

平成 30 年 6 月 1 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：2016～2017

課題番号：16H06757

研究課題名(和文) 卵巣癌新規病態mRNAプロセッシング異常の分子機構解明と臨床への応用

研究課題名(英文) Dysregulation of mRNA processing in ovarian cancer

研究代表者

谷川 道洋 (Tanikawa, Michihiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70706944

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)：本申請者は卵巣癌の治療標的として重要な相同組換修復経路の解明のため網羅的スクリーニングを行い、多数の転写・スプライシング因子を同定し、悪性疾患で体細胞変異が報告されているU2snRNP因子が含まれていることに着目し解析を行った。U2snRNPはATMやRAD51等のDNA損傷修復因子の発現制御により相同組換修復能維持に関与することを明らかにした。またSNRPA1が、DNA損傷時の初期段階で損傷部位に集積し、転写・スプライシング・翻訳を行うmRNAプロセッシングの破綻に伴い生じるDNA/RNA hybrid (R-loop)を処理することでゲノム恒常性維持に寄与することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Whole-exome sequencing studies of malignancies detected recurrent somatic mutations in U2 snRNP components of the spliceosome. These factors was also listed as novel players of DNA damage response in several genome wide screens for DDR genes. Here we unveiled two distinct pathways how spliceosome U2 snRNP factors contribute to genome stability. The main function is indirect, through transcription, to maintain the protein levels of essential repair factors and contribute to homologous recombination repair. In addition real-time laser microirradiation analysis identified the rapid recruitment of SNRPA1 to DNA damage sites. Intensive functional analysis of SNRPA1 unveiled the other, more immediate and direct effect to process R-loop structure, deleterious transcriptional by-products for the genome, at sites of ongoing transcription.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 DNA損傷修復 相同組換修復経路 mRNAプロセッシング スプライシング

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で特に予後不良の疾患である。近年高齢化に伴い罹患数が増加する一方で、5年生存率は未だ50%に届かず治療成績の向上が10年以上前から殆んど得られていない。卵巣癌は検診が確立されておらず、多くの患者がIII/IV期の進行した状態で診断される。腫瘍減量手術と化学療法を組み合わせた集学的治療が行われる。タキサン及びプラチナ製剤の併用療法は高い奏功性が得られるが、半数以上の患者が初回治療終了後1年以内に再発する。治療成績の改善のために早期診断スクリーニングシステムの確立と新規分子標的治療法の開発・導入が喫緊の課題である。BRCA1は、卵巣癌の5-10%を占める遺伝性・家族性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer) の中心的原因遺伝子である。その変異保持者は、35歳から卵巣癌発症率が加速度的に上昇し、生涯発症率は40-60%と非常に高い。BRCA1は細胞周期制御、転写制御、DNA損傷修復等、広範な生物学的役割を持つ。近年、PARP (Poly ADP-ribose polymerase) 阻害剤がBRCA1/2変異保持者の乳癌・卵巣癌に選択的に高い奏効性をもつことが注目を受けており、PARP阻害剤の一つであるOlaparibはすでにBRCA1/2変異保持者の再発卵巣癌において臨床応用に至っている。PARP1もBRCA1と同様にDNA損傷修復経路で重要な役割を担い、DNA損傷修復経路は卵巣癌の化学療法の有望な分子標的であるのみならず発癌過程を同定する有効なバイオマーカーとなる可能性が高い。BRCA1のカルボキシ末端に位置するBRCT領域は構成的転写活性化能を有す。HBOCにおいてもBRCT領域が変異好発部位であり、その変異により転写活性化能は消失する。BRCTには多様なタンパクが結合し、その一部は発癌抑制に不可欠なゲノム安定性維持に働くDNA損傷修復因子であるが、BRCT領域の転写活性化能がもつ直接的な発癌抑制機序は未解明な部分が多い。本申請者は、BRCT領域に直接結合し転写活性化能を制御する新規の転写・スプライシング因子DBC1(Deleted in breast cancer 1; CCAR2)とTFII-I(Transcriptin factor II-I)を同定し、これら2つのBRCA1共役因子が転写活性化制御のみならず、DNA損傷修復の相同組換え経路に寄与することを報告した。さらに、新規のDNA損傷修復因子を同定するsiRNAライブラリを用いたスクリーニングを行い、多数の転写・スプライシング因子を新規のDNA損傷修復候補因子として同定した。DBC1やTFII-IといったBRCTに結合する転写・スプライシング因子も含まれており、これらの因子のDNA損傷修復経路における機能解析はBRCTの転写活性化能の直接的な発癌抑制機序の解明のみならずBRCA1が担うゲノム安定性維持機構の新規の発見につながると期待される。特にmRNAのスプライシング因子は近年骨髄異形性症候群を始めとして複数の

悪性疾患で多数の変異が生じていることが報告されており、ゲノム安定性への役割の解明が待たれている経路である。申請者は、卵巣癌臨床検体を用いた全エクソン解析を160例ですで行っており、染色体コピー数異常や発現アレイも施行済みである(文献5)。TCGA等既存のデータベースとあわせ、多くの卵巣癌症例において、mRNAのプロセッシングに関する因子に変異・欠失等の異常を呈していることを見出している。卵巣癌の発癌機序や新規治療標的分子の解明が待たれる。

2. 研究の目的

本研究では

siRNA libraryによりDNA損傷修復の新規候補因子として同定されたmRNAのプロセッシングに関わる因子のゲノム安定性維持への役割を解明する。

卵巣癌における発病や治療効果へのバイオマーカーあるいは新規の創薬の標的になる可能性を探索する。

全エクソンシーケンスにより多数の癌種で変異していることが判明しているスプライシング経路のDNA損傷反応及び修復経路での役割を明らかにし、DNA損傷修復経路の主要な因子であるBRCA1及びPARP1との相互作用の意義を解明する。

臨床検体を用いて各スプライシング経路の因子の異常と臨床病理学的因子との関連、予後・化学療法感受性との相関を明らかにする。

本申請者は新規DNA損傷修復因子の候補である転写因子及びスプライシング因子のDNA損傷修復経路での機能解析を行っており、これらの因子をsiRNAでノックダウンするとDNA損傷修復経路の一部経路でのシグナル伝達が著しく抑制されること、またDNA損傷が実際に生じることを見出している。また一部の候補因子はBRCA1のBRCT領域と直接結合することやPARP1と複合体を形成することを確認している。本研究ではさらに詳細なメカニズムの解明、また転写やスプライシング等のmRNAのプロセッシングを抑制することで生じるDNA損傷の形態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 網羅的スクリーニングデータからの新規候補因子の抽出とDNA損傷修復経路における機能解析本申請者が行った

siRNA libraryをベースにして網羅的スクリーニングにより同定されたRAD51のIRIF(irradiation induced foci)の形成能に関わる新規候補因子の中からmRNAのプロセッシングに関連する転写及びスプライシング因子を抽出してDNA損傷修復経路への寄与を検討する。siRNAライブラリによる網羅的スクリーニングは多数の因子を抽出できる一方で、siRNAのoff target effect等で多くの偽陽性の因子が抽出されてしまう問題点

がある。そのため同様の網羅的手法で新規の DNA 損傷修復因子の抽出を試みた既報のデータ等と比較して重複して同定されている転写因子・スプライシング因子を抽出した。

抽出された転写因子・スプライシング因子が寄与する DNA 損傷修復経路を同定するため、DNA 損傷誘導下でのコロニー形成能を評価する。DNA 損傷誘導するために放射線、UV、プラチナ製剤やトポイソメラーゼ阻害剤等の抗がん剤を使用する。またヒドロキシウレアによる DNA 複製阻害や、過酸化水素暴露による活性酸素ストレス下でのコロニー形成能も評価した。

RAD51 は DNA 損傷修復経路のなかで二本鎖切断に対する相同組換え修復経路に寄与する因子である。相同組換え修復の異常は PARP1 阻害剤の分子標的とされているだけでなく、プラチナ製剤感受性との関連も報告されており、今後卵巣癌の有望な分子標的を見出す重要な経路である可能性が高い。本研究で同定された新規候補因子の相同組換え修復経路への寄与を検討するため、siRNA によるノックダウン下での pATM、CtIP、BLM、BRCA1、RPA、RAD51 の DNA 損傷部位への集積能を蛍光免疫染色で評価し、相同組換え修復経路のどの段階に寄与する因子であるかを同定した。

相同組換え修復能は DNA 相同組換え修復能評価アッセイにて検討する。このアッセイでは無機能 GFP カセット内にエンドヌクレアーゼ I-SceI 認識サイトを安定発現する DR-GFP U2OS 細胞を用いた。I-SceI エンドヌクレアーゼを強制発現させると、I-SceI 認識サイトに二重鎖切断が誘導される。遺伝子座内で相同組換え修復がおきると GFP 発光機能を獲得する。DR-GFP U2OS 細胞および I-SceI 発現ベクターは本申請者の留学先であったスウェーデン王国カロリンスカ研究所の Thomas Hellday 教授より提供を受けた。

4. 研究成果

本申請者は DNA 損傷修復経路、特に卵巣癌の治療標的として重要な相同組換え修復経路を担う新規因子の解明のため siRNA ライブラリを用いた網羅的スクリーニングを行い、多数の転写・スプライシング因子を含む新規相同組換え修復因子を同定したが、悪性疾患で体細胞変異が報告されている U2snRNP 因子が含まれていることに着目し解析を行った。U2snRNP は ATM や RAD51 等の DNA 損傷修復因子の発現制御により相同組換え修復能維持に関与することを明らかにした。また SNRPA1 が、DNA 損傷時の初期段階で損傷部位に集積し、転写・スプライシング・翻訳を行う mRNA プロセシングの破綻に伴い生じる DNA/RNA hybrid (R-loop) を処理することでゲノム恒常性維持に寄与することも明らかにした。本研究は、mRNA スプライシング因子が細胞の DNA 損傷ストレスに対処するために DNA 損傷修復経路の精緻な制御をしていることを明らかにし、その破綻がいわゆる「RNA 病」としての悪性腫瘍の発生に重要な役割を担う

新たな機序を示した。

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 4 件)

1) Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. Akino, Wada-Hiraike O, Tanikawa M(9) (他 14 名) *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Oct; S0303-7207(17) 30522-1 (査読有)

2) Recent advances in targeting DNA repair pathways for treatment of ovarian cancer and their clinical relevance. OdaK, Tanikawa M(2) (他 4 名) *Int J Clin Oncol*. 2017 May;15. (査読有)

3) Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer. Oki S, Sone K, Hamamoto R, Tanikawa M (6)(他 16 名) *Oncotarget*. 2017 Jun;20:8(25):40402-40411. (査読有)

4) The slicesome U2 snRNP factors promote genome stability through distinct mechanisms; transcription of repair factors and R-loop processing. Tanikawa M, Sanjiv K, Hellday T, Herr P, MOrtusewicz O *Oncogenesis*. 2016 Dec;19:5(12):e280. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

The 68th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology

The 75th Annual-Congress of the Japanese Cancer Association

The 69th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology

2017 Annual meeting of American Association for Cancer Research

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
谷川 道洋 (Michihiro Tanikawa)
東京大学 医学部附属病院
女性診療科・産科・女性外科 助教

研究者番号：70706944

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()