

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07289

研究課題名(和文) 発がん性複製ストレス応答分子を標的とした新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer therapy targeting the oncogene-induced replication stress response pathway.

研究代表者

関本 隆志 (Sekimoto, Takayuki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20436322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子が誘導する複製ストレス(発がんRS)は細胞死を誘導し、これを解消する応答機構ががん促進に重要な役割を果たす。この機構を解明し、RS増強による細胞死を誘導する治療法が期待されている。

本研究ではRS応答機構のRad51と、近年RSの原因として注目されているグアニン四重鎖(G4)が発がんRSに与える影響を解析し以下の結果を得た。(1)Rad51が複製フォークの保護と相同組換え修復を介してMyc誘導性RSへの耐性を高め、細胞の生存・増殖を促進する。(2)Myc活性化によりG4が増加し、G4安定化剤はRS反応を増強した。(3)このG4増加に対する応答にPolymerase が関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mycファミリー転写因子は代表的がん遺伝子であるが、これを直接標的とする有望な抗がん剤候補は現存せず、新規治療法の開発が期待されている。がんの本質とも言えるDNA損傷応答機構の異常が明らかになるにつれ、これを標的にした分子標的試薬や複数の因子を標的とする「合成致死」を介した治療法の開発が進められている。発がんRS応答機構も標的の一つとして注目され、近年、その成果が報告されつつある。本研究の成果もその一端に位置し、新規がん治療の開発につながることを目標として研究に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Activation of oncogene induces slowing or stalling of the replication forks, referred to as “replication stress” (RS), leading to generation of double-strand breaks (DSBs) and genomic instability. Some pathways to overcome RS are useful for neoplastic cells to survive oncogene-induced RS, thus providing potential targets for cancer therapy.

We study the role of Rad51, which is involved in RS response pathways via homologous recombination of DSB repair and regulating progression of replication forks, and Guanine-quadruplex (G4) DNA, four-stranded structures formed by single-stranded G-rich sequences, in oncogene c-Myc (Myc)-induced RS. (1) Rad51 promotes cellular tolerance of Myc-induced RS. (2) Myc activation increases G4 DNA structures and treatment with G4 stabilizing agents enhances Myc-induced DSBs and cell death. (3) Polymerase (Pol), which prevents Myc-induced RS, might participate in G4-mediated RS in Myc-activating cells.

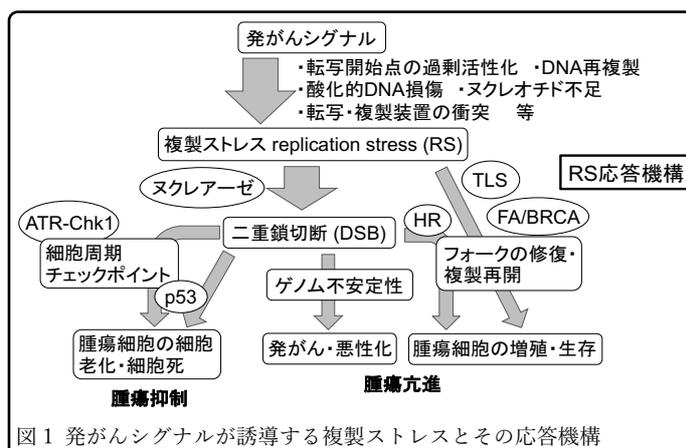
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：複製ストレス 発がん c-Myc Rad51 グアニン四重鎖 Polymerase

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子の活性化などの発がんシグナルは、複製開始点の過剰活性化、DNA再複製、酸化ストレス、ヌクレオチド不足や転写・複製装置の衝突などを原因とするDNA損傷を引き起こし、複製フォークを遅延・停止させる(発がん性複製ストレス {replication stress}: 発がんRS)。その結果活性化するヌクレアーゼにより生じるDNA二重鎖切断(DSB)は、細胞死や細胞周期チェックポイントを介した細胞老化を誘導し腫瘍抑制に働く。一方、DSBはゲノム不安定性を介した発がんやその悪性化の原因となり、また、RS応答機構によるDSB修復や複製フォークの修復・複製再開は腫瘍細胞の増殖、生存に重要な働きを果たす(図1)。したがって、これら発がんRSやそれに対する応答機構を明らかにすることは、発がん過程を解明し、がんの新規治療法の開発に繋がる事が考えられ非常に重要である。

紫外線や化学物質に対するRS応答機構については、近年理解が進み、(1)細胞周期チェックポイントを作動させる「ATR-Chk1経路」、(2)ファンコニ貧血(fanconi anemia: FA)と家族性乳がん(BRCA)の原因遺伝子群から構成され、ゲノム安定化と腫瘍抑制に働く「FA/BRCA経路」、(3)Y-familyポリメラーゼ(Y-Pol)をはじめとする複製忠実度の低いポリメラーゼにより損傷DNAを乗り越えて複製を継続する「損傷乗り越えDNA合成(TLS)」、(4)リコンビナーゼRad51を中心とする「相同組換え(HR)」などが協同してRSの解消・軽減に働く(図1)。発がんRSにおいてもこれらがストレスの軽減に働く事が明らかになりつつあるが、発がんRSの発生・応答機構は多様であり、いまだ不明な点が多い。

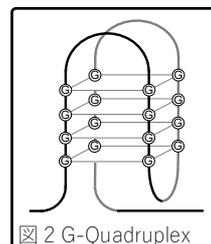


2. 研究の目的

我々は、Y-PolとFA/BRCA経路の制御機構の研究を行い、分子シャペロンHsp90が、FA蛋白の一つFANCAの安定性や細胞内動態の制御を介してFA/BRCA経路を調節していること、Y-Polの安定性や複製障害部位への動員の制御を介してTLSに影響することを報告してきた。これらの研究を遂行する中で、発がんRS応答機構に着目し研究を開始した。近年、いくつかのRS応答分子が発がんRSの軽減に関与し、その抑制がRSを増強、細胞死を誘導するという報告がされた。これらのことから、発がんRSにおいて既知のRS応答因子の関与を系統的に検証し、それらの単独もしくは組み合わせの抑制が誘導する殺腫瘍細胞効果を解析することにより、新たながん治療法の発見に貢献できるのではないかと着想するに至った。これらの検証により、がん遺伝子c-Myc(Myc)を活性化したモデル細胞系において、相同組換えや複製フォークの修復・複製再開に関与するRad51やDNAヘリカーゼRecQ5が発がんRSの軽減に働くことを示唆する結果を得た。

Rad51は従来知られていたDNA二本鎖切断(DSB)に対する相同組換え修復に加えて、複製フォークの修復・複製再開において中心的役割を果たすことが明らかとなってきた。より詳細には、停止した複製フォークのreversalと呼ばれるリモデリングと、その後のヌクレアーゼによる分解からの保護への関与を通して、複製の再開を促進する。しかし、Rad51が発がんRS応答において果たす役割については、まだ十分明らかではない。そこで、(1)Rad51が発がんRSにおける機能を解析することを本研究の目的として解析をおこなった。

RecQ5をはじめとするRecヘリカーゼファミリーの標的の一つにグアニンに富む一本鎖DNAが形成する高次構造グアニン四重鎖(G quadruplex; G4)が知られている(図2)。ヒトゲノム配列中には、G4を形成しうるモチーフ(GGGN₁₋₇GGGN₁₋₇GGGN₁₋₇GGG)が、テロメアやプロモーター領域を中心に37万以上であると推定されている。最近の研究から、G4構造は遺伝子発現やDNA複製、テロメア維持機構などの様々な機能に関与することが報告されており、その異常な形成は神経変性疾患やがんの一因になることが示唆されている。近年、G4を認識する抗体が開発され(Biffi et al., *Nat Chem* 2013; Henderson et al., *NAR* 2013)、その動態や生理的意義の解明が著しく進み、複製や転写、翻訳など様々な生命現象の制御に関与することが報告されてきた。抗G4抗体を用いた免疫染色において、S期



において G4 foci が増加し、複製阻害剤処理により G4 foci が減少すると報告された(Biffi et al., *Nat Chem* 2013)。さらに、HR に関与する Rad51 や BRAC1/2 の発現抑制、欠損細胞は G4 安定化剤に対する感受性を増加させることが報告された (Zimmer et al., *Mol Cell* 2016; Xu et al., *Nat Commun* 2017)。これらのことから、(2) G4 リガンドによる RS 応答を解析し、その抗腫瘍細胞効果を検討もおこなう。

3. 研究の方法

Myc 活性化により誘導される発がん RS のモデル細胞系として、タモキシフェン感受性のエストロゲンレセプターリガンド結合ドメインと Myc 融合タンパクを定常的に発現したヒト骨髄腫由来低悪性腫瘍細胞株 U2OS(U2OS/Myc-ER)、ヒト不死化繊維芽細胞 OUMS 36T-3F(OUMS/Myc-ER)を作成した。この細胞は、4-hydroxytamoxifen (4OHT)添加により、Myc 発現・活性化を誘導できる。このモデル実験系において、Rad51 の発現抑制や G4 リガンド処理が Myc 誘導性 RS に与える影響を以下の様に解析する。i) Myc 誘導性の細胞増殖抑制や細胞死、細胞周期停止に与える影響。ii) RS の結果生ずる DSB[DSB マーカーであるリン酸化ヒストン H2AX(γ H2AX)の WB や免疫染色、コメットアッセイ]。iii) IdU, CldU でパルス標識した DNA を抽出し、DNA fiber 法によって、複製ダイナミクスをゲノムワイドに定量化する。

4. 研究成果

(1) Myc 誘導性発がん RS における Rad51 の働き

① Rad51 の発現抑制の Myc 誘導性複製ストレス応答経路への影響

Myc 活性化細胞における Rad51 発現抑制の影響を検証した。Rad51 発現抑制後 24 時間後に 4-OHT 処理をおこない、細胞増殖を解析した。既報の通り Myc 活性化は細胞増殖を抑制した。一方、Rad51 発現抑制のみでも増殖抑制効果は見られたが、両者の組み合わせではより強い抑制効果を示した。以上より、Myc 誘導性の細胞増殖抑制は、Rad51 の発現抑制により促進されることが示された。次に、フローサイトメトリーを用いて 4-OHT 処理 24 時間後の細胞周期を解析したところ、Myc 誘導性の G2/M 期の細胞割合の増加(G2 期細胞周期停止)は、Rad51 の発現抑制によって明確に増加した。しかし 48 時間後には、G2/M 期細胞の割合はコントロール siRNA と同程度であった。このことから、Rad51 の発現抑制による Myc 誘導性の G2 期細胞周期停止の増強は、Myc 活性化早期の段階で出現し、増殖抑制の一因となった可能性が考えられたが、その効果は継続しなかった。さらに、DSB 形成への影響を検討するために DSB マーカーである γ H2AX の免疫染色をおこなったところ、4-OHT 処理後 48、72 時間のいずれのタイムポイントにおいても Rad51 発現抑制は Myc による γ H2AX シグナルを増強させた。加えて、DSB を直接的に一細胞レベルで検出できるニュートラルコメットアッセイにおいても同様の結果が得られた。以上のことから、Myc 誘導性 DSB 形成は、Rad51 の発現抑制によって亢進することが示された。この結果からは、Rad51 の相同組み換え修復が障害されたことにより DSB が蓄積された可能性と、複製ストレス抑制に働く機能が障害されたことにより、続発する DSB 形成が促進された可能性の両方が考えられる。そこで、この DSB 形成の亢進が、複製ストレスに関連した S 期に生じたものであるかを検証するために、4-OHT 処理 48 時間後に γ H2AX を PCNA と二重染色した。PCNA は、ポリメラーゼが鋳型 DNA から離れないように支える sliding clamp であり、S 期特異的マーカーとして用いられる。4-OHT 処理/Rad51 発現抑制による γ H2AX 陽性細胞は大部分 PCNA 陽性であった。すなわち、Rad51 の発現抑制によって亢進する Myc 誘導性の DSB 形成は S 期の細胞を中心に生じており、複製ストレスに関連して促進されたものであることが示唆される。最後に、細胞死の割合を測定した。Rad51 の発現抑制は Myc 誘導性の細胞死を亢進させた。

ここまでの結果をまとめると、Rad51 の発現抑制は、Myc 誘導性の G2 期細胞周期停止の増強や S 期を中心とした DSB 形成を促進させ、結果として増殖抑制や細胞死を亢進させた。したがって、Rad51 が Myc 誘導性複製ストレスや続発する DSB 修復に重要な働きをすることが示唆された。

② Fork reversal 関連分子の発現抑制が Myc 誘導性増殖抑制、G2 期細胞周期停止、DSB 形成に与える影響は軽度である

Myc 誘導性複製ストレスに応答する Rad51 の機能として、まず、fork reversal 機構に着目した。Rad51 による fork reversal を検討することが本来の目的であるが、多機能な Rad51 に対する発現抑制からは詳細を知ることができない。そこで、fork reversal を促進する SMARCAL1、ZNRANB3、HLTF、UBC13 の発現を抑制して、Myc 誘導性複製ストレスへの影響を調べた。siRNA を導入してこれらの分子の発現を抑制した後、4-OHT 処理を行い細胞増殖、 γ H2AX の免疫染色、細胞周期の解析を行った。SMARCAL1、UBC13 の発現抑制は、いずれのタイムポイントにおいても Vehicle 処理細胞で増殖が強く抑制され、それと比較した 4-OHT 処理による増殖抑制の亢進はほ

とんど見られず、Myc 非依存的な効果が働いた可能性が高かった。ZNRANB3、HLTF の発現抑制は 4-OHT 処理の有無に関わらず、コントロール siRNA と同様の变化量を示し、これらの分子の発現抑制は Myc 誘導性の増殖抑制効果に影響を与えなかった。次に、4-OHT 処理 48 時間後の γ H2AX の蛍光強度を測定した。ZNRANB3、HLTF の発現抑制において、4-OHT 処理による γ H2AX の蛍光強度は Vehicle 処理と比較して増加したが、Rad51 の発現抑制における効果と比べて軽度であった。一方、SMARCA1、UBC13 の発現抑制は、4-OHT 処理によって γ H2AX 蛍光強度を増強させた。しかし、Vehicle 処理においても γ H2AX 蛍光強度が増加しており、4-OHT 処理による増加量としてはコントロール siRNA と同等であった。以上の結果から、fork reversal の関連分子の発現抑制は、Myc 誘導性 DSB 形成を促進する効果は弱いと考えられる。最後に、4-OHT 処理 24、48 時間後に細胞周期を解析した。SMARCA1 発現抑制において、4-OHT 処理 24 時間処理後の G2 期細胞周期停止は、Vehicle 処理細胞と比較して促進され、この効果は、48 時間後にさらに増強した。しかし、いずれのタイムポイントにおいても 4-OHT 処理による変化量としては、コントロール siRNA の変化量と同等であり、SMARCA1 発現抑制は、Myc 誘導性 G2 期細胞周期停止を亢進させなかった。一方、ZNRANB3、HLTF、UBC13 の発現抑制における G2/M 期細胞割合は、いずれのタイムポイントにおいても、コントロール siRNA と同等であり、これらの発現抑制は細胞周期にほとんど影響を与えなかった。これらのことから Myc 誘導性の複製ストレス応答にこれらの分子による fork reversal が関与するかを検証したところ、その関連を完全に否定できないが少なくとも軽度であると考えられた。

③ Rad51 の発現抑制は Myc 誘導性の fork の停止または分解を促進する

複製ストレスを直接的に評価するために、複製 fork の進行動態を可視化し定量的に分析できる DNA fiber assay を行った。既報の通り、4-OHT 処理では Fork の進行停止、または Fork の分解が生じていた。Rad51 の発現抑制単独でも Fork の複製速度の低下が見られたが、進行停止や分解は起こっていなかった。一方、Rad51 抑制/4-OHT 処理においては、多くの fork で Myc 誘導性の fork 停止または分解が強く促進されていた。これらの結果から、Rad51 が、Myc 誘導性複製ストレスによる fork の進行停止または分解を抑制することが示唆された。Rad51 がいずれの作用に関与するかを明らかにすることは今後の課題である。

(2) Myc 誘導性発がん RS における G4 の関与

① Myc 活性化は複製促進を介して G4 形成を促進し、G4 リガンド処理は Myc による RS 反応を増強する

近年、G4 を特異的に認識するモノクローナル抗体が開発され、細胞内の G4 構造を検出することが可能となった。そこで、まずこの抗体を用いて核内 DNA の G4 構造を染色したところ、4-OHT 処理によって G4 シグナルの増加が見られた。対比染色としておこなった DAPI 染色により DNA 量を計測し細胞周期を解析したところ、主に S 期の細胞で G4 シグナルが増加していた。また、Cdc45 過剰発現により複製起点の活性化を引き起こし Myc の持つ複製活性化をミミックすることにより G4 シグナルが増加した。次に、G4 リガンドの Myc 活性化に対する影響を解析した。4-OHT 処理 24 時間後に G4 リガンド Pyridostatin(PDS)を処理し、PDS24、48 時間後に γ H2AX で DSB 形成を測定した。Myc 活性化、PDS 単独処理でも γ H2AX が増加したが、両者の処理によりそのシグナルは相乗的に増加した。加えて、複製阻害剤処理はこの γ H2AX シグナルを減少させた。同様に、4-OHT/PDS 処理は Myc 活性化、PDS 処理による細胞死を増強した。また、別の G4 リガンド(Phen DC3)や細胞株でも同様の結果が得られた。以上の結果から、Myc による複製の活性化を原因として G4 が形成され、G4 リガンド処理は Myc 誘導性 RS 反応を増強し、DSB 形成、細胞死を増加させたことを示唆する。Myc によって形成された G4 が RS の原因となったか、あるいは別の原因で生じた RS の結果生じた一本鎖 DNA で G4 が形成されたかは定かではない。Myc が誘導する G4 形成の詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。

② Myc による G4 増加に対する応答に Polymerase η が関与する

我々は Myc による発がん RS の軽減に Y-family ポリメラーゼ(Y-Pol)の一つ Polymerase η (Pol η) が関与することを報告した(Kurashima et al., *J Cell Sci* 2018)。また、In vitro において、Pol η が G4 を含む鋳型の複製に関与することが報告された(Eddy et al., *Biochemistry* 2016)。以上のことから、Myc による G4 増加に対する応答に Pol η が関与する可能性を考え、U2OS/Myc-ER 細胞に GFP-Pol η を定常的に発現させた細胞を作成し、以下の解析をおこなった。PDS 処理は単独でも Pol η の核内集積を増加させたが、4-OHT との同時処理によりその集積は増強された。加えて、Pol η 発現抑制は 4-OHT/PDS 処理による細胞死を増強させた。これらのことは、Myc による G4 増加に対する応答に Pol η が関与することが示唆される。しかし、Pol η の RS 部位への集積に重要な役割を果たす PCNA モノユビキチン化が PDS 処理で増加せず、また、4-OHT/PDS 処理による DSB は Pol η 発現抑制で増強しなかった。これらの結果から、Myc による G4 増加とその Pol η による応答は一般的な RS 応答機構を介したのではなく、別の分子機構である可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurashima Kiminori, Sekimoto Takayuki, Oda Tsukasa, Kawabata Tsuyoshi, Hanaoka Fumio, Yamashita Takayuki	4. 巻 131
2. 論文標題 Pol γ , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs212183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.212183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oda Tsukasa, Sekimoto Takayuki, Kurashima Kiminori, Fujimoto Mitsuaki, Nakai Akira, Yamashita Takayuki	4. 巻 131
2. 論文標題 Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs210724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.210724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関本隆志、山下孝之
2. 発表標題 がん遺伝子誘導性複製ストレスにおけるグアニン四重鎖構造の役割
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大園真純、関本隆志、熊谷理穂、廣江珠希、齋藤貴之、村上博和、山下孝之
2. 発表標題 がん遺伝子誘導性Replication Stress(RS)への応答におけるRAD51を介するフォーク保護機構
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田司、関本隆志、山下孝之
2. 発表標題 53BP1はHSF1抑制で誘導される細胞老化に關与する
3. 学会等名 第77回日本癌学会學術總會
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関本隆志、山下孝之
2. 発表標題 Myc誘導性複製ストレスにおけるグアニン四重鎖構造は治療標的になり得るか
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所 https://www.imcr.gunma-u.ac.jp 群馬大学生体調節研究所遺伝子情報分野 http://molgen.imcr.gunma-u.ac.jp

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------