

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02953

研究課題名(和文) ホルモン応答性なTopII依存的DNA切断修復異常による病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathological mechanism caused by defects in the repair of
TOPII-induced DNA double-strand breaks

研究代表者

笹沼 博之 (SASANUMA, Hiroyuki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00531691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、エストロゲンによって生じるDNA損傷の原因とその修復分子機構の解明にあった。本研究によって、性ホルモンが、DNA二重鎖切断端に共有結合したTop2(Top2 cleavage complex, Top2cc)を大量に作ることで、その修復にBRCA1が重要な働きをしていることを見つけた。BRCA1は、Top2ccをDSB末端から切除するMRE11ヌクレアーゼの制御因子であることも明らかにした。以上の結果は、BRCA1を欠損すると、エストロゲンのDNA毒性が増強することを示す。BRCA1欠損によるエストロゲンのDNA毒性の増強は、乳がん卵巣がんを選択的に起こすのかを説明できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性乳がん卵巣がん症候群は、30代ぐらいから発がん率が上昇します。BRCA変異がなぜ女性臓器特異的がんを発症するかはわかっていませんでした。エストロゲンは、細胞増殖促進作用があることは知られていましたが、DNAを傷つける毒性については知られていませんでした。本研究では、BRCA1が欠損することによってエストロゲンのDNA毒性が増強し、発がんに繋がることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to characterize the DNA damages induced by estrogen and clarify the molecular mechanism of how estrogen-induced DNA damages are repaired. To this end, we generated BRCA1 and TOP2b deficient cells using breast cancer MCF-7 cells. We found that estrogen induced Top2b; covalently bound to DSB ends, named TOP2cc, in serum starved G1-phase cells. The loss of BRCA1 caused the accumulation of TOP2cc induced by estrogen, indicating an important role of BRCA1 in the repair of estrogen-induced DSBs. We have previously demonstrated that MRE11 nuclease also functions in the removal of Top2cc from DSB ends. BRCA1 promotes the recruitment of MRE11 onto Top2cc sites for subsequent removal of Top2cc. Our results suggest the loss of BRCA1 enhances estrogen's genotoxicity. This function of BRCA1 may help explain the female organ-specific carcinogenesis of BRCA1-mutation carriers.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ゲノム ゲノム編集 相同組換え DNA損傷修復 DNA二重鎖切断 ステロイドホルモン トポイソメラーゼ2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MRE11 欠損によって細胞が死滅すること(つまり生存に必須である)ことは知られていたが、その理由は不明であった。申請者は、MRE11 の条件的欠損細胞を作製し、MRE11 遺伝子を欠損した後で、何が起きているかを調べることから始めた。驚くべきことに、MRE11 遺伝子を欠損した細胞では、相同組換えの初期過程である。必要な DSB 末端からの削り込み(3'末端の突出形成)には、必要がないことがわかってきた。本研究提案書を提出する時点で、申請者は MRE11 欠損によって、トポイソメラーゼ II 型(TopII)による大量の DNA 二重鎖切断(DSB)が細胞内に発生していることを突き止めていた。

2. 研究の目的

トポイソメラーゼ II 型(TopII)は、転写と複製に必須である。TopII は、ゲノム DNA に 2 重鎖断裂を入れ、もう 1 本のゲノム DNA を断裂のあいだをすり抜けさせ、断裂を塞ぐ。この触媒反応は TopII のみで十分で、1 細胞において 100 万回/日以上起きている。触媒反応中にエラーが稀に起こると、DNA 二重鎖断裂が残る。生理的な状態で「2 重鎖断裂が残る」ことが実際にどの程度の頻度で起きているか不明だった。我々は、Mre11 ヌクレアーゼを欠損させると、TopII がゲノム上で大量に蓄積する(ゲノム DNA に共有結合した状態の TopII)ことを発見した。本研究課題の目的は、ゲノム中に蓄積した TopII が、ヒト細胞増殖、さらには細胞の癌化に与える影響を TALEN, CRISPR ゲノム編集技術を駆使して調べることである。

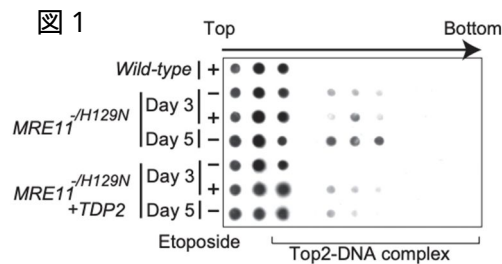
3. 研究の方法

TopII による DSB は、切断端に TopII が共有結合している特殊な DSB(Top2-cleavage complex, TopIIcc)である。TopIIcc を検出するアッセイ系を立ち上げた。このアッセイでは、細胞溶解後、超遠心によって TopII が共有結合している DNA と共有結合していない DNA を分離する。超遠心後、分画し、TopIIcc(図 1 の Top2-DNA complex のこと)が蓄積しているかどうかを slotblot 法によって調べる。このアッセイ系を使い、MRE11 ほか様々な変異細胞での TopIIcc の蓄積を定量的に調べることが可能となった。

また遺伝子破壊には、CRISPR/Cas9 あるいは TALEN 技術を用いた。

4. 研究成果

TopII の切断を大量に作る抗がん剤、エトポシドを処理し発生する DSB の修復過程を、DSB マーカーである γ H2AX foci を観察することにより調べた。ニワトリ DT40 細胞とヒト TK6 細胞の MRE11 欠損細胞や DSB 修復因子(LIG4, RAD54)細胞を解析した。エトポシドによって発生する DSB 修復には、MRE11 と非同末端結合(NHEJ)に関わる LIG4 が必要であることを明らかにした。MRE11 と LIG4 の二重欠損では、LIG4 単独変異とエトポシドによって誘導



される染色体断裂数が同じであることから、この二つは同一経路で機能することがわかった。TopIIcc が NHEJ 経路によって修復されるためには、DSB 末端に共有結合した TopII を除去する必要がある。MRE11 が、TopIIcc 除去に関わるかどうかを直接調べるため、「方法」で記載したアッセイを使い MRE11 欠損細胞で TopIIcc が蓄積するかどうか調べた。MRE11 欠損すると、3 日目から TopIIcc の蓄積が観察され(図 1、図では Top2-DNA complex と記載)、5 日目から細胞死を起こす。

以前の報告で、TopIIcc 除去に TDP2 が関わるということが知られていた。そこで申請者は、MRE11 と TDP2 欠損の二重変異細胞を作成し、TopIIcc 検出を試みた。TDP2 経路と MRE11 経路は、TopIIcc 除去において独立して働いていることがわかった。

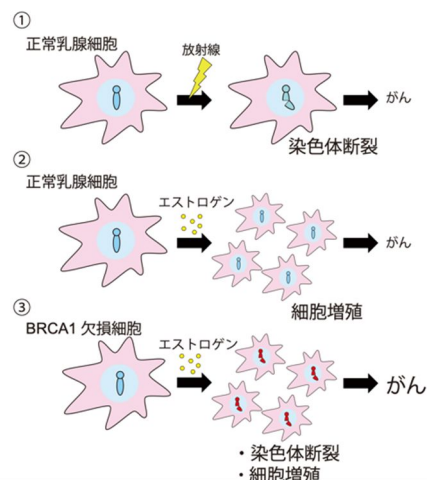
MRE11 欠損細胞に TDP2 を過剰発現すると、TopIIcc の蓄積量が減少すること(図 1)、細胞死を起こすタイミングが遅くなることから、TopIIcc の蓄積が MRE11 欠損細胞の細胞死の原因の一つであると結論づけた。申請者は、この研究成果を 2016 年 M.Cell 誌に発表した。

図 1 のアッセイを使い、TopIIcc 除去に関わる遺伝子を探索した結果、BRCA1 を見つけた。BRCA1 欠損細胞では、MRE11 と同様に TopIIcc が蓄積した。MRE11 と BRCA1 経路は、TopIIcc 除去に関して同一経路であり、BRCA1 欠損により、TopIIcc 部位に MRE11 の蓄積が低下する。

性ホルモンである、エストロゲンは細胞増殖を促進する効果がある。申請者は、エストロゲン受容体陽性ヒト乳腺 MCF-7 細胞を使い、G1 期細胞において、エストロゲンが核 DNA に大量の DSB を作ることを見つけた。G1 期に機能する TOP11 β 欠損細胞では、エストロゲンによる DSB は検出されないことから、TOP11 β 依存性であった。BRCA1 欠損細胞では、この TOP11 β が作る γ H2AX foci が残ったままになり、DSB 修復が遅延する。このことは、BRCA1 が欠損するとエストロゲンの DNA 毒性が強まることを示唆している。

BRCA1 遺伝子は、家族性乳がん卵巣がん症候群の原因遺伝子である。BRCA1 は相同組換えに必要な機能を持ち、相同組換えはすべての増殖細胞に必要な経路である。もし相同組換え欠損が原因だとしたら、全身がん(特定の臓器がんではない)を発症する可能性がある。現状では、BRCA1 欠損によって、なぜ女性臓器特異的がんが発症するかはわかっていなかった。エストロゲン本研究は、エストロゲンが本来持つ細胞増殖促進効果に加えて、BRCA1 欠損によるエストロゲン DNA 毒性の増強が、女性臓器特異的がんを発生させているのではないかと考えている(図2)。申請者は、この研究成果を2018年PNAS誌に発表した。

図2



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

- (1) Tsuda M, Ogawa S, Ooka M, Kobayashi K, Hirota K, Wakasugi M, Matsunaga T, Sakuma T, Yamamoto T, Chikuma S, Sasanuma H, Debatisse M, Doherty AJ, Fuchs RP, Takeda S. (2019) PDIP38/PoDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. PLoS One 14: e0213383. DOI: 10.1371/journal.pone.0213383
- (2) Zong D, Adam S, Wang Y, Sasanuma H, Callén E, Murga M, Day A, Kruhlak MJ, Wong N, Munro M, Ray Chaudhuri A, Karim B, Xia B, Takeda S, Johnson N, Durocher D, Nussenzweig A. (2019) BRCA1 Haploinsufficiency Is Masked by RNF168-Mediated Chromatin Ubiquitylation. Mol Cell. 73: 1267-1281. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.12.010
- (3) Mohiuddin M, Evans TJ, Rahman MM, Keka IS, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S. (2018) SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 115: 12793-12798. DOI: 10.1073/pnas.1716349115
- (4) Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Saha LK, Rahman MM, Kiyooka Y, Fujiike H, Cherniack AD, Itou J, Callen Moreu E, Toi M, Nakada S, Tanaka H, Tsutsui K, Yamada S, Nussenzweig A, Takeda S. (2018) BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological topoisomerase II-DNA complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 115: E10642-E10651. DOI: 10.1073/pnas.1803177115
- (5) Sanada Y, Sasanuma H, Takeda S, Tano K, Masunaga SI. (2018) Disruption of Hif-1 enhances cytotoxic effects of metformin in murine squamous cell carcinoma. Int J Radiat Biol. 94: 88-96. DOI: 10.1080/09553002.2018.1409443
- (6) Çaglayan M, Prasad R, Krasich R, Longley MJ, Kadoda K, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S, Tano K, Copeland WC, Wilson SH. (2017) Complementation of aprataxin deficiency by base excision repair enzymes in mitochondrial extracts. Nucleic Acids Res. 45: 10079-10088. DOI: 10.1093/nar/gkx654
- (7) Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga SI, Takeda S, Tano K. (2017) Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells. PLoS One 125: e0185141. DOI: 10.1371/journal.pone.0185141
- (8) Al Abo M, Sasanuma H, Liu X, Rajapakse VN, Huang SY, Kiselev E, Takeda S, Plunkett W, Pommier Y. (2017) TDP1 is Critical for the Repair of DNA Breaks Induced by Sapacitabine, a Nucleoside also Targeting ATM- and BRCA-Deficient Tumors. Mol Cancer Ther. 16: 2543-2551. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0110
- (9) Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. (2017) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). Oncotarget 8: 33457-33474. DOI: 10.18632/oncotarget.16508
- (10) Hoa NN, Shimizu T, Zhou ZW, Wang ZQ, Deshpande RA, Paul TT, Akter S, Tsuda M, Furuta R, Tsutsui K, Takeda S, Sasanuma H. (2016) Mre11 Is Essential for the Removal

of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. Mol Cell 64: 580-592.

DOI: 10.1016/j.molcel.2016.10.011

- (11) Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, Swenberg JA, Nakamura J. (2016) Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANC-deficient cells. Oncotarget 7: 59795-59808.
DOI: 10.18632/oncotarget.10928
- (12) Marchand C, Abdelmalak M, Kankanala J, Huang SY, Kiselev E, Fesen K, Kurahashi K, Sasanuma H, Takeda S, Aihara H, Wang Z, Pommier Y. (2016) Deazaflavin Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2) Specific for the Human Enzyme and Active against Cellular TDP2. ACS Chem Biol. 11: 1925-1933.
DOI: 10.1021/acscchembio.5b01047

〔学会発表〕(計7件)

- (1) Sasanuma H: “BRCA1-Mre11 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological Topoisomerase II-DNA complexes”, 5th HiHA International Symposium (招待講演)(国際学会), 2019.
- (2) Sasanuma H: “BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological Topoisomerase II-DNA complexes”, 第41回分子生物学会(招待講演), 2018.
- (3) 笹沼博之: “BRCA1は、静止期細胞においてTop2依存的なDNA二重鎖切断修復に関与する”, 第90回遺伝学会(招待講演), 2018.
- (4) Sasanuma H: “BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological Topoisomerase II-DNA complexes”, IPR International Seminar(招待講演)(国際学会), 2018.
- (5) Sasanuma H: “The essential role of Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the removal of abortive top2-DNA complex”, 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University(招待講演)(国際学会), 2017.
- (6) 笹沼博之: “Mre11蛋白質は、DNAに共有結合したTpoIIを除去するのに必須である”, 分子生物学会(招待講演), 2017.
- (7) Sasanuma H: “Mre11 is essential for the removal of lethal Topoisomerase 2 covalent cleavage complexes”, 3R Symposium(国際学会), 2016.

〔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

- TK6 consortium

<http://www.nihs.go.jp/dgm/tk6.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。