

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：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860195

研究課題名(和文) DNA損傷応答における細胞運命振り分け機構の解明

研究課題名(英文) Molecular characterization of cell fate determination in the DNA damage response

研究代表者

城村 由和 (JOHMURA, Yoshikazu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40616322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA損傷応答における細胞運命決定の分子機構の解明を試みた。まず、DNA修復経路を抑制したところ、Chk1を介したG2期チェックポイントの活性化の持続が延長するとともに、細胞老化誘導が促進された。次に、遺伝子操作によりG2期チェックポイント活性化の持続時間を調節した結果、細胞老化の誘導は持続時間の長さに依存して促進されることを見出した。さらに、早老症患者由来の細胞では、G2期チェックポイントの活性化の持続延長とともに、細胞老化誘導の促進が認められた。

この成果により、Chk1を介したG2期チェックポイントの活性化の持続時間が細胞老化への運命決定を制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：DNA damage response is known to induce senescence as well as transient cell cycle arrest and apoptosis, but molecular mechanisms of how cells determine whether or not to undergo senescence are largely unknown. This study shows that suppression of DNA repair pathways extends the duration of Chk1-dependent G2 checkpoint activation and sensitizes cells to senescence through enhancement of mitosis skipping. Extension of G2 checkpoint activation by introduction of the TopBP1 activation domain sensitizes cells to senescence. Importantly, fibroblasts from progeroid syndromes tested shows a strong correlation between a drastic extension of G2 checkpoint activation and an increase in the susceptibility to senescence, suggesting that extension of G2 checkpoint activation caused by defective DNA repair is critical for senescence predisposition in progeroid syndrome patients. These results indicate that the duration of Chk1-dependent G2 checkpoint directs cells to senescence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：老化 がん DNA損傷 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

紫外線や放射線などの外界からの刺激、がん遺伝子の活性化や加齢による酸化ストレスの内因性のシグナルなどによりゲノム DNA が損傷を受けると、ヒトを含む真核生物はその恒常性を維持するために DNA 損傷応答を活性化することはよく知られている。DNA 損傷応答は、ゲノム DNA のダメージが軽度の場合には一時的に細胞周期を停止し損傷部位の修復を行った後に、再び細胞周期を開始する。一方、ゲノム DNA のダメージが容易に修復できないほど重度の場合には不可逆な細胞周期の停止である細胞老化を誘導すると考えられている。DNA 損傷応答は発がん防御や個体老化などの生体にとって極めて重要なイベントに深く関与しており、その分子基盤を解明することは医学的にも必要不可欠である。しかし、DNA 損傷応答における細胞運命決定のメカニズムについてはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

これまでに申請者は細胞老化誘導の分子メカニズムを明らかにするために、細胞周期の動的な変化を解析可能な Fucci システムをヒト正常線維芽細胞に導入して、ライブセルイメージングを行った。その結果、様々な老化誘導刺激によって誘導された細胞老化初期過程において、ヒト正常線維芽細胞は一時的な G2 期における細胞周期停止の後、通常行われるべき細胞分裂を行うことなく G1 期に進行する、いわゆる分裂回避を生じて、四倍体細胞となり、不可逆的な細胞周期の停止を引き起こすことを見出した。さらに申請者は分裂回避の制御機構や細胞老化における役割について解析を行った結果、細胞老化誘導には細胞周期 G2 期におけるがん抑制遺伝子 p53 の活性化による分裂回避が必要かつ十分であることを見出した。

申請者は、この得られた新しい知見を基に、

DNA 損傷応答における細胞運命の振り分け機構には、G2 期チェックポイントの活性化と p53 の活性化のタイミングが重要な鍵となると考えた。本研究では、G2 期チェックポイントの要である ATR-Chk1 経路の活性化と p53 の活性化による情報伝達ネットワークについて解析し、今まで不明であった DNA 損傷応答における細胞運命決定の分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1)Fucci システムを導入した正常ヒト線維芽細胞を用いて、ライブセルイメージングを行い、低線量および高線量の放射線照射時の細胞周期の動的変化を解析した。また、古典的な細胞周期解析のツールである FACS による解析も併せて行った。次に、DNA 損傷応答における G2/M 期チェックポイント活性化と p53 の転写活性化のタイミングを定量的に解析するために、低線量および高線量の放射線照射した細胞から継時的に細胞抽出液を調製して、ATR-Chk1 経路の活性化のもっとも重要な指標である Chk1 のリン酸化状態の変化、および p53 の活性化の指標となる p21 を含めた p53 標的遺伝子の発現変化を解析した。この時、細胞老化のマーカーである p16 などの発現変化も同時に解析した。

(2)G2 期チェックポイントの活性化は DNA 損傷修復と密接に関わっている。そこでまず、DNA 損傷修復に関わる酵素の阻害が細胞老化に与える影響について解析した。DNA 損傷修復には大きく分けて、非相同末端結合と相同組換えの二つに分類される。レンチウイルスベクターを用いた RNAi 法により、相同末端結合に必須なリン酸化酵素である DNA-PK 発現抑制細胞、相同組換えに必須な酵素である CtIP 発現抑制細胞、および両因子のダブル発現抑制細胞を樹立した。これらの細胞に低線量の放射線を照射した時の G2 期チェックポ

イント活性化と p53 の転写活性化のタイミングの変化、および細胞老化に与える影響を解析した。

(3)直接的な G2 期チェックポイント活性化の促進が細胞老化誘導に与える影響を解析するために、DNA 損傷を生じることなく ATR-Chk1 経路を活性化できる TopBP1-AAD (ATR 活性化ドメイン)を薬剤依存的に発現誘導できるレンチウイルスプラスミドを構築し、薬剤誘導性 TopBP1AAD 発現細胞を樹立した。これらの細胞に低線量の放射線を照射した時の G2 期チェックポイント活性化と p53 の転写活性化のタイミングの変化、および細胞老化に与える影響を解析した。

(4)G2 期チェックポイント活性化の持続の短縮が細胞老化誘導における役割を解析するために、DNA 損傷修復の効率を向上させることができる SIRT6 過剰発現細胞および OTUB2 抑制細胞を樹立し、中線量の放射線を照射した時の G2 期チェックポイント活性化と p53 の転写活性化のタイミングの変化、および細胞老化に与える影響を解析した。

(5)早老症の原因遺伝子の多くは、DNA 損傷修復に関わる遺伝子である。そこで、種々の早老症患者由来の繊維芽細胞を用いて、様々な線量の放射線や紫外線照射に対する老化細胞の割合について解析した。また、Chk1 のリン酸化状態の変化継時的な変化の詳細を解析することによって、G2 期チェックポイントの活性化の持続時間について解析した。

4 . 研究成果

(1)Fucci システムを用いたライブセルイメージングの結果、高線量の放射線照射によって、老化細胞の増加とともに分裂期回避を引き起こす細胞の割合が顕著に増加した。また、FACS の解析により、四倍体細胞の割合が増加

していることも確認できた。さらに、低線量と高線量のどちらの条件でも、p53 の標的遺伝子 p21 の発現上昇は照射後 8 時間後に認められた。一方、リン酸化 Chk1 の発現は低線量下では照射後 4 時間後まで持続する一方、高線量下では照射後 24 時間後まで持続することが分かった。これらの結果は、細胞老化誘導、分裂回避の割合、および、G2 期チェックポイントの活性化の持続時間には正の相関性があることを示している。

(2)DNA-PK 発現抑制細胞では、低線量の放射線照射において、リン酸化 Chk1 の発現は照射後 12 時間後まで持続することが分かった。さらに、DNA-PK・CtIP ダブル発現抑制細胞では、照射後 24 時間後まで持続することも分かった。このとき、コントロール細胞と比較して、分裂期回避および細胞老化の誘導の割合が増加することも確認できた。これらの結果は、DNA 修復経路の阻害によって、G2/M 期チェックポイントの活性化の持続がおり、細胞分裂期を起こす細胞の割合が増加することによって、細胞老化誘導が促進されることを示唆している。

(3)樹立した薬剤誘導性 TopBP1AAD 発現細胞に低線量の放射線を照射した後に、一過的に TopBP1AAD を発現させた結果、DNA 損傷の割合には大きな変化はないにも関わらず、リン酸化 Chk1 の発現は照射後 24 時間後まで持続することが分かった。このとき、コントロール細胞と比較して、分裂期回避および細胞老化の誘導の割合が増加することも確認できた。これらの結果は、G2 期チェックポイントの活性化の持続の延長が、細胞老化の誘導を促進できることを示している。

(4)中線量の放射線を照射した結果、コントロール細胞では、リン酸化 Chk1 の発現は照射後 12 時間後まで持続することが分かった。

一方、SIRT6 過剰発現細胞および OTUB2 抑制細胞では、照射後 8 時間後には消失することが分かった。このとき、コントロール細胞と比較して、分裂期回避および細胞老化の誘導の割合が減少することも分かった。これらの結果は、G2/M 期チェックポイントの活性化の短縮により、細胞分裂期を起こす細胞の割合が減少することによって、細胞老化誘導が抑制されることを示唆している。

(5)ハッチンソン・ギルフォード症候群やウエルナー症候群患者由来の細胞では、正常の細胞と比較して、放射線・紫外線照射ともに、G2 期チェックポイントの活性化の持続の延長と共に、分裂期回避・細胞老化の割合が増加することが分かった。また、ロスモンド・トンプソン症候群患者由来の細胞では放射線照射のみ、毛細血管拡張性運動失調症やコケイン症候群由来の細胞では紫外線照射においてのみ、G2 期チェックポイントの活性化の持続の延長と共に、分裂期回避・細胞老化の割合が増加することが分かった。一方、強い早老症の症状を示さないブルーム症候群や色素性乾皮症患者由来の細胞では、コントロール細胞と大きな差は認められなかった。これらの結果は、早老症発症のメカニズムの一部は、G2 期チェックポイントの活性化の持続の延長による細胞老化誘導の促進であることを示唆している。

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 6 件)

Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, and Nakanishi M. Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. Nature

communications, (2016). in press
査読有

Johmura Y, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto Y, Okabe A, Aburatani H, Li S, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, and Nakanishi M. SCF^{fbxo22}-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence. Nature communications(2016).DOI:10.1038/ncomms10574 査読有

Haruta M, Shimada M, Nishiyama A, Johmura Y, Tellec BL, Debatisse M, Nakanishi M. Loss of maintenance DNA methylation results in abnormal DNA origin firing during DNA replication. Biochem. Biophys. Res. Commun., 469, 960-966(2016).DOI:10.1016/j.bbrc.2015.12.090. 査読有

Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S, and Nakanishi M. Necessary and Sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. Molecular Cell, 55, 73-84 (2014). DOI:10.1016/j.molcel.2014.05.003. 査読有

Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura J, Haruta M, Tahara H, Takeyama H, and Nakanishi M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance

of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. Cancer Research, 74, 3880-3889 (2014). DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-3604

査読有

Goshima T, Shimada M, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, and Nakanishi M. Mammal-specific H2A variant, H2ABbd, is involved in apoptotic induction via activation of NF- κ B signaling pathway. J. Biol. Chem, 289, 11656-11666(2014).DOI:10.1074/jbc.M113.541664. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Johmura Y, Sun J, and Nakanishi M. SCF^{fbxo22}-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence. Kick-off Symposium in Nagoya City University 2016 (国際学会): 名古屋市立大学(愛知県名古屋市) 2016/02/29-03/01

城村由和、細胞老化誘導機構と発がん・個体老化における役割、東京大学医科学研究所共同研究拠点 平成27年度若手研究者シンポジウム、若手研究者が拓く医学研究の道(招待講演):東京大学医科学研究所(東京都港区) 2015/12/15

Johmura Y, and Nakanishi M. Molecular characterization of cell fate determination in the DNA damage response. The 9th 3R meeting (国際学会): 時之栖(静岡県御殿場) 2014/11/15-21

〔図書〕(計1件)

Johmura Y and Nakanishi M. Molecular insights into the regulation of apoptosis and cellular senescence, and the implications in cancer. DNA replication, Recombination and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology 555 (449-465)(2016)

〔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

<https://nrd.nagoya-cu.ac.jp/profile/ja.J9s.RIPSSPej-j.zwJn0Kg==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城村 由和 (JOHMURA, Yoshikazu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 40616322