

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06146

研究課題名(和文)がんを制御する細胞機能ネットワークの中心的分子Rad54Bを調節する機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism for cancer-related upregulation of the Rad54B-mediated cellular function network

研究代表者

安原 崇哲 (YASUHARA, Takaaki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90757056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究でRad54Bは様々なタンパク質と相互作用することで、細胞内の種々の機能を発揮する分子機構の間の相互調整を行うネットワークを形成し、がんの制御を行っていることが明らかとなっている。多くのがん組織においてRad54Bの量が増加しており、がんの悪化と関係していた。当研究では、Rad54Bの量がどのように制御されているかを明らかにするために実験を行った。その結果、Rad54Bの量は、細胞が分裂中において高くなり、分裂停止期において低くなることが判明した。従って、Rad54Bを中心とした相互調整ネットワークは、細胞の分裂と同期しながらその機能が制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that Rad54B, by interacting with various proteins, forms a network that links among the cellular functions. In clinical cancer samples, constitutive upregulation of Rad54B is frequently observed and associated with poor prognosis, suggesting that the Rad54B-mediated cellular function network is involved in the neoplastic process. In this study, we aimed to reveal how Rad54B expression is controlled, and found that the Rad54B expression is regulated in a cell cycle-dependent manner. Mechanistically, the E2F family, a set of transcription factors for cell cycle-regulated genes, binds to the Rad54B promoter region to upregulate the Rad54B expression in S/G2 phase and to downregulate that in G0/G1 phase. Taken together with our previous findings that Rad54B regulates the cell cycle machinery, these data suggest the existence of a mutual regulatory mechanism between the Rad54B-mediated cellular function network and cell cycle machinery.

研究分野：がん細胞生物学

キーワード：がん 細胞機能ネットワーク Rad54B 細胞周期 E2Fファミリー

1. 研究開始当初の背景

発がんや放射線、薬剤などのがん治療に対する抵抗性の機序を考える上で修復機構の理解は必須であり、その中でも DNA 損傷を正確に修復しうる相同組換え修復は特に重要である。その相同組換え修復に係る分子の中でも特に我々は Rad54B という分子に注目して研究を進めてきた。当初、Rad54B は相同組換え修復に関わる分子として同定されたが(文献 1)、これまでの研究によって、Rad54B が複数のシステムの分子と連携しながら適切に細胞機能間の調整を行い、恒常性を維持するためのネットワークを形成するという、非常にユニークな役割を果たしていることが明らかになってきた。さらに、種々の腫瘍組織において Rad54B の発現量が上昇していること、Rad54B の発現量の増加は生存率の低下と強く関係することなどから、Rad54B を介した細胞機能ネットワークが、がんの制御に関与することが強く示唆された。

それらの一つの機序として、最近我々は Rad54B と MDM2-MDMX ヘテロ二量体の相互作用を同定した(文献 2)。MDM2-MDMX ヘテロ二量体は、DNA 損傷応答を担う p53 の制御因子であり、Rad54B は MDM2-MDMX ヘテロ二量体との相互作用を介して p53 のレベルおよび機能を抑制することが判明した。一方で、DNA 損傷後の Rad54B の発現レベルは非常に動的な制御を受けていることが明らかとなり、DNA 損傷応答の初期において発現が誘導され、その後期においては p53 依存的に抑制されていた。ATM リン酸キナーゼは DNA 損傷後に p53 を安定化して、p53 を活性化することが知られているが、Rad54B による p53 の抑制、および DNA 損傷応答初期における Rad54B の誘導、その後期における p53 による Rad54B の抑制のいずれについても ATM の活性に独立して起こったことから、Rad54B は、ATM 非依存的に p53 を抑制する新たな DNA 損傷応答経路を構成していることが明らかとなった。

さらに、この Rad54B による p53 の抑制経路によって、DNA 損傷 G1/S チェックポイントおよび G2/M チェックポイントの両方が抑制され、DNA 損傷後の細胞周期の進行を促進することが明らかとなった。特に、Rad54B によって G2/M チェックポイントが無効化された場合には、DNA 損傷が修復されないままに、分裂期(M期)へと進行しており、ゲノム不安定性の 1 つの指標である、染色体の断片化が誘導された。また、Rad54B の発現を増加させた正常細胞を解析したところ、DNA 損傷後の p53 タンパク質の量が減少し、DNA 損傷 G1/S チェックポイントが無効化された。興味深いことに、Rad54B によるチェックポイントの無効化は、長期的に見ると、DNA 損傷後の細胞生存を促進していることが判明した。このことは細胞レベルの実験の

みならず、ヌードマウスにヒトがん細胞株を移植したゼノグラフトモデルにおいても確かめられたことから、Rad54B は DNA 損傷薬剤の治療効果を低下させることが明らかとなった。従って、DNA 損傷下での細胞周期進行の促進は、正常細胞が腫瘍化する際の第一歩となることが想定され、Rad54B は新しいがん治療の標的となることが示唆された。このように Rad54B を介した細胞機能ネットワークは、がんの発生や、悪性化、既存のがん治療に対する抵抗性を導く基盤的な機序に関与しており、臨床的な Rad54B 発現量の増加を裏付ける結果を得た。しかしながら、Rad54B の発現量がどのように制御されているかについては、その詳しい機序は不明であった。

引用文献：

1. Hiramoto, H. et al. (1999) Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene*, 18, 3422-3426.
2. Yasuhara, T. et al. (2014) Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. *Nature Communications*, 5, 5426.

2. 研究の目的

当研究では、Rad54B 発現調節ゲノム領域の同定、その領域をターゲットとする Rad54B 発現調節機構の同定と解析を目的とした。これら 2 つの目的を達成することで、Rad54B のがん制御に果たす役割が明確になり、Rad54B を標的とした薬剤開発に近づくことが期待された。

3. 研究の方法

平成 27 年度

まず、Rad54B の発現調節を担うプロモーター領域の同定を目標とした。そのために、まず Rad54B のプロモーター領域と考えられるゲノム領域のクローニングを行うこととした。その後、プロモーターアッセイを行うことで、それらの転写活性の強さを評価し、プロモーター領域の同定と、プロモーター活性調節因子の結合領域の同定を行った。

平成 28 年度

前年度に同定されたプロモーター領域を調節する因子を同定することを目標とした。そのために、転写因子のゲノム上の結合部位に関するデータベースを活用し、同定されたプロモーター領域の核酸配列に結合しうる転写因子の候補をスクリーニングした。その後、候補転写因子のそれぞれについて、クロマチン免疫沈降法(ChIP法)およびノックダウン実験によって確認し、確認がとれた転写因子に関して、その転写因子による Rad54B の制御機構を、細胞周期、DNA 損傷応答の両面から明らかにした。

4. 研究成果

まず、Rad54B 発現調節ゲノム領域の同定を目的として実験を行った。Rad54B 遺伝子の転写開始点の上流 3kbp のゲノム領域のクローニングを行い、それらのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイによって比較検討した。その結果、転写開始点の上流 3kbp、1.2kbp、0.5kbp のいずれの領域も同程度のプロモーター活性を有していることが判明した。従って、Rad54B 発現量の調節に関与する領域は、Rad54B 遺伝子の転写開始点の上流 500bp 以内にあることが示唆された。

次に、Rad54B 遺伝子転写開始点の上流 500bp の領域にターゲットを絞り、Rad54B 発現調節機構の同定を試みた。そのために、Rad54B の発現調節領域に結合しうる転写因子を、ChIP-seq の結果を網羅的に集めた ENCODE データベースを利用してリストアップした。その結果、様々な転写因子群が、Rad54B 遺伝子の発現調節領域に結合することが明らかとなった。その中でも細胞周期依存的な遺伝子発現を制御する転写因子である E2F ファミリーに着目して研究を進めることにした。

クロマチン免疫沈降法を用いて実際にクロマチンへの結合状態を検証したところ、E2F1 および E2F4 が Rad54B のプロモーター領域に結合することが判明した。さらに、E2F1 および E2F4 は細胞周期依存的に発現を制御する転写因子であることから、Rad54B の発現量は細胞周期依存的に制御されているかどうかを検討したところ、Rad54B の発現量は、G0/G1 期には低くなり、S/G2 期にかけて上昇することが判明した。最後に、細胞周期依存的な E2F1 および E2F4 の Rad54B プロモーターへの結合状態を検討したところ、E2F1 については、G0/G1 期では弱く、S/G2 期では強くなっているのに対し、E2F4 では、G0/G1 期では強く、S/G2 期では弱くなっていることが判明した。この結果は、同じ E2F ファミリーの E2F1 と E2F4 が相互に抑制しながら細胞周期依存的な遺伝子発現を制御するという過去の報告と合致する結果が得られた。これらのことから、Rad54B を介した細胞機能ネットワークは、細胞周期依存的に E2F1 および E2F4 によって制御されていることが明らかとなった。

従って、Rad54B を中心とした細胞機能ネットワークを治療標的とするには、E2F ファミリーのような、細胞周期依存的な遺伝子発現を司る機構をコントロールすることが必要であると考えられる。さらには、E2F ファミリーの上流にあるような、細胞周期を直接的に進行させる機構、例えば、CDK4/6 のようなキナーゼをターゲットとすることでも、細胞機能ネットワークの制御が可能になると考えられる。

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 2件)

安原崇哲、宮川清 細胞機能間ネットワークを標的としたがん治療戦略 放射線生物研究 (Radiation Biology Research Communications) **51**, 127-139 (2016). 査読有

Nagai, Y., Yamamoto, Y., Yasuhara, T., Hata, K., Nishikawa, T., Tanaka, T., Tanaka, J., Kiyomatsu, T., Kawai, K., Nozawa, H., Kazama, S., Yamaguchi, H., Ishihara, S., Sunami, E., Yamanaka, T., Miyagawa, K., and Watanabe, T. 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)

Takaaki Yasuhara 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年10月 広島市

Takaaki Yasuhara The Rad54B-p53 axis limits the strength of DNA damage checkpoint
第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜市

安原崇哲 細胞機能間ネットワークを標的とした新たながん治療戦略
第4回 群大 Genome Damage Discussion Group 公開セミナー 2016年5月 群馬県招待講演

安原崇哲 Rad54B を介した細胞機能ネットワークの解析によるがん発生機構の解明
平成28年東京 Radiation Biology Conference 新春放談会 2016年2月 東京都招待講演

安原崇哲 がん発生の基盤となる分子メカニズムを探る - DNA 損傷下における細胞周期の新たな制御因子 -
第10回東京工業大学原子炉研コロキウム 2015年12月 東京都 招待講演

Takaaki Yasuhara The novel mechanism linking cell cycle regulation to cancer development
第38回日本分子生物学会年会 2015年12月 神戸市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安原 崇哲 (YASUHARA, Takaaki)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90757056