

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10471

研究課題名(和文) DNA損傷応答を制御する細胞機能ネットワークに着目した新規がん放射線治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cancer radiotherapy based on the regulatory network for the DNA damage response

研究代表者

細谷 紀子 (Hosoya, Noriko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：00396748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞におけるシナプトネマ複合体を構成する分子の1つであるSYCE2は、正常細胞では殆ど発現しないが、がん細胞では多様なレベルで発現の亢進がみられる「がん精巢抗原」でもある。本研究では、体細胞におけるSYCE2の機能解析を行い、SYCE2がクロマチン制御分子HP1 をヘテロクロマチンから引き離すことによってATM依存性のDNA二本鎖切断修復を促進し、放射線抵抗性を誘導することを明らかにした。この成果は、SYCE2が、体細胞における細胞核内微小環境とDNA損傷応答の連携機構に関わることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SYCE2が細胞核内においてクロマチン制御分子HP1 をヘテロクロマチン領域から引き離すことにより、がん細胞におけるDNA修復能を増強することが明らかになり、これまで生殖における役割しか知られてこなかったSYCE2の体細胞における役割を初めて示すことができた。SYCE2はその発現レベルに応じてがん細胞のDNA修復能を規定すると考えられるため、SYCE2を発現するがんのDNA修復能力の特性に基づいた新しい治療の構築に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：SYCE2 is one of the components of the synaptonemal complex, which is formed between homologous chromosomes to ensure their connection in meiosis. This protein is not expressed in normal mitotic cells but is aberrantly expressed at varying levels in somatic cancer cells, suggesting that it is a cancer-testis antigen. In this study, we investigated the mitotic roles of SYCE2. We found that SYCE2 insulates heterochromatin protein 1 from heterochromatin and promotes ATM-dependent DNA double-strand break repair and radioresistance. This finding suggests that SYCE2 plays a role in the link between the nuclear microenvironment and the DNA damage response in somatic cells.

研究分野：放射線基礎医学、放射線生物学、腫瘍生物学

キーワード：DNA損傷応答 がん 細胞核内微小環境 放射線抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の中の DNA には、放射線をはじめとする様々な原因で損傷が生じるが、細胞は DNA 損傷を修復する能力を備えている。DNA 損傷が正確に修復される場合には、細胞機能に影響は生じないが、正確に修復されない場合には、「DNA の異常が蓄積しやすい状態」が引き起こされ、がんなどの疾患の発症に結びつく。一方、放射線治療や一部の抗がん剤治療は、がん細胞の DNA に外的に「二本鎖切断」という致命的な損傷を与えることによって細胞死を引き起こすことを原理としている。DNA 二本鎖切断が修復された場合には細胞は生き残るが、修復されずに残存すれば細胞死が引き起こされる。したがって、より効果的な放射線治療や抗がん剤治療を行うためには、正常細胞とがん細胞の DNA 修復能力の特性の違いを踏まえ、正常細胞にはダメージを与えずに、がん細胞だけに特異的に細胞死が起こるような治療戦略をとることが重要である。

DNA 損傷応答・修復は、様々な因子によって多様な制御を受け、他の細胞機能の経路からも影響を受けて複雑に制御されていることが想定される。がんにおいては、しばしば DNA 修復能力の異常が観察されるが、どのようなメカニズムでその異常が引き起こされているかについては、十分に明らかにされていない。研究代表者らは近年、生殖細胞で高発現し、正常の体細胞では発現しないものの、がん細胞で発現が上昇する、いわゆる「がん精巣抗原」と呼ばれる分子群に着目して、それらの分子の体細胞における役割について研究を進め、がん精巣抗原が、DNA 損傷応答に多様な影響を与え、放射線感受性に変化をもたらすことを見出ししてきた。例えば、生殖細胞におけるシナプトネマ複合体を構成する分子の1つである SYCP3 が、体細胞において遺伝性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA2 と複合体を形成して DNA 相同組換え修復能を抑制し、放射線感受性を亢進させることを発見した。さらに、一本鎖切断修復分子 PARP の阻害剤が SYCP3 を発現するがんに対して有効である可能性を示した (Hosoya et al, EMBO Rep, 2012)。また、研究開始時点までに、別のシナプトネマ複合体形成分子である SYCE2 が、正常の体細胞では極めて低いレベルでしか発現しないものの、がん細胞では多様なレベルで発現が上昇している「がん精巣抗原」であること、そして、SYCE2 が、体細胞では ATM 依存性の DNA 損傷応答と DNA 二本鎖切断修復を亢進し、放射線抵抗性を誘導することも見出し出していた。

SYCE2 がどのような機序で DNA 損傷応答や修復を亢進させるのかについては明らかになっていない。一方、DNA は、ヒストンに巻きついて何重にも折り畳まれてクロマチンを形成し、細胞核の中に収納されている。近年、クロマチンの構造変換や細胞核内環境の変化が DNA 損傷応答・修復の制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。SYCE2 も、細胞核内微小環境に何らかの影響を与えることによって DNA 損傷応答・修復を亢進している可能性がある。その詳細な作用機序を解明することにより、細胞核内環境が DNA 損傷応答・修復や疾患の制御に果たす新たな役割を示すことにつながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、DNA 損傷応答と他の細胞機能（とくに、細胞核内微小環境）の連携に焦点をあて、DNA 損傷応答を制御する細胞機能ネットワークを分子レベルで解明することにより、新たな治療の確立につなげることを目的とする。具体的には、研究代表者の事前検討により、様々ながん細胞で多様なレベルで発現が亢進していること、そして、ATM 依存性の DNA 損傷応答と DNA 二本鎖切断修復の亢進を引き起こすことが既に分かっている SYCE2 分子に焦点をあて、SYCE2 が体細胞での DNA 損傷応答・修復の亢進を引き起こす背景として、SYCE2 が細胞核内構造を司る蛋白質との相互作用を介して細胞核内環境に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、SYCE2 発現によるクロマチン関連蛋白への影響と DNA 損傷応答の亢進との関連性について調べる。また、がん特異的な発現亢進が見られる他の生殖細胞関連分子についても、DNA 損傷応答・修復へ与える影響とその影響が引き起こされる分子機序を調べる。

3. 研究の方法

(1) SYCE2 がクロマチン関連分子の局在、および、相互作用に与える影響の解析

SYCE2 が、細胞核内微小環境の変化を介して DNA 損傷応答を制御している可能性を仮定し、SYCE2 の発現がクロマチン関連蛋白質の挙動に与える影響を調べる。具体的には、SYCE2 を内因性に発現するがん細胞において SYCE2 の発現を抑制したり、SYCE2 を発現していない正常網膜上皮細胞に FLAG-SYCE2 を安定発現させたりすることによって SYCE2 の発現量を変化させた場合に、クロマチン関連蛋白質 (HP1 α や H3K9me3) の局在の変化、発現量の変化が見られるかどうかを、それぞれ、免疫染色法、ウエスタンブロット法で調べる。また、SYCE2 の発現量を変化させることにより、HP1 α と H3K9me3 の間の結合や共局在に変化があるかどうかを、免疫沈降・ウエスタンブロット法や免疫染色法によって検討する。

(2) SYCE2 とクロマチン関連分子の複合体形成と結合様式の解析

(1)の結果で、SYCE2 がクロマチン関連蛋白質の局在に影響を与えることが明らかになった場合には、免疫沈降・ウエスタンブロット法による蛋白質複合体解析により、SYCE2 の直接の標的となっている分子を探索する。SYCE2 と複合体を形成する分子が同定できたら、SYCE2 と当該

分子が互いにどの部位を介して相互作用をしているのかを調べるために、FLAG-タグを付加した SYCE2 の様々な欠失変異体と HA-タグを付加した標的分子の様々な欠失変異体を COS7 細胞で共発現させ、免疫沈降・ウェスタンブロット法により、結合の有無を調べて、結合に不可欠な領域を同定する。また、組換え蛋白を用いて直接結合の有無を調べる。

(3) SYCE2 発現による細胞核内微小環境の変化が ATM 活性化に及ぼす影響の解析

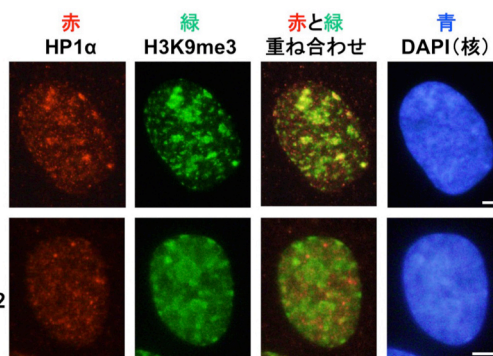
(2)において同定された標的分子との結合に不可欠な SYCE2 の領域を欠失、もしくは、別のアミノ酸で置換した SYCE2 の変異体を正常網膜上皮細胞に安定発現させた細胞株を樹立する。標的分子との結合能を欠いた SYCE2 変異細胞において、野生型 SYCE2 の全長を安定発現した細胞で観察される ATM の活性化が消失するかどうかを確認する。

(4)他の生殖細胞関連分子が DNA 損傷応答・修復へ与える影響とその作用機序の解析

SYCE2 以外の生殖細胞関連分子で DNA 損傷応答に変化を起こす分子を探索し、該当する分子については、どの経路のどの分子を標的にすることによって DNA 損傷応答を制御するのかについて、蛋白質複合体形成などを手がかりに同定し、詳細な作用機序を検討する。

4. 研究成果

(1) SYCE2 の発現変化は、ヘテロクロマチンのマーカーである H3K9me3 の局在や発現量には影響を与えないが、SYCE2 の発現により、H3K9me3 と結合してヘテロクロマチン形成に寄与することが知られる HP1 α の細胞核内でのドメイン形成が阻害されることが分かった。一方、SYCE2 は、HP1 α の発現量には影響を与えなかった。また、SYCE2 の発現により、HP1 α が H3K9me3 (ヘテロクロマチン) から乖離することも分かった(図1)。以上のことから、SYCE2 は、ヘテロクロマチンの局在には影響を与えずに、HP1 α をヘテロクロマチンから引き離すことが明らかとなった。

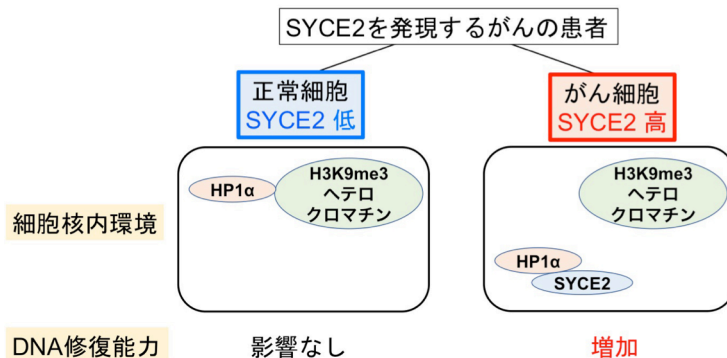


<図1> SYCE2発現細胞におけるHP1 α とH3K9me3の共局在の減少

(2) (1)の結果から、SYCE2 が HP1 α を標的としていることが示唆されたために、SYCE2 と HP1 α の相互作用の有無について調べた。SYCE2 は HP1 α と直接結合することが分かった。種々の欠失変異体間の結合解析の結果、SYCE2 は自身の N 末領域に存在する疎水性に富んだアミノ酸領域を介して HP1 α の CSD (Chromo Shadow Domain) と結合することが分かった。

(3) HP1 α との結合能を欠いた SYCE2 の変異体を発現させた細胞では、野生型 SYCE2 の全長を安定発現した細胞で観察される ATM の活性化が見られなくなった。このことから、SYCE2 が HP1 α と結合して HP1 α をヘテロクロマチンから引き離すことが、SYCE2 発現がん細胞における ATM 依存性の DNA 損傷応答と修復の亢進に必須であることが示された。

(4) 本研究成果は、これまで生殖における機能しか知られていなかった SYCE2 のがんにおける役割を初めて示したばかりでなく、新しいがん治療への応用につながるものが期待されるものである。SYCE2 は細胞核内環境の制御を介してがん細胞における多様な DNA 修復能を規定する重要な因子であると考えられ(図2)、新たながん治療の標的となり得るとともに、SYCE2 発現陽性がんにおける DNA 修復能力の特性に基づいた新しい治療概念の構築につながることも期待される。(Hosoya et al, Life Science Alliance, 2018) なお、SYCE2 以外でも、がん特異的な発現をする生殖細胞関連分子の中で、DNA 損傷応答に変化を起こす分子を新たに同定し、その作用機序について検討を進めている。



<図2> SYCE2は細胞核内環境の変化を介してがん細胞のDNA修復能を規定する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hosoya Noriko, Ono Masato, Miyagawa Kiyoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Somatic role of SYCE2: an insulator that dissociates HP1 from H3K9me3 and potentiates DNA repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201800021	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 Toya T, Ogura M, Toyama K, Yoshimi A, Shinozaki-Ushiku A, Honda A, Honda K, Hosoya N, Murakami Y, Kawashima H, Nannya Y, Arai S, Nakamura F, Shinoda Y, Nangaku M, Miyagawa K, Fukayama M, Moriya-Saito A, Katayama I, Ogura T, Kurokawa M.	4. 巻 103
2. 論文標題 Prognostic factors of Erdheim-Chester disease: a nationwide survey in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1815 ~ 1824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2018.190728	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 Kobayashi Wataru, Hosoya Noriko, Machida Shinichi, Miyagawa Kiyoshi, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 799 ~ 809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12513	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 舟山知夫、岡崎龍史、田内広、中村麻子、立花章、松本英樹、小林泰彦、細谷紀子	4. 巻 53(1)
2. 論文標題 日本放射線影響学会第60回大会ワークショップ「放射線教育の現状と課題」開催報告	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 73 ~ 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 續輝久、細井義夫、松田尚樹、神田玲子、細谷紀子、宮川清、粟井和夫、近藤隆	4. 巻 52(2)
2. 論文標題 医学部における“放射線影響リスク科学”教育の推進の現況と課題	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 129 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 がん精巢抗原SYCE2は細胞核内構造の制御を介して細胞のDNA修復能を規定する
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hosoya N, Miyagawa K
2. 発表標題 SYCE2 shapes the nuclear structure defining the DNA repair activity and radiosensitivity
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 The roles of the meiotic synaptonemal complex protein SYCE3 in cell division in cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 がん精巢抗原のゲノム不安定性における機能的意義
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 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 がん精巢抗原によるDNA修復を制御する細胞核構造の形成
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 SYCE2-HP1複合体形成によるヒト細胞のDNA修復能力の亢進
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 がん治療の標的となるDNA修復を制御する核内微小環境～シナプトネマ複合体形成分子SYCE2の体細胞での解析から分かること～
3. 学会等名 第20回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム in 奈良
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 がん精巢抗原SYCE2はDNA修復能を規定する核内構造を形成する
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 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 シナプトネマ複合体形成分子SYCE2は体細胞の核内微小環境を変化させてDNA修復を制御する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 SYCE2によるDNA損傷応答を制御する核内構造の形成
3. 学会等名 第35回染色体ワークショップ / 第16回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----