

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893292

研究課題名(和文) NFB1/MDC1抑制効果を応用したがん治療への分子機構解明と生物学的因子同定

研究課題名(英文) Potential anticancer effect by inhibiting NFB1/MDC1

研究代表者

安藤 清宏 (ANDO, KIYOHRO)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・客員研究員

研究者番号：10455389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：NFB1/MDC1の機能抑制は放射線や抗がん剤の感受性を亢進することが知られているが詳細な分子機構や効果予測のための生物学的因子は不明である。本研究においてNFB1はPLK1によるリン酸化を受けてNFB1とTOP2Aの物理的結合に依存するdecatenation checkpointを解除し、分裂期の早期開始を引き起こすことが判明した。この結果から、NFB1の機能抑制による未熟な分裂期開始が放射線や抗がん剤感受性を亢進する分子機構の一つと考えられた。さらに効果予測のための生物学的因子としてTP53とその転写活性化標的遺伝子が関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that functional inhibition of NFB1/MDC1 potentiates anticancer effect. However, the molecular mechanism and biomarker that predicts its sensitivity have been still unclear. In this study, we clarified that NFB1 is phosphorylated by PLK1 and allows cell to enter mitosis by recovering decatenation checkpoint that is mediated a physical interaction of NFB1 and TOP2A. These results indicated that the precocious M phase entry by inhibiting NFB1 might increase sensitivity of a genotoxic agent and radiation. Furthermore, our microarray analysis suggested that possible candidates of biomarker related to the sensitivity were TP53 and its downstream genes.

研究分野：がんの分子生物学

キーワード：NFB1 MDC1 PLK1 topoisomerase decatenation checkpoint neuroblastoma CHK1 TP53

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤処理または放射線照射に起因するDNA二本鎖切断は、PIK3 kinase(ATM, ataxia telangiectasia mutated etc.) による histone H2AX のリン酸化(γ-H2AX)に始まるDNA損傷シグナルの急速な増幅とそれに続くDNA修復タンパクの集積およびチェックポイントの活性化を誘導する。NFBD1/MDC1は、DNA二本鎖切断が生じた際にγ-H2AXとリン酸化ATM(pATM)との結合を仲介するアダプターとして機能することが判明し、損傷部位にpATMの局在を保持するために必要不可欠な分子と考えられている。(Ozaki et al. DNA cell Biol, 2000, Coster and Goldberg Nucleus, 2010) さらに、NFBD1/MDC1の発現または機能抑制は、放射線や薬剤に対する細胞の感受性が亢進することが報告されている。(Nakanishi et al. J Biol Chem, 2007, Mailand et al. Cell, 2007)

これらの報告より、染色体不安定性をすでに有するがん細胞に対するNFBD1/MDC1の機能抑制は、より効果的に治療感受性を増強する可能性があることと推察されることから、がんに対する治療応用が期待される。したがって、その詳細な分子機構の解明は治療法開発のための必須の課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、NFBD1/MDC1の機能抑制を応用した新規がん治療開発に向けた詳細な分子機構の解明と生物学的因子の同定を目的として以下の2項目について実験を行った。

(1) NFBD1/MDC1とPLK1との機能的相互作用の分子機構の解明

(2) NFBD1/MDC1の機能抑制を応用した新規がん治療における生物学的因子の同定

3. 研究の方法

(1) NFBD1/MDC1とPLK1との機能的相互作用の分子機構の解明

我々は前段階実験において、NFBD1/MDC1の機能抑制は細胞周期のG2/M期の主要な制御因子であるPLK1(Polo-like kinase 1)の発現を亢進させること、さらにNFBD1/MDC1のもつPST domainがPLK1のリン酸化基質となる可能性を見出したことから、まずHeLa細胞の細胞周期同調系を用いて、G2/M期における両者の細胞内局在を免疫蛍光染色にて検討した。また、NFBD1/MDC1のノックダウン細胞とコントロール細胞をタイムラプス撮影で経時的に観察することによってG2/M期進行に及ぼす影響を検討した。さらに、近年の報告において、DNA複製後に生じる娘二重鎖の絡まりが解消されるまでG2/M期進行を制御するdecatenation checkpoint に NFBD1/MDC1 と TOPO (Topoisomerase)との物理的結合が必要であることが報告されたことから(Luo et al. Nat Cell Biol, 2009)、PLK1によるNFBD1/MDC1リン酸化の機能的意義とTOPOの制御するdecatenation checkpointとの関連の有無を検討した。

(2) NFBD1/MDC1の機能抑制を応用した新規がん治療の生物学的因子の同定

近年我々は、CHK1阻害剤と放射線処理に誘導されるATM-PIDDosomeを介した新規のアポトーシス経路を報告した。(Ando et al. Mol Cell, 2012) また、これまでにPLK1の発現亢進は、CHK1の機能を阻害することが報告されていることから、(Bruinsma et al. Trends Biochem Sci, 2012) NFBD1/MDC1の機能抑制に誘導されるPLK1の発現亢進とCHK1阻害剤に誘導されるATM-PIDDosome経路との関連が推察される。我々はこの仮説に基づいて、前段階実験において得られたCHK1阻害剤に高感受性の神経芽腫細胞株SMS-SAN細胞と低感受性の神経芽腫細胞株NB39nu細胞を用い

て、CHK1 阻害剤処理に誘導される遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイによる網羅的解析によって検討し、NFBD1/MDC1 の機能抑制による治療感受性を決定する生物学的因子の候補を探索した。

4. 研究成果

(1) NFBD1/MDC1とPLK1との機能的相互作用の分子機構の解明

免疫蛍光染色によってNFBD1/MDC1とPLK1の内蔵タンパク質を共染色した結果、G2/M移行期に共局在することが判明した。タイムラプス撮影による細胞周期解析の結果では、NFBD1/MDC1のノックダウン細胞において、有意に分裂期の早期開始が観察された。

内在性のNFBD1/MDC1のリン酸化を阻害する目的に、PLK1のリン酸化標的配列をもつNFBD1/MDC1のPSTドメインの一部をコードする発現プラスミドをpseudo substrateとしてHeLa細胞に導入したところ、G2/M期移行が遅延した。一方では、PLK1の活性化型変異体(T210D)を細胞に導入したところNFBD1/MDC1とTOPO IIαとの結合が阻害され、さらに細胞の分裂期のマーカーであるリン酸化histone H3の増加が観察されたため、G2/M期移行が亢進することが示唆された。

これらの結果より、PLK1によるNFBD1/MDC1のリン酸化の機能的意義は、decatenation checkpointを解除して分裂期移行を促進する役割と考えられた(図1)。したがって、NFBD1/MDC1の機能抑制によるdecatenation checkpointの解除と未成熟な分裂期開始が、放射線や抗がん剤感受性の増強効果を引き起こす分子機構のひとつと考えられた。

Schematic representation of functional relationship between NFBD1, PLK1 and TOPO IIα

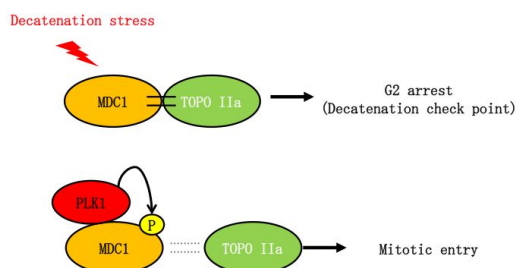


図 1

(2) NFBD1/MDC1 の機能抑制を応用した新規がん治療の生物学的因子の同定

cDNA マイクロアレイ解析の結果、CHK1 阻害剤処理の有無においてPIDDosomeの構成分子の遺伝子発現には有意な変化は見られなかった。しかしながら興味深いことに、これまでにNFBD1/MDC1がDNA損傷応答時に直接結合によってアポトーシスを阻害することが知られているTP53(Nakanishi et al. J Biol Chem, 2007)の下流遺伝子の活性化がCHK1阻害剤によって有意に誘導されることが判明した。とくにCHK1阻害剤に高感受性のSMS-SAN細胞においては、TP53の転写活性化標的であるBAXやPUMAのアポトーシス関連遺伝子の発現が誘導されており、一方では低感受性NB39nu細胞においては細胞周期G1期停止を引き起こすCDKN1AとTP53のタンパク質分解に直接関わるMDM2の発現誘導が有意に亢進していた。さらに両者の細胞を用いた免疫蛍光染色の結果においても活性化型p53の指標であるSer15のリン酸化が強く検出された。以上の結果から、NFBD1の機能抑制による抗がん剤感受性の亢進に関わる生物学的因子としては、p53変異をふくむp53の転写活性化能やp53下流遺伝子の発現との関連が強く示唆された。

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 1件)

Ando K, Ozaki T, Hirota T, Nakagawara A:
NFBD1/MDC1 Is Phosphorylated by PLK1 and
Controls G2/M Transition through the
Regulation of a TOP2II -Mediated
Decatenation Checkpoint. *PLoS One*
2013,8(査 読 有) DOI:
10.1371/journal.pone.0082744.

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 安藤清宏、尾崎俊文、広田亨、中川原章:
NFBD1/MDC1はPlk1によるリン酸化を介して
Decatenation Checkpointに関連したG2/M期
進行を制御する.第72回日本癌学会学術総会,
横浜,2013年10月.

(2) 安藤清宏、佐藤勉、小林修三: CHK1阻害
剤はMYCN増幅神経芽腫のp53非依存的アポト
ーシスを誘導する.第37回日本分子生物学会
年会,横浜,2014年11月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤清宏 (ANDO KIYOHIRO)
千葉県がんセンター (研究所) ・ がん治療
開発グループ ・ 客員研究員
研究者番号 : 10455389