

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06271

研究課題名(和文) 過剰なDNA複製を抑制する分子機構の同定とその破綻による発癌機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel mechanism to lead DNA over-replication

研究代表者

常松 貴明 (TSUNEMATSU, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70726752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製は一回の細胞周期当たり一度に規定されており、その破綻は染色体数の異常な増加を誘導する。染色体数の異常増加は癌の特徴の一つであり、この制御機構の詳細な理解は非常に重要と考えられる。本研究ではその新規の制御機構をゲノム規模のsiRNAライブラリーを用いることで明らかにしようとするものである。本研究結果より、個々の遺伝子の発現をsiRNAで抑制しただけでは既知の経路以外にはDNA再複製が誘導されないことが明らかとなった。逆にDNA再複製を誘導した状態ではいくつかの遺伝子の発現抑制がDNA再複製を減少させることが明らかとなり、新規のDNA再複製関連因子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目するDNA再複製と呼ばれる現象は染色体数の異常な増加を引き起こすことから発癌や癌の進展に関与する可能性があり、癌の生物学を理解する上で重要な生命現象と考えられる。一方で癌細胞に持続的にDNA再複製を誘導すると細胞老化を引き起こし、細胞死に至ることから、癌の治療法としても可能性を有しており、その制御機構の解明は非常に意義深いと考えられる。本研究成果によって同定した新規のDNA再複製制御機構が発癌及び癌の進展の理解、癌の治療法の開発の新たな分子基盤となりうると考える。

研究成果の概要(英文)：DNA replication is restricted to occur once per cell cycle and its deregulation cause excessive chromosomal numbers called DNA re-replication. The chromosomal abnormality is one of the hallmarks of cancer. So, the understanding of its regulation is important for analyzing cancer biology. In this study, we try to identify novel mechanisms which suppress DNA re-replication by using genome-wide siRNA library. We found that knockdown of each genes did not cause DNA re-replication besides known regulators. Finally, we identified the novel regulators of DNA re-replication by siRNA screening with DNA re-replication inducing reagent.

研究分野：病理学

キーワード：DNA複製 ユビキチン タンパク分解

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織や癌細胞において染色体数の異常な増加が高頻度に見られることが知られている。この染色体数の異常な増加は一般に細胞分裂時の染色体の不均衡分配などによると考えられており、これまでに細胞分裂の詳細なメカニズムに着目した研究が多くなされている。これら一連の研究の中には、染色体数の増加とその癌の発生、進展に与える影響に着目した興味深い報告がなされている。人工的に染色体の不均衡分配を引き起こすと、正常細胞では過剰なストレスによって細胞老化が誘導される一方で、癌細胞では癌の浸潤や転移が促進される。つまり、染色体数の増加は直接的に癌の発生・進展に関与する可能性が示唆される。

一方で、細胞は DNA 複製と細胞分裂を繰り返すことで増殖する。種の保存や個体形成において、細胞分裂により新しく生み出された娘細胞が親細胞と同一の遺伝情報を受け継ぐことが必須となる。そのため、DNA 複製は一回の細胞周期当たり一度だけ生じるようプログラムされている。しかし、近年、その破綻が過剰な DNA 複製(DNA 再複製)を引き起こし、核の大型化や DNA 量の異常な増加を誘導することが明らかになっている。DNA 再複製が持続的に生じると細胞周期が S 期に留まるとで、DNA 量の異常増加に伴い、細胞老化が誘導されることが報告されている。また近年、NEDD 化阻害薬が DNA 再複製を誘導することが報告され、現在、骨髄腫などの一部のがんの臨床治験が進められている。

前述のように染色体数を一定に保つため、DNA 複製は一回の細胞周期当たり一度だけに規定されている。近年、その分子機構の一つの経路として、ライセンスと呼ばれる DNA 複製開始制御が重要であることが明らかとなった。細胞周期調節因子である Emi1 (Early mitotic inhibitor 1) や geminin (DNA replication inhibitor) の siRNA によるノックダウンや CDT1(Chromatin licensing and DNA replication factor 1)の過剰発現などによって DNA 再複製が誘導されることが報告されており、我々は癌細胞に再複製を誘導することで、従来の DNA 複製阻害薬などの抗癌剤の作用を高めることができることをこれまでに見出している(*J Biol Chem*, 2013)。さらに正常細胞では再複製は誘導されにくいことから癌特異的に抗癌剤の効果を増強できることも併せて報告しており、治療の標的となりうる重要な生命現象である。

上述のライセンスは G1 期に CDT1、Cdc6、ORC1-6 や MCM2-7 などの分子からなる複製前複合体(pre-RC: pre-replicative complex)がクロマチンへ結合する現象であり、この結合部位が S 期になると複製開始起点として働くと考えられている。DNA 複製を一回の細胞周期当たり一度だけに規定するため、複数の分子機構により制御されている。(1) S 期以降は geminin が CDT1 に結合し、新たなライセンスを抑制している。逆に G1 期に geminin が存在するとライセンスが抑制されてしまい、DNA 複製自体ができなくなってしまうと考えられるが、実際には APC/C(Anaphase Promoting Complex/Cyclosome)ユビキチンリガーゼによるポリユビキチン化依存的なタンパク分解によって G1 期特異的に分解される。S 期以降は APC/C の inhibitor である Emi1 が発現し、geminin を蓄積させるが、分裂期初期に Emi1 は分解されてしまう。我々はこれまでに分裂期初期から G1 早期までは分裂期キナーゼである Aurora-A が geminin をリン酸化することで安定化を促進することを報告した(*Nat Commun*, 2013)。(2) S 期以降では SCF-Skp2 ないし Cul4-CDT2 ユビキチンリガーゼ複合体が CDT1 を分解し、そのタンパク量を低く保っている。(3)pre-RC 形成にはヒストンメチルトランスフェラーゼである Set8 によるヒストン H4 のメチル化が必須であり、Set8 もまた Cul4-CDT2 により分解され、そのタンパク量が低く保たれている。以上より、DNA 再複製の抑制にはユビキチンプロテアソーム系による pre-RC 構成因子やその関連分子の厳密なタンパク量の調節が必須の役割を果たしている。

2. 研究の目的

本研究では、染色体数の増加を引き起こし、癌の発生・進展において重要な役割を果たす可能性を持つ DNA 再複製に着目する。その抑制機序の新たな分子機構を同定し、癌の新たな治療法の開発に有用な分子基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、DNA 再複製を防ぐ機構の解明を目指し、21584 遺伝子を対象とした siRNA ライブラリーを用い、新規の DNA 再複製抑制因子をゲノム規模で探索・同定する。具体的には培養細胞株にライブラリーの各 siRNA を導入し、DNA 再複製が誘導される分子をスクリーニングする。陽性コントロールとして Emi1 siRNA を用いる。スクリーニングは DNA を DAPI 染色し、核の大きさを計測し、大型化するものを陽性とする。次に、それら分子による DNA 再複製抑制機構の詳細を Flowcytometry などの分子生物学的手法を用いて検証、検討し、新規の DNA 再複製抑制機構の同定や既知の経路の新たな制御因子を同定する。

4. 研究成果

(1) ヒト線維芽細胞株を用いたゲノム規模の siRNA スクリーニングとその検証

前述の方法を用いて、21584 遺伝子を対象とした siRNA スクリーニングを行ったところ、DNA 複製関連因子である Claspin を含めた 3 遺伝子で核の腫大がみられた。そこで、それぞれの遺伝子を対象とした siRNA を購入し、DNA 再複製の誘導実験に最も使用されているヒト大腸癌細胞株 HCT116 及びヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に遺伝子導入し、DAPI 染色による蛍光顕微鏡での観察及び PI 染色による Flowcytometry による DNA 含有量の測定を行なった。蛍光顕微鏡での観察によりいずれも核の軽度の腫大がみられ、スクリーニング結果の検証を行うことができた。しかし、Flowcytometry によって DNA 含有量を測定したところ、増加はみられなかった。これらの結果より、個々の遺伝子を対象とした siRNA 導入による Loss of function によっては既知の Emi1 や geminin 以外には DNA 再複製が誘導されないと考えた。ただ、複数の遺伝子を対象とした siRNA を導入すれば、その組み合わせによっては DNA 再複製が誘導される可能性は残っている。しかしながら、21584 遺伝子を対象とした siRNA ライブラリーを用いて、複数の組み合わせで実験することは実現不可能に近い。この実験を実現するには、Pool 型の shRNA ライブラリーを用いて、DNA 再複製を起こした細胞のみを分離し、シーケンスによって同定することが可能性として挙げられるが、DNA 再複製を起こした細胞は増殖できないため、実験系としてやや困難であると考えた。

(2) ヒト大腸癌細胞株を用いた脱ユビキチン化酵素群を標的とした siRNA スクリーニング

(1)の研究成果より、顕微鏡下で核の大きさを測定するスクリーニングはハイスループットで非常に有用な方法ではあるが、前述のように実際の DNA 含有量の増加を反映しないという問題が考えられた。そこで、Flowcytometry を用いた PI 染色による DNA 含有量の測定をスクリーニングに用いることができないか考えた。問題点としては解析を行うことができる数に限りがあり、ゲノム規模の 21584 遺伝子を対象とした siRNA ライブラリーを用いることは困難と思われた。そこで特定の分子群を対象としたサブライブラリーを用いることを考えた。

DNA 再複製抑制機構にはユビキチンプロテアソーム系によるタンパク分解が必須であることが知られていることからこの点に着目した。近年、このタンパク分解に拮抗する脱ユビキチン化酵素群が同定され、ヒトで約 100 遺伝子あることが報告された。しかしながら、DNA 再複製抑制機構への関与の報告は未だなく、これらを対象とした siRNA を用いてスクリーニングすることで、新規の制御因子を同定できるのではないかと考えた。(1)で用いた siRNA ライブラリーには含まれていない遺伝子が多いことが分かったため、約 100 遺伝子の中から pseudogene を除いた 92 遺伝子に対する siRNA ライブラリーを構築した。

実際に構築した 92 遺伝子を対象とした siRNA ライブラリーを前述の HCT116 細胞株に導入し、Flowcytometry で DNA 含有量及び細胞周期プロファイルを解析したところ、DNA 含有量の増加を示すものはみられなかった。細胞周期プロファイルに関しては PRPF8、PSMD7 及び PSMD14 に関して明らかな G2/M arrest を示した(図 1)。その他、多くの遺伝子で細胞周期プロファ

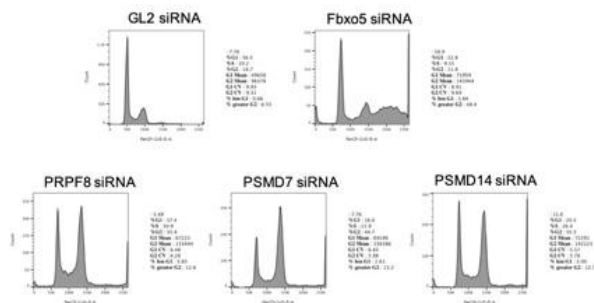


図1: 脱ユビキチン化酵素のノックダウンはG2/M arrestを誘導する

イルの軽度の変化を認めた。PRPF8 は分裂期の制御に関わることが過去に報告されているため、G2/M arrest を示したと考えられた。PSMD7 及び PSMD14 はいずれも 26S プロテアソームの構成因子であることが知られており、プロテアソームの機能不全により、G2/M arrest を引き起こすのではないかと示唆された。これらの結果より、G2/M の制御に関与すると思われる脱ユビキチン化酵素を同定することができたが、本来の目的である DNA 再複製を抑制している脱ユビキチン化酵素は同定できなかった。

(3)MLN4924(NEDD 化阻害薬)を用いた脱ユビキチン化酵素群を標的とした siRNA スクリーニング (2)の研究成果より脱ユビキチン化酵素の siRNA による Loss of function によって DNA 再複製は誘導されないことが分かった。脱ユビキチン化酵素にはそのアミノ酸配列の類似性から paralog や ortholog がいくつか存在しているものもあり、1 つの脱ユビキチン化酵素を siRNA によりノックダウンしても機能が paralog や ortholog によって保証される可能性も否定はできないため、配列の類似性を認める複数の分子を同時にノックダウンすることで DNA 再複製を誘導できる可能性はあると考えられる。

これまでの研究成果より、発想を転換し、DNA 再複製を刺激・誘導した条件下でこれを促進ないし抑制する脱ユビキチン化酵素を探索

することを考えた。DNA 再複製の誘導方法としては Emi1 siRNA、geminin siRNA などが挙がるが、siRNA ライブラリーとの co-transfection となるため、遺伝子導入効率の低下を招く可能性を否定できないため、薬剤による誘導を試みた。前述のように骨髄腫の治療に使用されている NEDD 化阻害薬である MLN4924 は DNA 再複製を誘導することができる。Cullin を構成要素とするユビキチンリガーゼ全体の活性化を抑制するため、特に CDT1 の蓄積させることが DNA 再複製の誘導に重要と考えられている。そこで抑制の陽性コントロールとして CDT1 siRNA を用いて条件検討を行なった。過去の報告に一致して、MLN4924 処理によって明らかな DNA 含有量の増加がみられ、DNA 再複製が誘導された。加えて CDT1 の siRNA によって、G2/M arrest 様の細胞周期プロファイルを示し、DNA 再複製を抑制できた(図 2)。

予備検討に従い、HCT116 細胞株に siRNA を導入後、24 時間後に 0.3 μ M の MLN4924 処理を 20 時間行い、PI 染色を行い、Flowcytometry にて解析を行なった(図 3)。DNA 再複製を促進した遺伝子は陽性コントロールである Emi1 のみであったが、興味深いことに 3 つの遺伝子が CDT1 siRNA に類似した G2/M arrest を引き起こし、DNA 再複製を抑制した。3 つのうち、1 つは NEDD 化を取り除く分子として報告されていた。つまり、この分子をノックダウンすると NEDD 化が蓄積することになり、MLN4924 の作用に拮抗するため、DNA 再複製を抑制したと考えられ、実施したスクリーニング系が正しく働いていると思われた。

そこで、残りの 2 つの分子に着目し、それぞれの siRNA を設計の異なる 2 配列ずつ購入し、PI 染色による Flowcytometry により検証実験を行なった。遺伝子 X では 2 種類いずれの siRNA においても DNA 再複製の抑制がみられ、遺伝子 Y に関しては 2 種類のうち一方のみで DNA 再複製の抑制がみられた。遺伝子 Y

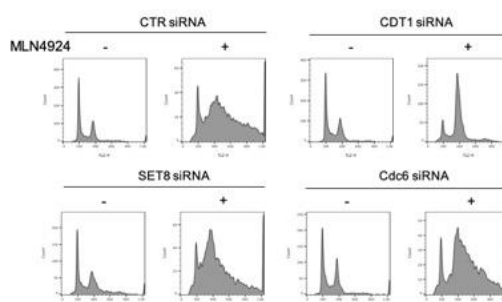


図2: MLN4924はDNA再複製を誘導し、これはCDT1のノックダウンにより抑制される

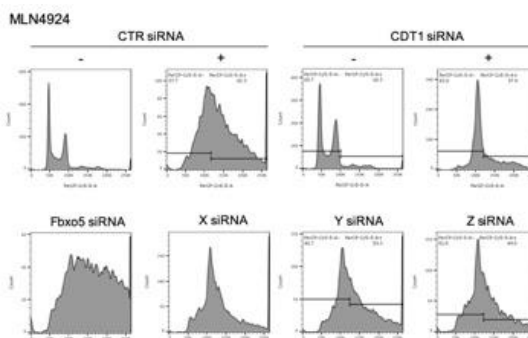


図3: 脱ユビキチン化酵素のノックダウンはMLN4924により誘導されるDNA再複製を抑制する

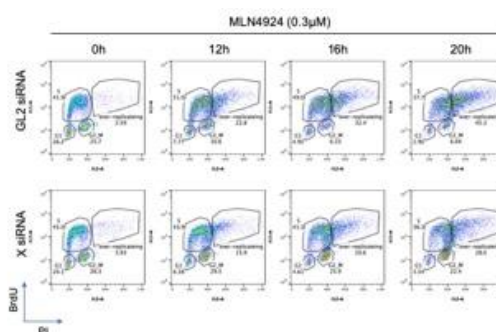


図4: 遺伝子XのノックダウンはMLN4924により誘導されるDNA再複製を抑制する

に関しては一方のみで DNA 再複製の抑制がみられたことに加えて、DNA 再複製を抑制した siRNA 導入細胞では MLN4924 未処理において G1 期に蓄積がみられたため、この配列が何らかのオフターゲット効果を示したと考え、遺伝子 X のみに着目することにした。

次に、DNA 複製時に取り込まれる BrdU で細胞を処理し、FITC 標識抗 BrdU 抗体と PI 染色を併せて行い、厳密な DNA 再複製を計測した。興味深いことに遺伝子 X のノックダウンにより、DNA 再複製が抑制されることが証明された(図 4)。しかし、Western blot 法により、DNA 再複製に関わる既知の分子群のタンパク発現を解析したが、大きな変化はみられなかった。従って、これまでに報告のない新規の経路によって DNA 再複製が抑制されている可能性が示唆された。さらに MLN4924 非投与で細胞周期を G1/S 期に同調させ、S 期から分裂期までの DNA 複製を観察したところ、DNA 複製の完了までの時間がコントロールに比べて延長していること、遺伝子 X がクロマチン結合因子と複合体を形成していることを見出した。その詳細を解析中である。研究期間は終了したが、この解析を今後も継続し、本研究により同定した新規の DNA 再複製抑制機構を論文として発表したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Siriwardena SBSM, **Tsunematsu T**, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-Related Factors as Potential Diagnostic and Therapeutic Targets in Oral Squamous Cell Carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci*. 2018 May 14;19(5). Pii:E1462. doi: 10.3390/ijms19051462. 査読有
2. Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacham K, **Tsunematsu T**, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit P, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblast promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 Jan 18;17(1):10. doi: 10.1186/s12943-018-0760-x. 査読有
3. Qi G, Liu J, Mi S, **Tsunematsu T**, Jin S, Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora Kinase Inhibitors In Head And Neck Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(3):199-213. doi: 10.2174/1568026618666180112163741. 査読有
4. Kujiraoka S, **Tsunematsu T**, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, Tanaka M, Kobayashi Y, Kondo T, Ushio A, Otsuka K, Kurosawa M, Saito M, Yamada A, Arakaki R, Nagai H, Nikai H, Takeuchi K, Nagao T, Miyamoto Y, Ishimaru N, Kudo Y. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. *Oral Oncol*. 2017 Jun; 69:46-55. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.04.003. 査読有
5. Ando T, Kudo Y, Iizuka S, **Tsunematsu T**, Umehara H, Shrestha M, Matsuo T, Kubo T, Shimose S, Arihiro K, Ogawa I, Ochi M, Takata T. Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma. *Sci Rep*. 2017 Jan 5;7:40187. doi: 10.1038/srep40187. 査読有
6. Kudo Y, Tada H, Fujiwara N, Tada Y, **Tsunematsu T**, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ*. 2016 Aug 1;38:13. doi: 10.1186/s41021-016-0042-z. 査読有
7. **Tsunematsu T**, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, Yamada A, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malasses stem cell properties. *Lab Invest*. 2016 Oct;96(10):1063-1075. doi: 10.1038/labinvest.2016.85. 査読有

[学会発表](計 7件)

1. **常松貴明**、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、小川博久、常山幸一、石丸直澄、DNA ライセンシング因子 CDT1 の新規ユビキチン分解機構とその意義の解明、第 107 回日本病理学会総会、2018 年

2. **常松貴明**、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄、工藤保誠、タンパク質のユビキチン分解を介した細胞周期と分化の制御機構, 2017 年度生命科学系合同年次大会(ConBio2017), 2017 年
3. **常松貴明**、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄、多能性幹細胞におけるユビキチンプロテアソーム経路による未分化性維持機構, 第 59 回日本歯科基礎医学会学術大会, 2017 年
4. **Takaaki Tsunematsu**, Naozumi Ishimaru, Yasusei Kudo, Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/C-Cdh1 ubiquitin ligase and maintains pluripotent stem cells, Gordon research conference 2017, Cell Growth and Differentiation, 2017 年
5. **常松貴明**、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、常山幸一、石丸直澄、胎児性癌におけるユビキチンプロテアソーム経路による未分化性維持機構, 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年
6. **常松貴明**, 癌の発生・進展に関する分子病理学的研究, 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年
7. **常松貴明**、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、小川博久、常山幸一、石丸直澄、染色体パセンジャー複合体タンパク質 Borealin のユビキチン分解の意義とその癌化への関与, 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 石丸 直澄

ローマ字氏名: (ISHIMARU, Naozumi)

研究協力者氏名: 工藤 保誠

ローマ字氏名: (KUDO, Yasusei)

研究協力者氏名: 新垣 理恵子

ローマ字氏名: (ARAKAKI, Rieko)

研究協力者氏名: 河合 秀彦

ローマ字氏名: (KAWAI, Hidehiko)

※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。