

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340028

研究課題名(和文) DNA損傷を介さないATM依存的な細胞ストレス応答と発がん抑制機構の解析

研究課題名(英文) Involvement of DNA damage-independent and ATM-dependent stress response in tumor suppressive mechanism

研究代表者

小林 昌彦 (Kobayashi, Masahiko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70285633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷チェックポイント因子ATMは、DNA損傷に対する細胞応答に加えて、グリオーマの悪性化に重要となるエネルギー代謝経路に対し、AMPKのリン酸化の制御を介して関与していることを明らかにした。このエネルギー代謝経路、特に、ミトコンドリアによるエネルギー合成経路は、mTORC1活性の高い悪性グリオーマの治療標的として利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：ATM is involved in the regulation of energy metabolism, which is important for malignancy of glioma, via AMPK phosphorylation in addition to its DNA damage response. This energy metabolism pathway, especially mitochondrial energy production, may be an effective therapeutic target for glioma patients.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ATM 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) の原因因子 ATM は、電離放射線による DNA 2 重鎖切断等の DNA 構造のゆがみのシグナルを受け、不活性化型 2 量体から単量体へと分離し、活性化し、細胞応答を制御するチェックポイント因子である。ATM 欠損の遺伝性疾患である AT は、リンパ系腫瘍の高発、早老症状、小脳変性、免疫不全、毛細血管拡張等を主症状とする。しかし、これらの中には、DNA 2 重鎖切断に対する応答異常だけが原因とは考えにくい症状も存在する。そこで、もう一つの原因として注目されているのが酸化ストレスである。実際に、AT 細胞では多くのレドックス状態異常が見られる。我々はこれまで、DNA 2 重鎖切断に起因する ATM の活性化機構とは異なる、酸化ストレスによる ATM の活性化機構について研究しており、2006 年に、酸化ストレスを引き起こす SH 基反応性親電子性代謝産物 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J_2 (15d-PG J_2) の刺激により ATM が活性化し、その活性化には、DNA 2 重鎖切断応答に必須なセンサー因子 NBS1 は必要ないこと、および、15d-PG J_2 は ATM に直接的に結合することを論文で発表した (参考文献 1)。15d-PG J_2 刺激に対する細胞応答では、p53 のリン酸化や蓄積、および、細胞老化と ATM 依存的なアポトーシスが誘導され、DNA 損傷の指標である H2AX、Chk1、Chk2 のリン酸化は誘導されなかったことから、15d-PG J_2 による ATM の活性化機構は、DNA 2 重鎖切断に対する応答機構とは異なるものであると考えられる。

さらに、2011 年に、細胞内 AMP/ATP 比や代謝制御因子 AMPK、mTOR の活性に作用するとされる 2 型糖尿病の治療薬であるメトホルミンが ATM 経路に影響を及ぼすことが報告された (参考文献 2)。メトホルミンの ATM 経路への作用機構はわかっていないが、DNA 損傷を介している可能性は低く、DNA 2 重鎖切断を介した ATM 経路とは異なるものと考えられる。また、メトホルミンには発がんを抑制する未解明の作用もあるため、メトホルミンと ATM、mTOR との関連性を明らかにすることは、メトホルミンの発がん抑制機構の解明にもつながる可能性が高い。

以上のように、酸化、代謝ストレスの制御に ATM が関与していることが明らかになり、これまで考えられていたより ATM は多機能であることがわかってきた。発がんの過程において、原がん遺伝子やがん抑制遺伝子等に変異が入る前段階として、細胞内は酸化ストレスをはじめとする様々なストレス過多の状態にあるため、ATM が、DNA 損傷に加えて、このようなストレス応答に関与していることは十分に考えられる。そのため、ATM の機能の精査は、発がんの過程における生体防御機構のさらなる理解に重要である。

2. 研究の目的

DNA 損傷チェックポイント因子 ATM は、酸化ストレスによって直接的に、DNA 損傷を介さずに活性化することが明らかになってきた。これまでの ATM の研究は、DNA 損傷修復における機能についてのものが主流であった。そのため、DNA 損傷を介さない ATM の細胞応答の機能はほとんどわかっていない。また、ATM は、多くのがんで活性化している mTORC1 経路の制御にも関わっている。そのため、DNA 損傷とは異なる機構で ATM を活性化する細胞ストレス、および、DNA 修復とは異なるチェックポイント機能、細胞応答を明らかにすることは発がん機構を明らかにする上で重要である。本研究では、DNA 損傷修復とは異なる観点で、酸化、代謝ストレスに対する ATM を介した細胞応答を解析し、そのストレスや発がん制御における意義を検討し、ATM を介したストレス応答機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 損傷応答とは異なる、酸化ストレス、代謝ストレスに対する ATM を介した細胞応答を明らかにするため、DNA 損傷を起こさない、SH 基反応性代謝産物 15d-PG J_2 と ATM 活性に影響を及ぼす可能性が報告された 2 型糖尿病の治療薬メトホルミン、DNA 損傷の影響が少ないと考えられる低線量の電離放射線等を用いて、ATM 依存的、および、ATM 非依存的細胞応答、特に、mTORC1 経路やがんの幹細胞性に対する影響を解析する。

(2) 多くのがんで活性化していることが明らかになっている mTORC1 経路と ATM の関連性が報告されているため、グリオーマを対象に、mTORC1 のがんにおける役割を幹細胞性やメタボロームについて解析し、その役割に対する ATM の機能を、上記の刺激を用いて解析する。また、mTORC1 活性の高い悪性グリオーマにおいて活性化している代謝経路に作用する化合物を用い、その効果を解析することによってグリオーマの悪性化に重要な機構を明らかにし、その機構に対する ATM の関連性を解析する。以上より、ATM を介した細胞応答のストレスやがん抑制における意義を検討する。

4. 研究成果

DNA 損傷とは異なる、酸化ストレス、代謝ストレスに対する ATM を介した細胞応答を明らかにすることを目的とし、DNA 損傷を引き起こさないと考えられる SH 基反応性代謝産物、ATM 経路に影響を及ぼす可能性が報告されている 2 型糖尿病の治療薬メトホルミン、および、DNA 損傷を引き起こす電離放射線を用いて、野生型、ATM 欠損型細胞を刺激し、それに対する細胞応答を解析した。その結果、酸化ストレスを引き起こす SH 基反応性代謝産物 15d-PG J_2 は ATM を活性化し、さらに、ATM 非依存的に mTORC1 を活性化した。酸化ストレスによる ATM の活性化には Cys2991 を介し

た ATM 間のジスルフィド結合によるホモダイマーの形成が報告されているが(参考文献 3) 15d-PGJ₂ による ATM の活性化にはホモダイマーの形成は必要ではなく、ATM 内の SH 基の修飾がより重要である可能性を見出した。また、メトホルミンは ATM 依存的に mTORC1 に対する抑制性制御因子である AMPK のリン酸化を誘導した。実際、ATM は LKB1-AMPK 経路、および、TSC1-TSC2 複合体との相互作用を介して mTORC1 活性を制御し、過酸化水素などの活性酸素による処理は、ATM を介した AMPK のリン酸化を誘導し、mTORC1 経路を制御することが報告されている(参考文献 4) しか、メトホルミンの場合とは異なり、15d-PGJ₂ による ATM の活性化では AMPK のリン酸化は誘導されなかったため、15d-PGJ₂ による ATM の活性化は、メトホルミンや過酸化水素の場合とは異なる細胞応答経路であると考えられた。

酸化ストレスや ATM、mTORC1 は幹細胞性の維持と密接に関連しているため、ヒトグリオーマイニシエーティング細胞(GIC)を用いて、ATM や mTORC1 に作用するストレスが幹細胞性へ及ぼす影響を、幹細胞性の指標の一つであるスフィア形成能について解析した。GIC では、電離放射線やマイトマイシン C などの DNA 損傷刺激、メトホルミン刺激、15d-PGJ₂ 刺激のいずれも、スフィア形成能を低下させたが、低酸素条件はスフィア形成能に影響を及ぼさなかった。さらに、マウス GIC を用いて、mTORC1 に対するネガティブ制御因子である TSC1 を 4-OHT 処理で欠失させ、mTORC1 を活性化した場合の影響を調べた結果、mTORC1 の活性化はスフィア形成能を増加させ、mTORC1 の阻害剤処理はスフィア形成能を低下させた。これらの結果より、GIC において、DNA 損傷刺激とは異なる酸化ストレスやメトホルミンも、幹細胞性を減少させる作用があることを示した。15d-PGJ₂ は mTORC1 を活性化するが、GIC では幹細胞性は増強されなかった。その理由として、酸化ストレスによる細胞機能の傷害が影響しているものと考えられた。

上記のように、ATM の下流に存在する mTORC1 の活性化は GIC を増加させ、グリオーマを悪性化することを明らかにした(発表論文 2)。そこで、TSC1 を欠失させ mTORC1 を活性化させたマウスグリオーマ細胞を用いて、メタボローム解析を行い、mTORC1 が活性化したマウスグリオーマ細胞では、解糖系と酸化的リン酸化の両方が活性化していることを明らかにした。これらの結果をもとに、解糖系や酸化的リン酸化の経路を傷害する化合物を用いて、グリオーマの幹細胞性への影響を解析した。その結果、細胞内の ATP 量を下げ作用のある化合物が、mTORC1 活性が高い悪性グリオーマに対し効果的に増殖を抑制することを見出した。さらに、これらの細胞内 ATP 量を下げ作用する化合物は、ミトコンドリア機能を傷害する作用を示し、mTORC1 活性の高

いグリオーマ細胞において、効果的に幹細胞性の指標の一つであるスフィア形成能を低下させた。特に効果の高い化合物についてヒトグリオーマ細胞を用いて解析し、AMPK のリン酸化の上昇や幹細胞性マーカーの発現減少を誘導することを明らかにした。メトホルミンはミトコンドリアの電子伝達系複合体 I を阻害することが報告されているので(参考文献 5、6) メトホルミンをはじめとするミトコンドリアを傷害する化合物は、GIC において、細胞内のエネルギーバランスを壊し、エネルギーバランスの調整能力の低い mTORC1 活性の高い GIC の幹細胞性を傷害し、それががんの抑制に働くと考えられた。

本研究では、ATM は、DNA 損傷に対する細胞応答とは異なる、悪性グリオーマの幹細胞性の維持に重要となるエネルギー代謝経路の制御に関与していることを明らかにし、この機構は mTORC1 活性の高い悪性グリオーマなどの治療標的として利用できる可能性を示した。

本研究の予備的実験より派生した研究において、ATM を介した DNA 2 重鎖切断のシグナル伝達に必要なとされる NBS1 が、ATR を介した DNA 複製阻害のシグナル伝達系にも必須であることを見出し、論文を発表した(参考文献 7)。さらに、NBS1 が DNA 損傷により ATM だけでなく DNMT1 と結合すること、ATM が DNMT1 タンパク質の安定性や DNA のメチル化を調整する RB の機能に関わっていることを明らかにした論文を発表した(発表論文 3、4)。

参考文献

- (1) Kobayashi M, Ono H, Mihara K, Tauchi H, Komatsu K, Shibata T, Shimizu H, Uchida K, and Yamamoto K. ATM activation by a sulfhydryl-reactive inflammatory cyclopentenone prostaglandin. *Genes to Cells*. 2006 Jul;11(7):779-89.
- (2) The GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group & The Wellcome Trust Case Control Consortium. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2011 Feb;43(2):117-20.
- (3) Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010 Oct;330(6003):517-21.
- (4) Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar;107(9):4153-8.
- (5) Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its

anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000 Jun;348(3):607-14.

(6) El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000 Jan;275(1):223-8.

(7) Kobayashi M, Hayashi N, Takata M, Yamamoto K. NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1. *Genes to Cells.* 2013 Mar;18(3):238-46.

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4件)

Ali MAE, Naka K, Yoshida A, Fuse K, Kasada A, Hoshii T, Tadokoro Y, Ueno M, Ohta K, Kobayashi M, Takahashi C, Hirao A. Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jul 18;450(1):837-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.066. 査読有

Yamada D, Hoshii T, Tanaka S, Hegazy AM, Kobayashi M, Tadokoro Y, Ohta K, Ueno M, Ali MAE, Hirao A. Loss of Tsc1 accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals. *J Biochem.* 2014 Apr;155(4):227-33. doi: 10.1093/jb/mvt112. 査読有

Hayashi N, Kobayashi M, Shamma A, Morimura Y, Takahashi C, Yamamoto K. Regulatory interaction between NBS1 and DNMT1 responding to DNA damage. *J Biochem.* 2013 Nov; 154(5):429-35. Doi: 10.1093/jb/mvt071. 査読有

Shamma A, Suzuki M, Hayashi N, Kobayashi M, Sasaki N, Nishiuchi T, Doki Y, Okamoto T, Kohno S, Muranaka H, Kitajima S, Yamamoto K, Takahashi C. ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation. *Mol Cell Biol.* 2013 Aug;33(16):3113-24. doi: 10.1128/MCB.01597-12. 査読有

[学会発表](計6件)

小林昌彦、山田大祐、Hegazy AM、平尾敦、Efficient targeting malignant phenotypes of glioma by inhibition of mitochondrial activity、第74回日本癌学会学術総会、愛知県名古屋市、2015年10月8日、名古屋国際会議場

Hegazy AM、小林昌彦、山田大祐、平尾敦、

mTOR複合体1活性化グリオーマの悪性化形質に対するミトコンドリア活性阻害の効果、第3回がんと代謝研究会、石川県金沢市、2015年7月16日、石川県立音楽堂交流ホール

小林昌彦、山田大祐、Hegazy AM、平尾敦、mTOR複合体1のエネルギー代謝調節機構を介したグリオーマ幹細胞の悪性化の解析、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、東京都千代田区一ツ橋、2015年1月28日、一橋講堂学術総合センター2F

小林昌彦、山田大祐、Hegazy AM、平尾敦、mTORC1の活性化によるグリオーマ幹細胞の悪性化の解析、日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム、石川県金沢市、2015年1月22日、石川県立音楽堂交流ホール

小林昌彦、山田大祐、平尾敦、グリオーマイニシエーティング細胞のエネルギー代謝制御におけるmTOR複合体1の役割、第73回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2014年9月25日、パシフィコ横浜

小林昌彦、山田大祐、Hegazy AM、平尾敦、mTOR複合体1による代謝調節を介したグリオーマ悪性化機構、第2回がんと代謝研究会、東京都葛飾区新宿、2014年7月11日(11日)、東京理科大学葛飾キャンパス講堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林昌彦 (KOBAYASHI, Masahiko)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号：70285633