が実現されつつある。しかし他のがんについては、ゲノム異常蓄積の原因は明らかでなく、それを生かした分子標的治療法もない。

申請者は、種々のがん細胞における染色体構造異常の切断点には、DNA 切断修復機構の一つである非相同末端結合 (NHEJ) の痕跡が残されていること、クロマチン制御遺伝子である BRG1 (SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット)、CBP (ヒストンアセチル化酵素:HAT) がヒト肺がんで失活変異を生じていることを見出した。クロマチン制御が DNA 切断修復に関与することが示唆されていたことから、ヒトがんにおけるクロマチン制御遺伝子群の異常は、DNA 切断修復制御の破たんをもたらすことで、抗がん剤等による治療効果に関わること、また新規治療標的として有望であることが示唆された。

2. 研究の目的

以下の3つとする。

(1) ヒト肺がんで失活変異を生じているクロマチン制御遺伝子である BRG1、CBP の DNA 切断修復・抗がん剤/放射線治療感受性における役割を明らかにする。

(2) がん化におけるクロマチン・DNA 切断修復の制御異常の意義を明らかにする。

(3) がん細胞におけるクロマチン制御遺伝子の異常を利用した新たながん治療法を考案する。

3. 研究の方法

(1) ヒトがん細胞の染色体上に生じた DSB に対する DNA 切断修復(非相同末端結合:NHEJ)のアッセイ系を構築し、修復におけるクロマチン制御因子の関与を明らかにする。同定された因子の抗がん剤・放射線感受性における影響を明らかにする。

(2) ヒト肺がんにおけるクロマチン制御遺伝子の異常、がん化をドライブするゲノム構造異常の解析を行う。また、肺発がんリスクにおけるクロマチン制御遺伝子の影響を調べる。

(3) クロマチン制御遺伝子 BRG1 と合成致死の関係にある遺伝子を同定し、その阻害に基

づくがん治療法を探索する。

4. 研究成果

(1) について以下の成果を得た。

I. DNA 切断修復にかかわるクロマチン制御因子の同定

制限酵素 ISCEI の切断に基づくヒト生細胞の染色体 NHEJ アッセイ系を構築した。この系を用い、CBP・p300 によるヒストン H3・H4 タンパク質のアセチル化が BRG1 タンパク質を含む SWI/SNF 複合体の DNA 切断部位への集積を促し、NHEJ コア因子の集積を促すという NHEJ の分子機構を明らかにした。また、CBP・p300 は、別の DNA 切断修復経路である相同組み換え (HR) 修復も正に制御することを見出した。HR 修復では、CBP・p300 は H3・H4 タンパク質のアセチル化だけでなく、BRCA1 遺伝子や RAD51 遺伝子のプロモーター領域のヒストンアセチル化を介した発現保持が役割を有することをみいだした。また、このアッセイ系を用いた共同研究により、新たな NHEJ 制御因子を複数同定した。

II. がん治療の奏功性に関わるクロマチン制御因子の同定

CBP・p300 タンパク質の機能阻害は、がん細胞の抗がん剤・放射線感受性を増加させることを明らかにした。CBP、p300 を含む HAT に対する阻害効果を持つ天然化合物 Garcinol、Curcumin や人工化合物 C646 は、NHEJ 阻害活性を持つことを証明し、がん放射線治療の増感剤として有望であることを見出した。

(2) について以下の成果を得た。

I. がん遺伝子の活性化をもたらすゲノム異常が陰性の肺がんにおいて、BRG1 タンパク質の発現低下・BRG1 遺伝子の失活変異が多く生じていることを明らかにした。BRG1 の発現低下は必ずしも欠損型変異 (truncation 変異) によるものではないことを明らかにした。

II. RET がん遺伝子融合のゲノム切断点の構造解析の結果、切断には大きさ数-kb のホットスポットが存在し、切断に対する NHEJ や Breakage-induced replication のような DNA 切断修復機構を介した誤修復が RET 融合を生じさせることを明らかにした。RET 融合陽性例では、クロマチン制御因子の異常は少ないことから、他の原因により DNA 切断修復の制御異常が生じていることが示唆された。

III. 肺腺がんリスクに影響を与えるクロマチン制御遺伝子 BPTF のイントロン領域に存在する多型の危険アレル保持者は、正常肺組織における BPTF mRNA 量が少なく、BPTF 遺伝子のがん抑制的に働くことを示した。

(3) について以下の成果を得た。
クロマチン制御遺伝子 BRG1 失活がんの合成致死治療標的として、BRG1 のパラログタンパク質である BRM-ATPase タンパク質を同定した。BRG1 失活がんにおける BRM 阻害は、細胞老化を誘導することで、がん細胞の増殖抑制・細胞死を生じさせることを明らかにした。BRM タンパク質の ATPase 阻害剤のスクリーニングを製薬企業との共同研究により開始した。

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 20 件)

1. Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, Sakamoto H, Tsuta K, Totsuka H, Chiku S, Ichikawa H, Kato M, Watanabe S, Yoshida T, Yokota J, Kohno T*. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. *Cancer Res.* 2015, 75(11):2264-2271.
2. Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Kohno T*. Proposal for a synthetic lethality therapy using the paralog dependence of cancer cells-response. *Cancer Res.* 2014, 74(17):4948-4949.
3. Watanabe R, Ui A, Kanno S, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, Yasui A*. SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability. *Cancer Res.* 2014, 74(9):2465-75.
4. Oike T, Ogiwara H, Amornwichee N, Nakano T, Kohno T*. Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *J Radiat Res.* 2014, 55:613-628.
5. Oike T, Komachi M, Ogiwara H, Amornwichee N, Saitoh Y, Torikai K, Kubo N, Nakano T, Kohno T*. C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe. *Radiother Oncol.* 2014, 111(2):222-227.
6. Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T*. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol.* 2014, 9(5):622-630.
7. Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T*. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogene*, 2014, 33(13):1640-8.
8. Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T*. Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. *PLoS One.* 2014, 9(12):e115121.
9. Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S*. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. *Mol Cell.* 2014, 53(4):617-6666630
10. Ogiwara H, Ui A, Shiotani B, Zou L, Yasui A, Kohno T*. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. *Carcinogenesis*, 2013, 34(11):2486-97.
11. Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Isomura H, Komachi M, Furuta K, Watanabe SI, Nakano T, Yokota J, Kohno T*. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res.* 2013, 73(17):5508-5518.
12. Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Kohno T*. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2013, 43(9):849-855.
13. Ogiwara H, Kohno T*. CBP and p300 Histone Acetyltransferases contribute to homologous recombination by transcriptionally activating the BRCA1 and RAD51 genes. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52810.
14. Oike T, Ogiwara H, Torikai K, Nakano T, Yokota J, Kohno T*. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor,

radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 84(3):815-821.

15. Kohno T*, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Medicine*, 2012, 18, 375-377.

16. Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T*. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nature Genetics*, 2012, 44, 900-903.

17. Ogiwara H, Kohno T*. Essential factors for incompatible DNA end joining at chromosomal DNA double strand breaks in vivo. *PLoS One*, 2011, 6(12) e28756.

18. Ogiwara H, Ui A, Otsuka A, Satoh H, Yokomi I, Nakajima S, Yasui A, Yokota J, Kohno T*. Histone acetylation by CBP and p300 at double strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene* 2011, 30(18):2135-2146.

19. Li S, Kanno S, Watanabe R, Ogiwara H, Kohno T, Watanabe G, Yasui A, Lieber MR*. Polynucleotide kinase and aprataxin-like forkhead-associated protein (PALF) acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. *J Biol Chem.* 2011 286(42):36368-77.

20. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki SM, Ogiwara H, Kohno T, Kanno S, Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell.* 2010, 40(6):976-87.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 河野隆志. がん遺伝子融合とクロマチン制御遺伝子欠損を標的とした個別化肺がん治療. 2015年1月.平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム.

2. Ogiwara H, Oike T, Mizukami T, Saito M, Shiraishi K, Kohno T. Personalized medicine of lung cancer using RET oncogene fusion and SWI/SNF chromatin remodeling deficiency. 2015年9月. 第73回日本癌学会学術総会.

3. Ogiwara H, Oike T, Kohno T. Synthetically lethality-based therapy targeting a paralogous gene in cancer cells with chromatin regulating gene deficiencies. 2015年9月. 第73回日本癌学会学術総会.

4. Oike T, Ogiwara H, Kohno T et al. Synthetic lethality-based treatment strategy for cancers deficient in chromatin remodeling factor BRG1. 2015年9月. 第73回日本癌学会学術総会.

5. Ogiwara H, Kohno T. Personalized medicine of lung cancer using RET oncogene fusion and SWI/SNF chromatin remodeling deficiency. 2015年10月. 5th US-Japan DNA repair meeting.

6. Kohno T. RET fusion gene and chromatin remodeling genes: personalized therapy of lung cancer. 2015年8月. 第52回日本癌治療学会学術集会.

7. Kohno T, Ogiwara H. Personalized medicine of lung cancer using RET oncogene fusion and SWI/SNF deficiency. 2014年2月. International Conference 2014: Replication, repair and transcription.

8. Kohno T, Ogiwara H, Mizukami T. Personalized medicine of lung adenocarcinoma based on genetic alterations. 2013年11月. The International Kick-Off Symposium for Atomic Bomb Disease Institute at Nagasaki University.

9. Kohno T. RET fusion and chromatin remodeling genes: translation to lung cancer medicine. 2013年11月. CURELUNG PMB meeting 2013 (Cologne, Germany)

10. 河野隆志. 遺伝子情報に基づいた肺がん

んの個別化医療拡大の試み. 2013年2月. 第15回癌治療増感研究シンポジウム.

11. 河野隆志. 発がんとかん治療に影響を与えるクロマチンリモデリング遺伝子. 2012年1月. 第3次対がん10か年総合戦略(平成16年~25年度)・文科省がん支援活動合同公開シンポジウム

12. Kohno T. DNA double strand break repair and chromatin remodeling. 2012年12月. The 25th International Symposium Foundation for Promotion of Cancer Research

13. Kohno T. Nonhomologous end joining: Its implication in carcinogenesis and as a target for cancer therapy. 2012年4月. 4th US-Japan DNA repair meeting (Virginia, USA)

14. 河野隆志. 発がんに関わるDNA切断修復・クロマチンリモデリング機構. 2012年12月. 第35回日本分子生物学会年会

15. 荻原秀明、河野隆志. CBP and p300 histone acetyltransferases contribute to homologous recombination by transcriptionally activating the BRCA1 and RAD51 genes. 2012年12月. 第35回日本分子生物学会年会

16. Ogiwara H, Kohno T et al. Curcumin, a novel inhibitor of ATR-CHK1 pathway, suppresses homologous recombination and DNA damage checkpoint and enhances sensitivity to PARP inhibitors. 2011年11月. AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular targets and cancer Therapeutics (San Francisco, USA)

17. Ogiwara H, Kohno T et al. Curcumin enhances the sensitivity to PARP inhibitors by suppression of homologous recombination and DNA damage checkpoint through inhibition of ATR-CHK1 pathway. 2011年12月. 第34回日本分子生物学会年会

18. Oike T, Ogiwara H, Kohno T et al. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. 2011年12月. 第34回日本分子生物学会年会

19. Ui A, Ogiwara H, Kohno T et al. Involvement of LKB1 tumor suppressor protein in non-homologous end joining repair against DNA double strand breaks. 2011年12月. 第34回日本分子生物学会年会

20. Ogiwara H, Kohno T et al. Curcumin, a novel sensitizer for PARP inhibitor-based cancer therapy, working by suppression of homologous recombination and DNA damage checkpoint through inhibition of the ATR-CHK1 pathway. 2011年10月. 第70回日本癌学会学術総会

21. Oike T, Ogiwara H, Kohno T et al. Radio-sensitization of human lung cancer cells using histone acetyltransferase (HAT) inhibitors. 2011年10月. 第70回日本癌学会学術総会

22. 河野隆志、荻原秀明他. 発がんとかん治療に影響を与えるクロマチン修飾/リモデリングの制御機構. 2010年12月. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会.

23. 宇井彩子、荻原秀明、河野隆志他. DNA二重鎖切断修復におけるクロマチンリモデリング因子 CHRAC の機能. 2010年12月. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会.

24. 荻原秀明、河野隆志他. 非相同末端結合に関わるヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 は、がんの放射線・抗がん剤治療における増感標的である. 2010年12月. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会.

25. 荻原秀明、河野隆志他. ヒトがん細胞に対する放射線・抗がん剤治療の効果を増強する標的としての CBP/p300 蛋白質. 2010年9月. 第69回日本癌学会学術総会

〔図書〕(計 1 件)

1. Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Kohno T. Histone acetyltransferases (HATs) involved in non-homologous end joining as a target for radiosensitization. *Frontiers in Radiation Oncology*. InTech. Edited by Kataria T.

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

1. 名称: BRM を阻害する化合物に対する応答性を予測する方法
発明者: 河野隆志、蔦幸治、富永裕一、伊藤健太郎
権利者: 国立研究開発法人国立がん研究センター、第一三共株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013-147061、PCT/JP2014/068572

出願年月日：2013/7/22、2014/7/11
国内外の別：国内、国際(PCT)

2. 名称：p300 を阻害する化合物によるがんの治療への応答性を予測する方法
発明者：河野隆志、荻原秀明、富永裕一、樋口才飛
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、第一三共株式会社
種類：特許
番号：特願 2014-032928, PCT/JP2015/054991
出願年月日：2014/2/24, 2015/2/23
国内外の別：国内、国際(PCT)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
分子診断・個別化医療開発グループ_ゲノム生物学研究分野
http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/genome_biology/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 隆志 (KOHNO, Takashi)
国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号：8 0 2 8 0 7 8 3

(2)研究分担者

荻原 秀明 (OGIWARA, Hideaki)
国立がん研究センター・研究所・研究員
研究者番号：4 0 5 6 8 9 5 3

(3)連携研究者

なし。