

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03585

研究課題名(和文) 乳癌・卵巣癌治療の分子基盤としてのグアニン4重鎖解除機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of the mechanisms for DNA G-quadruplex resolution as a molecular basis of the treatment of breast and ovarian cancer.

研究代表者

太田 智彦(Ohta, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60233136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する治療としてDNAの二次構造であるグアニン四重鎖(G4)安定化剤の有効性を検討するため、G4を制御するメカニズムを解析した。その結果、HERC2と呼ばれるタンパク質が、DNAヘリカーゼであるBLMおよびWRNと1本鎖DNA結合タンパク質であるRPAとの結合を仲介し、さらにRPA2のリン酸化およびユビキチン化を介して、G4の解除に必須な役割を果たすことが判明した。HERC2の欠失および変異によりがん細胞のG4が蓄積し、G4安定化剤に対する感受性が亢進することから、临床上重要なメカニズムと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんや卵巣がんの中で特に予後の悪いがんの一部は、DNAの修復機能に異常があることがわかっており、これを標的とした治療が有効である。しかし、この治療法における耐性の獲得が問題となっている。本研究により、そのようながんの弱点としてDNAの二次構造であるグアニン四重鎖(G4)が蓄積するメカニズムの1つが解明された。

研究成果の概要(英文)：We investigated mechanisms regulating a secondary DNA structure G-quadruplex (G4) to clarify the significance of G4 stabilizer in cancer treatments. We discovered an essential role of HERC2 in G4 resolution by mediating interaction between single-strand DNA binding protein RPA and DNA helicases BLM and WRN. HERC2 was also required for phosphorylation and ubiquitination of RPA2. This mechanism is critical because G4 accumulation as a result of HERC2 deficiency may provide a therapeutic target for G4 stabilizers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳癌 卵巣癌 相同組換え修復 グアニン4重鎖 G4安定化剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌および卵巣癌の中でも特に予後の悪いホルモン受容体陰性・HER2 陰性 (トリプルネガティブ)乳癌と漿液性卵巣癌は、BRCA1/2 変異などの原因により DNA 相同組換え修復 (homologous recombination; HR) 機能に異常があることがわかっており、これを標的とした Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)阻害剤による合成致死療法が有効である。しかし、これらの合成致死を利用した治療において耐性獲得が生じることが知られており、その要因として HR 機能の回復が問題となっていた。

(2) Bloom 症候群の原因遺伝子である BLM の欠失は姉妹染色分体交換 (SCE) を亢進させ、BRCA1/2 欠損による HR 不全を回復させることが報告されていた。

(3) BLM などの DNA ヘリカーゼは DNA の二次構造であるグアニン四重鎖 (G-quadruplex; G4) を解除するが、G4 の解除を阻害する G4 安定化剤が BRCA1/2 不全乳癌を特異的に死滅させることが報告されていた。

(4) 研究代表者らは、HERC2 が BLM の機能に必須で、HERC2 抑制によって SCE の亢進と G4 の蓄積が生じ、また PARP 阻害剤に耐性、G4 安定化剤に感受性となるという知見を得ていた。

2. 研究の目的

トリプルネガティブ乳癌と漿液性卵巣癌は乳癌・卵巣癌の中でも特に予後不良だが、DNA 相同組換え修復 (HR) 機能不全があり、これを標的とした合成致死療法が有効である。しかし、耐性獲得機序として HR 機能の回復が問題となる。申請者は Bloom 症候群遺伝子産物である BLM の機能、すなわち姉妹染色分体交換 (SCE) 抑制とグアニン四重鎖 (G4) 解除に必須な因子として HERC2 を同定している。HERC2 は癌で高頻度に変異を認めるが、HERC2 機能の抑制で SCE の亢進、G4 の著明な蓄積、さらに G4 安定化剤に対する感受性の亢進を認めた。この結果から、HERC2 機能不全が合成致死療法耐性を起因する HR 機能の回復に寄与する一方、そのような耐性癌に対して G4 安定化剤が有効な可能性が示唆された。本研究ではこの仮説を立証し、臨床応用への基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株は HeLa, HCT116, U2OS および HEK293T 細胞を用いた。両アリル HERC2 の C 末端 HECT ドメインを欠失したユビキチンリガーゼ (E3) 死活型変異 (E3⁻/E3⁺) は CRISPR/Cas9 を用いて作製した HCT116 細胞を用いた。ノックダウンによる遺伝子発現抑制は Doxycyclin 誘導性に shRNA を発現する細胞を用いた。遺伝子過剰発現のためのトランスフェクションはリン酸カルシウム法あるいはリポフェクタミンを用いて行った。

(2) *in vivo* におけるタンパク質間の結合を免疫沈降、ウェスタンブロットにて解析した。クロマチンタンパク質についてはクロマチン分画を benzonase にて可溶化して解析した。ユビキチン化産物を解析するための免疫沈降は denature コンディションで行った。Replication protein A (RPA) の HERC2 複合体からの離脱および 1 本鎖 DNA への結合は HERC2 抗体による免疫沈降物を精製し、*in vitro* におけるビオチンラベルした oligo-dT との結合によって解析した。

(3) タンパク質の DNA 損傷 (DSB) 部位への集積は一般的な蛍光免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。G4 の定量化は細胞をメタノール：酢酸処理したのち、RNase を加え、蛍光免疫染色を行い、Cellomics イメージアナライザーで行った。

(4) 姉妹染色分体交換は、細胞を 48 時間 BrdU 標識した後、1 時間 colcemid 処理し、核を展開、紫外線照射した後、ギムザ染色にて解析した。

(5) 薬剤感受性を Clonogenic survival アッセイにて解析した。

(6) pre-rRNA の定量は qRT-PCR で行った。

4. 研究成果

先行研究にて HERC2 に対する抗体を作成し、免疫沈降物の質量分析計を用いたスクリーンで HERC2 の結合タンパク質として、BLM 複合体 (BLM/TOP3A/RMI1/RMI2) および Replication protein A 複合体 (RPA1/RPA2/RPA3) を同定し、HERC2 が BLM 複合体と RPA 複合体の結合を仲介すること、HERC2 の発現抑制あるいは E3 活性の死活化により SCE が亢進し、G4 が蓄積すること、G4 安定化剤に対する感受性が亢進することがプレリミナリーな結果として得られていたが、本研究では、これらの結果を様々な方法で追加解析し、その確証を得た。さらに以下の詳細なメカニズムを解明した。

HERC2 と RPA の細胞内局在の解析から、非ストレス時に HERC2 は RPA2 と核内に共局在するが、hydroxyurea 添加後に RPA2 が 1 本鎖 DNA (ssDNA) 上に集積し、核内 foci を形成する際には HERC2 と共局在しないことが判明した。また、HERC2 と RPA の結合様式の解析は上記を反映し、HERC2 が ssDNA 上に結合した RPA に anchor するのではなく、ssDNA 上に RPA を release することを、*in vitro* にて HERC2-RPA 複合体とビオチンラベル ssDNA を混和させ、アビジン pull down にて証明した。すなわち、HERC2 がプールの RPA を複製ストレス下において ssDNA 上に供給して機能を果たすことが示唆された。また、HERC2 による BLM と RPA の仲介は複製ストレスのない細胞のみで行われていることがわかった。さらに質量分析計スクリーンで同定した相互作用因子

の中から BLM と同様に RecQ ファミリー-DNA ヘリカーゼである WRN も HERC2 と結合し、HERC2 によって RPA との結合が制御されていることが判明した。

G4 抑制における HERC2 の役割に関しては、HERC2 のノックダウン (KD) 細胞における G4 蓄積が HERC2 に結合する BLM および WRN ヘリカーゼの機能に起因することをエピスタシス解析にて検討した。その結果、G4 抑制において、BLM と WRN はエピスタシスな関係にないが、それぞれは HERC2 とエピスタシスな関係にあることが判明した。さらに、BLM と WRN を同時に抑制した際に生じる G4 の蓄積が HERC2 単独の抑制による G4 蓄積と同等で、BLM, WRN, HERC2 のトリプル KD でその量が変化しないことから、HERC2 が両ヘリカーゼを統括する形で、上流で制御していることがわかった。

shRNA で HERC2 を抑制した細胞および HCT116 E3/ E3 細胞の G4 安定化剤 pyridostatin に対する感受性を Clonogenic survival アッセイにて解析したところ、先行研究でわかっていた telomestatin と同様に、感受性が有意に亢進していた。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) データを用いた *in silico* 解析において乳がんを始め、多くのがんで HERC2 の有意な発現低下を認めた。

さらに HERC2 のより詳細な生化学的な解析を行った。HERC2 を分割したフラグメントの免疫沈降物の解析から、HERC2 の C 末端が内因性の HERC2 に結合し、この分子内結合により HERC2 の自己ユビキチン化が抑制され、SUMO 化が亢進する結果が得られた。BLM と RPA との結合部位を明らかにするために、shRNA にて内因性の HERC2 を抑制した上で、HERC2 フラグメントを発現させた細胞を用いて解析したところ、BLM は HERC2 の中央、RPA は HERC2 の C 末端 HECT ドメインに結合することが判明した。さらに、HERC2 の基質として、RPA2 を同定した。過剰発現系では RPA2 のユビキチン化は HERC2 C 末端 HECT ドメインにてプロテアソーム阻害剤依存性に検出され、また内因性の RPA2 のユビキチン化は HERC2 の E3 結合部位の欠損 (HCT116 E3/ E3 細胞) により抑制された。また、この HCT116 E3/ E3 細胞では BLM と全ての RPA サブユニット結合が著明に亢進しており、HERC2 による RPA2 のユビキチン化が BLM-HERC2-RPA 複合体中の RPA2 のターンオーバーを制御していることが示唆された。

HERC2 について RPA に対する作用と核小体におけるより役割を解析し、以下の結果を得た。HERC2 は C 末端の HECT ドメインを介して RPA と結合し、RPA2 をユビキチン化して分解した。HERC2 は RPA2 のリン酸化を制御し、複製停止が起こらない低容量の hydroxyurea あるいは aphidicolin による軽度な複製ストレス下で生じる ATR による RPA2 Ser33 のリン酸化は HERC2 に依存していた。一方、HERC2 の E3 活性が死した HERC2 E3/ E3 細胞では RPA2 Ser33 のリン酸化が亢進していた。さらに、HERC2 によってユビキチン化され、分解される RPA2 は ATR によってリン酸化された RPA2 であることが示唆された。この反応の生理的な意義として G4 の解除において HERC2 の E3 活性は RPA とエピスタシスな関係にあることがわかった。HERC2 およびその E3 活性は BLM および WRN の核小体への局在に必須であった。Hydroxyurea による複製ストレスによって BLM は核小体から消退し、RPA2 とともに核内 foci に集積したが、HERC2 発現抑制下では、核内 BLM foci 形成は顕著に低下した。HERC2 は核小体 fibrillar center に局在していた。このことから HERC2 が BLM と WRN による G4 解除機能を介して Pol I による rRNA の合成に関与していることが考えられた。そこで、HERC2 機能不全が pre-rRNA 合成に与える影響を解析したところ、HERC2 ノックダウン HeLa, HCT116 および HERC2 E3/ E3 細胞のいずれにおいても G4 安定化作用を持つリボソーム機能抑制剤 CX-5461 投与による pre-rRNA 合成抑制効果が有意に増強した。

以上より、HERC2 は WRN, BLM, RPA の機能を介して G4 解除に重要な役割を果たし、その機能低下はリボソーム合成にも影響を与えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Wu W, Rokutanda N, Takeuchi J, Lai Y, Maruyama R, Togashi Y, Nishikawa H, Arai N, Miyoshi Y, Suzuki N, Saeki Y, Tanaka K, Ohta T.	4. 巻 78
2. 論文標題 HERC2 facilitates BLM and WRN helicase complex interaction with RPA to suppress G-quadruplex DNA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 6371-6385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-1877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imanishi S, Umezu T, Kobayashi C, Ohta T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH.	4. 巻 9
2. 論文標題 Chromatin Regulation by HP1 Contributes to Survival of 5-Azacytidine-Resistant Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2018.01166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Johmura Y, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, Maruyama R, Inoue JI, Fukukawa Y, Ohta T, Nakanishi M.	4. 巻 128
2. 論文標題 Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 5603-5619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI121679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Lai Y, Zhu M, Wu W, Rokutanda N, Togashi Y, Liang W, Ohta T.	4. 巻 9
2. 論文標題 HERC2 regulates RPA2 by mediating ATR-induced Ser33 phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50812-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Johmura Y, Harris A, Ohta T, Nakanishi M.	4. 巻 111
2. 論文標題 FBX022, an epigenetic multiplayer coordinating senescence, hormone signaling, and metastasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2718-2725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhu M, Wu W, Togashi Y, Liang W, Miyoshi Y, Ohta T.	4. 巻 11
2. 論文標題 HERC2 inactivation abrogates nucleolar localization of RecQ helicases BLM and WRN.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79715-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki N, Johmura Y, Wang TW, Migita T, Wu W, Noguchi R, Yamaguchi K, Furukawa Y, Nakamura S, Miyoshi I, Yoshimori T, Ohta T, Nakanishi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 TP53/p53-FBX022-TFEB controls basal autophagy to govern hormesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1897961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 呉文文, 竹内淳, 頼勇強, 三好康雄, 鈴木直, 佐伯泰, 田中啓二, 朱明章, 太田智彦.
2. 発表標題 HERC2はグアニン四重鎖 (G4) の主要な制御因子としてG4安定化剤の感受性を左右する.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko Ohta.
2. 発表標題 HERC2 promotes BLM and WRN functions to suppress G-quadruplex DNA.
3. 学会等名 EMBO Meeting Cellular signalling and cancer therapy 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yongqiang Lai, Mingzhang Zhu, Wenwen Wu, Yukiko Togashi, Tomohiko Ohta.
2. 発表標題 HERC2 ubiquitinates RPA2 in ATR dependent manner and promotes RPA to suppress G-quadruplex DNA.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Ohta
2. 発表標題 A novel role of HERC2 in maintaining chromosomal stability.
3. 学会等名 6th US-Japan DNA Repair Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 乳癌におけるDNA損傷修復不全とPARP阻害剤感受性
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 頼勇強, 吳文文, 梁偉新, 太田智彦
2. 発表標題 Resistance of Fbxo22 knockout cancer cells to poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)inhibitor.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 SERM感受性決定因子Fbxo22によるLuminal乳がん高リスク群の同定
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 PARP 阻害剤耐性とその克服戦略
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 DNA修復脆弱性を標的としたがん治療
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川紗紀, 宮下穰, 江幡明子, 佐藤章子, 原田成美, 濱中洋平, 甘利正和, 平川久, 大井恭代, 太田智彦, 多田寛, 石田孝宣
2. 発表標題 エストロゲン受容体の発現を制御するFbxo22は浸潤性小葉癌の予後因子となりうるか
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木友菜, 豊澤大地, 呉文文, 丹羽俊文, 太田智彦, 林慎一
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬耐性細胞はDNA修復機構に異常をきたしPARP阻害薬に反応する
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 BRCA1 N末端の変異とPARP阻害剤感受性: E3リガーゼ活性についての再考
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計10件

1. 著者名 頼勇強, 太田智彦.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床医のための乳腺基礎医学「乳癌におけるDNA損傷と修復不全」	

1. 著者名 太田智彦.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 乳癌の臨床	5. 総ページ数 9
3. 書名 BRCA1/2の基礎とPARP阻害剤	

1. 著者名 太田智彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 6
3. 書名 乳癌学 - 最新の診断と治療 - . 乳癌の分子生物学と発症機序「DNA修復不全と乳癌	

1. 著者名 櫻井晃洋, 赤木究, 和泉美希子, 太田智彦, 三木義男	4. 発行年 2017年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 44
3. 書名 遺伝子診断・遺伝カウンセリング. 遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) 診療の手引き 2017年版	

1. 著者名 頼勇強, 太田智彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床医のための乳腺基礎医学「乳癌におけるDNA損傷と修復不全」	

1. 著者名 太田智彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 乳癌の臨床	5. 総ページ数 9
3. 書名 BRCA1/2の基礎とPARP阻害剤	

1. 著者名 朱明章, 太田智彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト「DNA相同組換え修復とユビキチン」	

1. 著者名 朱明章, 呉文文, 太田智彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 8
3. 書名 がん分子標的治療「がん治療分子標的としてのDNA相同組み換え修復異常」	

1. 著者名 太田智彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 4
3. 書名 乳腺腫瘍学「7. BRCA変異診断、ゲノム診断」	

1. 著者名 郷田敦史, 呉文文, 太田智彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ「BRCA遺伝子変異による臓器特異的な発がん」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

聖マリアンナ医科大学大学院 医学研究科 応用分子腫瘍学
<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/index.html>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------