

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04902

研究課題名(和文) DNA修復と細胞周期進行制御との連携経路による放射線感受性の制御

研究課題名(英文) Regulation of radiation sensitivity by a pathway linking DNA repair with cell-cycle control

研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA, Kiyoshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：40200133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復と細胞周期制御を連携することによって放射線感受性を制御する機構を解明するために、相同組換えとp53を介してG1/Sチェックポイントに関与することが知られているRad54BのG0/G1期進行における役割を検討した。その結果、Rad54BはE2F1やc-Junとともに自律的な制御ループを形成することによってcyclin D1の発現を促進し、休止期からの出口の時間を規定することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To understand mechanisms that affect radiation sensitivity by linking DNA repair with cell-cycle control, we investigated a role of Rad54B, the protein involved in homologous recombination and p53-mediated G1/S checkpoints, in G0/G1 progression. Our studies revealed that Rad54B promotes expression of cyclin D1 by forming an autonomous regulatory loop with E2F1 and c-Jun and defines timing of the exit from quiescence.

研究分野：医学

キーワード：放射線治療生物学 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

放射線感受性を制御する機構の理解は、放射線治療の増感や被ばくによる健康影響の抑制に資するために、放射線生物学の主要な課題として研究が精力的に行われ、血管拡張性失調症原因遺伝子 ATM や代表的ながん抑制遺伝子 p53 の DNA 損傷応答における位置づけが確立した。しかし、これらの分子に対する機能阻害は、放射線治療の増感に単純に結びついていないのが現状である。その理由としては、ATM 自体は放射線抵抗性に大きく貢献するが、正常とがんにおける機能の差がそれほど大きくないこと、逆に、p53 は正常とがんにおける機能の差があっても、単に放射線感受性を制御しているだけではないことなどがある。すなわち、過去 20 年間で確立された DNA 損傷応答のセントラルドグマである「ATM-p53-細胞周期停止あるいは細胞死」の経路を、放射線感受性制御の直接的な標的とするには、理論的根拠が不足していると言わざるを得ない。

このような背景において、ATM と p53 の周辺に存在する分子の同定と、これらの分子の機能の解析が国内外において精力的に進められて、この経路の周辺に位置する関連の機構が発見された。その中でもがん治療の標的として最も有望視されているものに、p53 をユビキチン化して分解を促進する MDM2 とその結合パートナーである MDMX がある。これらの分子はがんで発現レベルが増加していることがあり、その場合に p53 が野生型であると、p53 のレベルが低下することによって、放射線照射時における細胞周期停止や細胞死が誘導できない。そのために、MDM2-MDMX を標的とする阻害剤は、野生型 p53 の機能を回復することが期待され、その放射線増感作用も実験レベルで証明されている。

これらの研究動向とは別に、本研究者は DNA 修復に関わる分子として Rad54B を単離し、その機能解析を進めてきた。その結果、この分子は、放射線照射後に p53 発現誘導に先行して発現が誘導され、p53 のレベルが上昇するとともに抑制されること、MDM2 と MDMX の両方の分子に直接結合して p53 の分解を促進すること、DNA 損傷時の G1 期あるいは G2 期の細胞周期停止機構であるチェックポイントを負に制御すること、多くのがんで発現レベルが上昇し予後不良のマーカーとなることなどが明らかとなった。これらの結果により、DNA 修復機能を有する分子であっても、がんにおいて発現レベルが上昇した場合には、DNA 修復とは別に、DNA 損傷応答機構に関係している分子に直接結合して、細胞周期停止によって細胞機能の恒常性維持に貢献するチェックポイントを抑制するという新しい放射線生物学の概念が提唱された。

このような Rad54B の研究により明らかにされた新しい DNA 損傷応答の概念は、細胞周期制御、DNA 修復、細胞死の各現象を有機的に結びつけるネットワークが存在すること

を示唆するものである。それゆえに、この機構をより詳細に解析することによって、これらの現象に限らず細胞核外の細胞機能も含めた細胞恒常性を維持するための機構の包括的な理解が、放射線抵抗性を克服するための基本原理の確立に大きく貢献するものであるとの着想に至った。

2. 研究の目的

放射線感受性を制御する機構を正確に理解することは、放射線治療の増感法の開発にとって本質的なことであり、細胞死や DNA 修復の研究成果はこの理解に大きく貢献してきた。しかし、これらの細胞現象を個別に理解するだけでは、がん治療における放射線抵抗性を生物学的に克服することは極めて困難である。その理由として、細胞は恒常性を維持するために細胞機能を統合するネットワークを有し、被ばく後、細胞周期の停止、DNA 修復、細胞分裂、細胞死などの機能を時間空間的に制御し、細胞の運命決定を行っていることが想定される。そこで、これらの細胞機能から構成されるネットワーク制御機構と放射線を代表とする DNA 損傷に対する細胞の感受性との関連を明らかにすることによって、放射線治療の発展に資することを目的とする。

この目的を達成するために、放射線感受性がダイナミックに変化する G1 期において、特に解析が遅れている早期 G1 期と G0 期における細胞周期進行の制御と放射線感受性の関係を明らかにする。これらの細胞周期は放射線抵抗性を特徴するがん幹細胞とも関係が深いことが想定され、それらの周期の拡大は放射線治療抵抗性の大きな原因となることが想定されている。Rad54B が G0/G1 期の進行に関与することが予備実験において示唆されていることから、この時期の細胞周期進行と放射線抵抗性との関係に Rad54B が関与している可能性があり、この点を明らかにするために、G0/G1 期進行の新しい分子機構を同定することを具体的な目標とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期進行の解析

放射線感受性と細胞周期との関係において、最も研究情報が不足しているのは G0/G1 期であるために、ヒト網膜由来正常上皮細胞において Rad54B をノックダウンした後に、細胞周期を G0 期に同調し、その後の細胞周期の進行状況を解析する。

(2) G0/G1 期進行における標的分子の同定

G0/G1 期の進行の指標として cyclin D の発現変化、Rb リン酸化などを、同調した細胞の細胞周期進行過程において調べる。これらの経路で Rad54B の影響がみられる場合には、その上流に存在する分子を転写制御とタンパク質安定化の観点から制御候補分子の変動を定量 PCR やウェスタンブロッティングな

どの方法によって解析する。

(3) G0/G1 期の進行制御の上流に存在する機構の同定

G0/G1 期進行を制御する上流の分子が同定された場合には、それらの分子の発現する機構を理解するために、プロモーター領域に結合する転写因子をクロマチン免疫沈降によって同定する。

4. 研究成果

(1) Rad54B の G0/G1 期進行に対する影響

細胞分裂終了後に正常上皮細胞を同期させて、その後の細胞周期の進行を解析したところ、Rad54B のノックダウン細胞では S 期に入るまでの時間がコントロールと比べかなり延長した。この延長がどの時期に相当するものであるかを、Rb リン酸化を指標に解析したところ、G0 期の延長が原因であることが判明した。

(2) G0/G1 期における Rad54B の標的分子

G0/G1 期進行における中心的な役割を果たす cyclin D1 の発現レベルは Rad54B のノックダウンによって、タンパク質と RNA の両方のレベルで低下していた。そのため、Rad54B は cyclin D1 の転写に影響を及ぼすことが想定されたために、その一つの候補として c-Jun の発現を解析したところ、Rad54B のノックダウンによってタンパク質レベルでの低下が認められた。

(3) Rad54B-cyclin D1 経路の制御機構

G0 期から G1 期の進行において、Rad54B と cyclin D1 の発現はともに徐々に増加する。そのために、同じ制御機構が関与していると考え、その上流の候補分子として E2F を想定した。

Rad54B のプロモーター領域には E2F1 の結合する可能性のある配列が確認されたために、クロマチン免疫沈降を行ったところ、この部位に E2F1 が結合することが確認された。また、転写に抑制的にはたらく E2F4 の結合領域が転写開始点の近傍に存在しているために、同様の方法にてその結合を確認した。

G0 期から G1 期の進行過程においては、E2F1 の作用が増強する一方で、E2F4 は減弱していくことが認められた。

(4) 考察

以上の結果は、Rad54B がタンパク質分解経路に対して抑制的に作用することによって、転写因子である c-Jun タンパク質の発現レベルを増加させ、その結果として G0/G1 期進行の中心的な分子である cyclin D1 を誘導することを示唆している。その意義としては、放射線などによる DNA 損傷に応答する分子である Rad54B が、このようなタンパク質分解経路を負に制御することによって細胞周期進行を正に制御することから、DNA 損傷応答と

細胞周期制御が密接に関連している一つの証拠を示していることがあげられる。

さらには、このような Rad54B-cyclin D1 経路が転写因子である E2F1 によって制御されていることが明らかになったことは、新しい情報伝達経路の自律性を示唆することになる。その理由としては、E2F1 自体は cyclin D/CDK4/CDK6 のリン酸化によって下流において活性化される分子であることから、今回の研究によって明らかにされた E2F が Rad54B を介して cyclin D1 の発現を誘導することは、これらが正のフィードバック機構を形成することを示しているからである。

次に課題となることは、このような G0/G1 期の進行を促進する自律的なループ機構と DNA 損傷応答との関係である。今回存在が明らかにされた cyclin D1 を中心とする上流の情報伝達経路は、あくまでも正常細胞が M 期終了後に同調された後の過程のみを反映するものであり、放射線による DNA 損傷が誘導された場合に、この経路がどのような影響を受けるのかは明らかにされていない。しかし、本研究者の先行研究において、DNA 損傷が誘導された場合には、細胞周期の進行を停止させる p53 の発現を Rad54B が負に制御していることが明らかにされているために、このような知見と今回の成果との関連性を考慮する必要がある。すなわち、Rad54B は cyclin D1 の誘導によって G0/G1 期の進行を促進する一方で、DNA 損傷が存在する場合には、その発現が低下されることによって p53 が誘導される状況をもたらすという異なる機能をどのような制御機構によって説明するかが課題となることである。

以上に述べた細胞周期の進行と DNA 損傷応答による細胞周期の停止は、どちらかの状況が極端に優勢の場合は、これまでに確立された分子機構によって説明がなされることは明らかである。その一方で、生体内での恒常性維持の観点からは、これらの状況は一律的にどちらかに区分されるものではなく、細胞レベルでは混在しているものと考えられる。特に、低線量の放射線にばく露されている細胞では、細胞周期が完全停止するわけではなく、DNA 損傷を受けながらも細胞周期は回転する状況にあることも考えられる。このような状況において、細胞レベルで将来的な運命を決定する機構として、G0/G1 期で何が重要であるのかを理解するために、Rad54B の二元的な作用は大きなヒントを与えてくれるものと考えられる。

これまでの放射線の細胞生物学では、機序を解明するために、個々の細胞レベルではあまり差がでないような高線量を与えることによって研究が行われてきた。その一方で、組織環境における細胞の置かれる多様な状況においては、同じ放射線線量によっても反応は異なるものと考えられる。このような課題に取り組むことは放射線治療の増感において本質的なものであるとともに、その副作

用の克服においても重要なものである。これまでの一連の Rad54B の研究によって明らかにされた、細胞周期進行と DNA 損傷応答によるその停止を決定するための機構の連携は、これらのより上位に存在する機序を示唆するものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hiro Sato, Atsuko Niimi, Takaaki Yasuhara, Tiara Bunga Mayang Permata, Yoshihiko Hagiwara, Mayu Isono, Endang Nuryadi, Ryota Sekine, Takahiro Oike, Sangeeta Kakoti, Yuta Yoshimoto, Kathryn D. Held, Yoshiyuki Suzuki, Koji Kono, Kiyoshi Miyagawa, Takashi Nakano, Atsushi Shibata: DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nature Communications*, 8, 1751, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/s41467-017-01883-9

Atsushi Enomoto, Junko Yamada, Akinori Morita, Kiyoshi Miyagawa: Bisdemethoxycurcumin enhances X-ray-induced apoptosis possibly through p53/Bcl-2 pathway. *Mutation Research* 815, 1-5, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.12.005

Takuma Hashimoto, Daiki D. Horikawa, Yuki Saito, Hirokazu Kuwahara, Hiroko Kozuka-Hata, Tadasu Shin-I, Yohei Minakuchi, Kazuko Ohishi, Ayuko Motoyama, Tomoyuki Aizu, Atsushi Enomoto, Koyuki Kondo, Sae Tanaka, Yuichiro Hara, Shigeyuki Koshikawa, Hiroshi Sagara, Toru Miura, Shin-ichi Yokobori, Kiyoshi Miyagawa, Yutaka Suzuki, Takeo Kubo, Masaaki Oyama, Yuji Kohara, Asao Fujiyama, Kazuharu Arakawa, Toshiaki Katayama, Atsuhito Toyoda, Takekazu Kunieda: Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications*, 7, 12808, 2016. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms12808

Yuzo Nagai, Yoko Yamamoto, Takaaki Yasuhara, Keisuke Hata, Takeshi Nishikawa, Toshiaki Tanaka, Junichiro Tanaka, Tomomichi Kiyomatsu, Kazushige Kawai, Hiroaki Nozawa, Shinsuke Kazama, Hironori Yamaguchi,

Soichiro Ishihara, Eiji Sunami, Takeharu Yamanaka, Kiyoshi Miyagawa, Toshiaki Watanabe: High RAD54B expression: an independent predictor of postoperative distant recurrence in colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 6, 21064-21073, 2015. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.4222

〔学会発表〕(計 6 件)

Kiyoshi Miyagawa, Takaaki Yasuhara: Regulation of checkpoint strength in the DNA damage response. 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, 2017.

Kiyoshi Miyagawa: Oncogenic and anti-oncogenic properties of RAD54B in the DNA damage response. 1st International Symposium on Radiation Therapeutics & Biology, 2017.

Takaaki Yasuhara, Kiyoshi Miyagawa: The Rad54B-p53 axis limits the strength of DNA damage checkpoint. 日本放射線影響学会第 59 回大会、2016.

Takaaki Yasuhara, Kiyoshi Miyagawa: The Rad54B-p53 axis limits the strength of DNA damage checkpoint. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016.

Takaaki Yasuhara, Takahiko Suzuki, Mari Katsura, Kiyoshi Miyagawa: The novel mechanism linking cell cycle regulation to cancer development. Gordon Research Seminar & Conference-Cell Growth & Proliferation, 2015.

Takaaki Yasuhara, Takahiko Suzuki, Mari Katsura, Kiyoshi Miyagawa: Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA, Kiyoshi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40200133