

機関番号：32644  
研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）  
研究期間：2017～2019  
課題番号：15K21771  
研究課題名（和文） Regulation of the Fanconi anemia-BRCA pathway  
研究課題名（英文） Regulation of the Fanconi anemia-BRCA pathway  
研究代表者  
谷口 俊恭 (TANIGUCHI, Toshiyasu)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：60794534  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）44,000,000円

研究成果の概要（和文）：

遺伝性疾患ファンコニ貧血の原因蛋白と家族性乳癌卵巣癌原因蛋白 BRCA1, BRCA2 は共同して DNA 損傷修復を制御し DNA 損傷剤・抗がん剤感受性耐性を規定する Fanconi anemia (FA)-BRCA pathway を形成する。我々はこの pathway を制御する因子として脱ユビキチン化酵素 USP28 を同定し、FANCI のリン酸化・脱リン酸化がこの pathway の制御することも発見し、それらの役割を解明した。さらに悪性腫瘍の一種である滑膜肉腫における FA-BRCA pathway の機能異常の機序も解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の治療には抗癌剤としてシスプラチンなどの DNA 損傷剤がよく使われる。DNA 損傷修復機構である Fanconi anemia-BRCA pathway の異常がある癌細胞は、DNA 損傷をうまく修復できないので、DNA 損傷剤が効きやすい。したがって、我々の研究成果は、重要な DNA 損傷修復機構の制御機構の解明に貢献するという学術的意義を持つとともに、日本人の死因の第一位を占める癌の治療法の改良にも貢献するという社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：

Fanconi anemia (FA) is a genetic disorder characterized by bone marrow failure, cancer/leukemia susceptibility, developmental defects and cellular hypersensitivity to DNA interstrand crosslink (ICL)-inducing agents, such as cisplatin and mitomycin C. FA proteins and breast/ovarian cancer susceptibility proteins (BRCA1 and BRCA2) cooperate in a common pathway (the FA-BRCA pathway), which coordinates the repair of ICL lesions. Uncovering how this pathway is regulated is important for our understanding of basic cellular DNA repair/DNA damage response mechanisms, the molecular pathogenesis of FA and cancer as well as determination of sensitivity of cancer cells to ICL-inducing anti-cancer agents. In this study, we determined the mechanism(s) of regulation of the FA-BRCA pathway by phosphorylation/dephosphorylation of one of the FA proteins, FANCI and elucidated how a novel deubiquitinating enzyme, USP28, regulates the FA-BRCA pathway.

研究分野：分子細胞生物学・癌生物学

キーワード：DNA 修復、DNA 損傷応答、ファンコニ貧血、抗がん剤感受性



## 1. 研究開始当初の背景

我々はまれな遺伝性疾患ファンconi貧血の原因蛋白と家族性乳癌卵巣癌原因蛋白BRCA1, BRCA2が共同してDNA損傷修復を制御するFanconi anemia (FA)-BRCA pathwayとして働くことを提唱し、このpathwayが発癌と癌治療の双方に重要なことも提唱してきた。まず、我々はFA遺伝子FANCD2を同定し(Timmers, Taniguchi, et al. Mol Cell 2001), FANCD2がFA core complex依存性にモノユビキチン化されBRCA1と相互作用すること(Garcia-Higuera, Taniguchi, et al. Mol Cell 2001)、FANCD1がBRCA2であること(Howlett, Taniguchi, et al. Science 2002)、FANCD2がATMによってリン酸化されること(Taniguchi, et al. Cell 2002)、ATRがFANCD2の活性化に必要なこと(Andreassen, et al. Genes Dev 2004)を見だし、FA-BRCA pathwayという概念を提唱した。このpathwayの不活化が腫瘍細胞のシスプラチン等の抗癌剤に対する感受性の原因になり(Taniguchi, et al, Nature Med 2003), 再活性化が腫瘍のシスプラチン耐性・PARP阻害剤耐性獲得機序になること(Sakai, et al. Nature 2008, Norquist, et al. J Clin Oncol 2011)も示した。しかし当時我々のこのpathwayに関する理解は不十分であり、さらに詳細にその制御機構を解明する必要があった。我々はこのpathwayを制御する新因子候補として脱ユビキチン化酵素USP28を同定し、またFANCI-FANCD2のリン酸化・脱リン酸化がFA-BRCA pathwayの制御の鍵を握る現象であることを示唆する結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

本研究はFA-BRCA pathwayの制御機構を明らかにすることで、新しいより正確なFA-BRCA pathwayのモデルを構築し、臨床応用へ展開するための基礎を確立することを目的とした。当初は以下の目的に焦点をしばって研究する方針とした。

- (1) DNA損傷に応答しておきるFA core complexのDNA損傷部位への集積の制御機構とFANCI-FANCD2のリン酸化/脱リン酸化のメカニズムを解明する。
- (2) 脱ユビキチン化酵素USP28によるFA-BRCA pathwayの制御メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) FANCI-FANCD2のリン酸化/脱リン酸化のメカニズムの解明

- ①FANCI不全細胞及び様々なFANCIの変異体を用いた細胞の表現型の解析を行った。
- ②FANCIのリン酸化特異抗体を用いたリン酸化/脱リン酸化の解析を行った。
- ③脱リン酸化酵素候補を抑制または過剰発現した細胞でのFANCD2のリン酸化の解析を行った。

### (2) USP28によるFA-BRCA pathwayの制御メカニズムの解明

- ①USP28不全細胞を作成し、様々なUSP28の変異体を用いた細胞の表現型の解析を行った。
- ②DNA damage responseに関わる因子の不全細胞を用いてUSP28の動態への影響を調べた。またそれらの因子とUSP28の相互作用を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) FANCI-FANCD2のリン酸化/脱リン酸化のメカニズムの解明

- ① FA-BRCA pathwayの活性化はDNA修復(特にDNA鎖間架橋(interstrand crosslink; ICL)修復)に重要である。FANCD2とFANCIは複合体を形成する。FA-BRCA pathwayの活性化のkey eventはFANCD2(及びFANCI)のモノユビキチン化である。またFANCIのATRによるリン酸化がFANCD2-FANCIのモノユビキチン化を引き起こすトリガーになると考えられていた。しかし、複数あるFANCIのATRによるリン酸化サイトがFA-BRCA pathwayの活性化に与える影響は個別に調べられていなかった。
- ② そこでまず、FANCIのATRによるリン酸化サイト3箇所(Serines 556, 559, 565)に対するリン酸化特異抗体を作成した。これらの抗体を用いて、FANCIのATRによるリン酸化とFANCD2-FANCIのモノユビキチン化の関係を詳細に解析した。その結果、今まで提唱されていたモデルとは異なり、FANCI Serine 556のリン酸化はFANCD2-FANCIのモノユビキチン化の上流で働くのに対して、FANCI

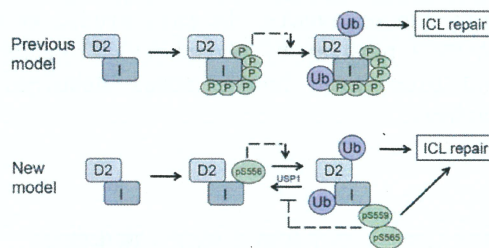


図1 FANCD2-FANCIの活性化の新しいモデル  
以前のモデルではFANCIのリン酸化はFANCD2-FANCIのモノユビキチン化の上流に位置していた。新しいモデルでは、FANCI S556リン酸化はモノユビキチン化の上流、S559, S565のリン酸化はモノユビキチン化の下流で働く。

に解析した。その結果、今まで提唱されていたモデルとは異なり、FANCI Serine 556のリン酸化はFANCD2-FANCIのモノユビキチン化の上流で働くのに対して、FANCI



Serines 559, 565 のリン酸化は FANCD2-FANCI のモノユビキチン化の下流で働くことが判明した (図 1)。また FANCI Serines 559, 565 のリン酸化は FANCD2 の脱ユビキチン化を阻害することで、FANCD2-FANCI 複合体の活性化に重要な働きをすることも判明した。

これらの結果は論文 (Cheung RS, Castella M, Abeyta A, Gafken PR, Tucker N, Taniguchi T. Cell Reports, Vol.19(12), 2432-2440, 2017) として発表した。

DNA damage 後に FANCI-FANCD2 をリン酸化する主たるキナーゼは ATR-ATM であるが、FANCI-FANCD2 を脱リン酸化する酵素の同定は行われていなかった。我々は自ら作成した FANCD2 リン酸化特異抗体を用いて、どの脱リン酸化酵素が FANCD2 脱リン酸化に関わるのかを調べた。その結果、WIP1 をノックダウンすると FANCD2 のリン酸化が増強し、WIP1 を過剰発現させると FANCD2 のリン酸化が抑制されることがわかった。このことは WIP1 が FA-BRCA pathway を制御する重要な脱リン酸化酵素であることを示唆する (未発表)。WIP1 が FANCI のリン酸化にも影響を与える可能性は十分にあり、今後の重要な研究課題であると考えている。

これらの研究成果により、今まで以上に詳細に FA-BRCA pathway の制御機構が解明された。この pathway が癌の発症及び治療 (抗癌剤感受性・耐性) に重要な働きをすることから、この pathway をターゲットとすることで癌の治療をより効率よく行える可能性がある。この研究成果はその基礎となる情報を提供できる。

## (2) USP28 による FA-BRCA pathway の制御メカニズムの解明

- ① FA-BRCA pathway の活性化の key event は FANCD2 及び FANCI のモノユビキチン化であり、そのモノユビキチン化を行う酵素は ubiquitin conjugating enzyme (E2) である FANCT と ubiquitin ligase (E3) である FANCL である。また FANCD2 及び FANCI の脱ユビキチン化酵素は USP1 である。しかし、他の脱ユビキチン化酵素がこの pathway を制御するかどうかは詳細にはわかっていなかった。そこで我々は、脱ユビキチン化酵素に対する siRNA library を用いて、FANCD2 の活性化 (nuclear foci 形成を指標とした) に影響を与える脱ユビキチン化酵素を複数同定し、そのうちの 1 つ USP28 に注目した。USP28 は 53BP1 (DNA 修復経路の選択を制御する重要な因子) と相互作用することが知られていたからである。
- ② USP28 が FA-BRCA pathway に与える影響を詳しく調べてみると、以下のようなことが判明した。まず、細胞で USP28 をノックダウンすると、FA-BRCA pathway の活性化の指標である FANCD2 の nuclear foci 形成 (FANCD2 の DNA damage 部位への集積を反映) 及び相同組換えの活性化の指標である RAD51 の nuclear foci 形成が促進された。一方、細胞に USP28 を過剰発現させると FANCD2、RAD51 の nuclear foci 形成が抑制された。さらに DR-GFP assay を用いて相同組換えへの影響を調べた。その結果、USP28 ノックダウンは相同組換えを亢進させること、それは野生型 USP28 の再導入によりレスキューされるが、catalytic dead USP28 の再導入ではレスキューされないことがわかった。さらに USP28 ノックダウンにより DNA 二重鎖切断後の RPA foci 形成 (end resection の指標) が促進され、それは野生型 USP28 の再導入及び catalytic dead USP28 の再導入により抑制されることがわかった。これらの結果から、USP28 は FA-BRCA pathway 及び相同組換えを負に制御する因子であるが、その役割は一部は脱ユビキチン化酵素活性依存性で、一部 (end resection の制御) は非依存性であり、USP28 は少なくとも 2 つのステップを制御すると考えられた。
- ③ また DNA 二重鎖切断後に USP28 自体が nuclear foci を形成 (DNA damage 部位への集積を反映) し、53BP1 と共局在した。USP28 の nuclear foci 形成には 53BP1 が必要であり、USP28 は 53BP1 の下流で働くと考えられた。
- ④ 53BP1 の下流で働くことが知られている他の因子との相互作用を調べたところ、USP28 は REV7 や TRIP13 と相互作用することがわかった。
- ⑤ Random plasmid integration assay を用いて end-joining に対する USP28 の影響を調べたところ、USP28 ノックダウンは end-joining を抑制することが判明した。
- ⑥ BRCA1 ノックダウン細胞は PARP 阻害剤に高感受性を呈するが、さらに USP28 をノックダウンすると、PARP 阻害剤に部分的に耐性になった。
- ⑦ TCGA の卵巣癌データを解析したところ、USP28 mRNA の発現が高い症例は予後が良いことが判明した。
- ⑧ CRISPR-CAS9 system を用いて USP28 のノックアウト細胞を作成した。その結果、USP28 ノックアウト細胞を長期培養し続けると USP28 ノックダウン細胞の表現型とは一致しない表現型に変化していくことがわかった。例えば USP28 ノックダウン細胞及び樹立直後の USP28 ノックアウト細胞では RPA foci 形成が促進しているが、培養を続けると USP28 ノックアウト細胞の RPA foci 形成促進の表現型が弱まる。このことは USP28 ノックアウト状態が長く続くとなんらかの compensation が働くことを示唆している。
- ⑨ 今後は REV7-TRIP13 と USP28 の相互作用の詳細を、既に作成した様々な USP28 変異体を



用いて解明する必要がある。

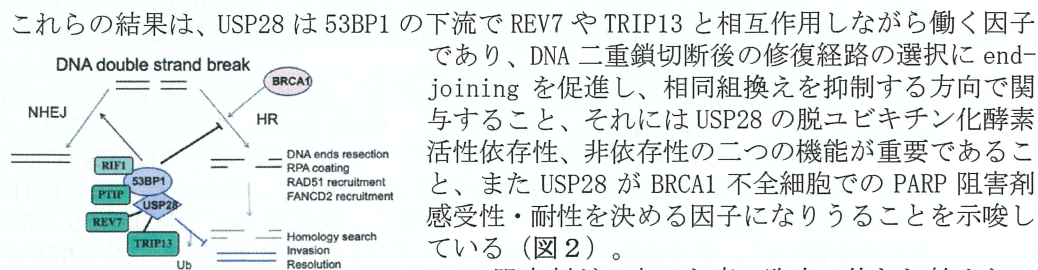


図 2 USP28 の DNA 修復における役割のモデル

PARP 阻害剤が日本でも癌の臨床で使われ始めたことを考慮すると、これは将来、癌の臨床に還元される可能性もある重要な研究成果である。

### (3) 滑膜肉腫における FA-BRCA pathway の機能異常の機序

上記の 2 つのプロジェクトから派生して、新たに「悪性腫瘍の一種である滑膜肉腫の癌遺伝子 SSX-SS18 によって引き起こされる FA-BRCA pathway の機能異常が PARP 阻害剤感受性に関与する」という仮説をたてて検証を始めた。現在までに SSX-SS18 を過剰発現させることにより、細胞周期が停止する細胞と、仮説通りに (細胞周期が停止せずに) FA-BRCA pathway の機能異常 (RAD51 foci 形成阻害) がおきる細胞があることがわかった。これは研究分担者の山崎寛之博士の発案に基づくプロジェクトであり、今後、山崎寛之博士本人が引き継いで行う予定である。このプロジェクトは滑膜肉腫の新しい治療法の提案に結びつく可能性があり臨床的にも重要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Taniguchi T. REV1-POL  $\zeta$  inhibition and cancer therapy. *Molecular Cell*, Vol.75(3), 419-420, 2019, DOI: 10.1016/j.molcel.2019.07.012. 査読無
- ② Hu WF, Krieger KL, Lagundzin D, Li X, Cheung RS, Taniguchi T, Johnson KR, Bessho T, Monteiro ANA, Woods NT. CTDP1 regulates breast cancer survival and DNA repair through BRCT-specific interactions with FANCI. *Cell Death Discov*, Vol. 5, 105, 2019, doi: 10.1038/s41420-019-0185-3. 査読有
- ③ 谷口俊恭, Fanconi 貧血の分子病態解明の進歩、血液内科、Vol. 76、78-84、2018 査読無
- ④ 谷口俊恭, BRCA1・BRCA2 変異腫瘍におけるプラチナ製剤・PARP 阻害剤耐性メカニズム、放射線生物研究、Vol. 53、178-210、2018、査読有
- ⑤ Cheung RS, Castella M, Abeyta A, Gafken PR, Tucker N, Taniguchi T. Ubiquitination-linked phosphorylation of the FANCI S/TQ cluster contributes to activation of the Fanconi anemia I/D2 complex. *Cell Reports*, Vol. 19(12), 2432-2440, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.081. 査読有
- ⑥ Cheung RS, Taniguchi T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. *International Journal of Hematology*, Vol. 106(3), 335-344, 2017, doi: 10.1007/s12185-017-2283-4. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 谷口俊恭, BRCA1/2 二次変異 (復帰変異) による抗癌剤耐性獲得機序、第 8 回 日本 HBOC コンソーシアム学術総会 (招待講演)、2020
- ② Toshiyasu Taniguchi, The role of a microRNA biogenesis protein, DGCR8, in DNA repair、第 78 回日本癌学会学術総会 (Kyoto, Japan) (招待講演)、2019
- ③ 谷口俊恭, 渡邊孝明, microRNA 生合成タンパク DGCR8 による転写と共役したヌクレオチド除去修復の制御機構、第 41 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「DNA 修復以上によりおこる疾患の分子生物学-分子病態から治療法開発まで」、(招待講演)、2018
- ④ Toshiyasu Taniguchi, The role of a microRNA biogenesis protein, DGCR8, in DNA repair、IBS-KSMCB Conference on Genomic Integrity & Cell Cycle、Workshop on DNA damage and Aging (招待講演) (国際学会)、2018
- ⑤ Toshiyasu Taniguchi, The role of a microRNA biogenesis protein, DGCR8, in DNA repair、Consortium of Biological Sciences 2017、Workshop on DNA damage and Aging、(招待講演)、2017
- ⑥ Toshiyasu Taniguchi, The Fanconi anemia-BRCA pathway and cancer、The 2<sup>nd</sup> Biosignal Research Center International Symposium (ICEM-ACEM2017 Satellite Symposium on DNA Repair) (招待講演) (国際学会)、2017
- ⑦ 谷口俊恭, Fanconi anemia-BRCA pathway の制御機構、日本放射線影響学会第 60 回年次大



様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

会 (招待講演)、2017

[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://tt.lab.u-tokai.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 孝明

ローマ字氏名：WATANABE, Takaaki

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：20421365

研究協力者氏名：石井 恭正

ローマ字氏名：ISHII, Takamasa

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20548680

研究協力者氏名：山崎 寛之

ローマ字氏名：YAMASAKI, Hiroyuki

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：特定研究員

研究者番号 (8 桁)：90837816

研究協力者氏名：田中 祐紀子

ローマ字氏名：TANAKA, Yukiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。