

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0235

研究課題名（和文）ゲノム不安定性を制御するDNA複製ストレス応答機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying DNA replication stress response regulating genomic instability

研究代表者

塩谷 文章（Shiotani, Bunsyo）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10627665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム不安定性は正常細胞の発がん過程において遺伝子変異・欠失・増幅・転座を獲得する上で必要な性質であり、ほぼすべてのがん細胞で認められるがんの特徴の一つである。本研究は、変異型KRASG12V発現によって転写依存的なゲノムDNAのヘテロクロマチン化の促進がDNA複製ストレス要因となること、またDNA複製ストレス応答因子であるATRの発現上昇がDNA複製ストレス耐性を制御し変異型KRASG12Vによるゲノム不安定性を獲得しながらクローン拡大すること、更にはATR高発現がKRAS変異肺がんの悪性化と関連することが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異型KRASG12Vによる転写依存的なヘテロクロマチン形成によってDNA複製ストレス要因となること、またATR-PrimPol依存的なDNA複製ストレス耐性によってヘテロクロマチン近傍で再プライミングが生じDNA複製を継続するが、同時に脆弱なssDNA露出を引き起こすことによってゲノム不安定性を誘発することを明らかにしたことにより、非遺伝性がんにおける高頻度ながんゲノム不安定性誘発メカニズムの一端が解明された学術的意義は大きい。またこの成果は変異型KRAS肺がん患者におけるATRシグナル経路を標的とする新規治療法の開発が期待され、社会的波及効果も大きい。

研究成果の概要（英文）：Genomic instability is a necessary property for the acquisition of gene mutations, deletions, amplifications, and translocations during tumor development process of normal cells and is one of the Hallmarks of cancer that is observed in almost all cancer cells. The present study demonstrated that oncogenic KRASG12V expression promotes transcription-dependent heterochromatinization of genomic DNA, which induces DNA replication stress, and that elevated expression of ATR, a DNA replication stress response factor, regulates DNA replication stress tolerance and leads to clonal expansion while acquiring genomic instability due to mutant KRASG12V. Furthermore, we found that high ATR expression is associated with poor prognosis of KRAS mutant lung cancers.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNA複製ストレス ゲノム不安定性 RNA転写 ヘテロクロマチン ATR PrimPol KRAS 肺がん

1. 研究開始当初の背景

ゲノム不安定性は正常細胞の発がん過程において遺伝子変異・欠失・増幅・転座を獲得する上で必要な性質であり、ほぼすべてのがん細胞で認められるがんの特徴の一つである。興味深いことに、ドライバー変異に起因する異常な細胞増殖にともなう高度な DNA 複製ストレスが複製エラーを促進することによりゲノムが不安定化し、がんの発生を加速するメカニズムが示唆されている (Halazonetis et al. *Ann Rev Pathol* 2015)。このことは DNA 複製ストレス及びそれに対する細胞応答が 1 細胞内において細胞のがん化につながるゲノム進化 (ゲノム不安定化) を促進することを強く示唆している。

DNA 複製ストレスは一本鎖 DNA(ssDNA)を露出させ、ゲノム DNA は危険な状態となる。申請者はこれまで ssDNA の露出が ATR キナーゼを活性化する機構を明らかにしてきた (Shiotani et al. *Mol cell*, 2009, *Mol Cell* 2011, *Cell Rep.* 2013)。ATR は様々な基質をリン酸化する事により細胞老化や細胞死を誘導し発がんを抑制すると考えられてきたが、RAS 遺伝子発癌マウスモデルでは、ATR 活性がむしろ発がん過程に要求されることが強く示唆されている (Shopp et al. *J clin Inv.* 2012)。そこで本研究ではがん遺伝子の活性化によって生ずる DNA 複製ストレスの要因、活性化した ATR がゲノム不安定性・細胞の形質転換を促進するメカニズムの解明に取り組んだ。

本研究を進めるにあたり、ATR 遺伝子や DNA 複製ストレス要因として RNA に着目した解析のための RNaseH1 の発現システムの利用により効率よく DNA 複製ストレス応答研究を展開できると考え、米国 Harvard Medical School/Massachusetts General Hospital Cancer Center との国際共同研究を展開した。

2. 研究の目的

課題①：がん遺伝子の活性化による ATR 活性化メカニズムを明らかにする

課題②：がん遺伝子活性化に起因する DNA 複製ストレス要因を明らかにする

課題③：活性化された ATR によって促進するゲノム不安定性獲得メカニズムを明らかにする

【学術的独自性と創造性】

従来の DNA 損傷応答研究では一時的・致死的な外因性 DNA 損傷 (放射線、UV、Cisplatin など) が用いられ、ATR 阻害は DNA 損傷感受性を亢進することから、ATR はゲノム安定性維持に必須、すなわち腫瘍抑制因子と考えられてきた。しかし、がんゲノム解析では ATR 遺伝子の突然変異は極めて少なく、腫瘍抑制因子としての概念と一致しない。そこで本研究では継続的・内因性 DNA 複製ストレスに対して ATR がゲノム不安定性促進因子として働くという独自のアイデアを検証した。申請者は変異型 KRAS 発現肺線がんモデル

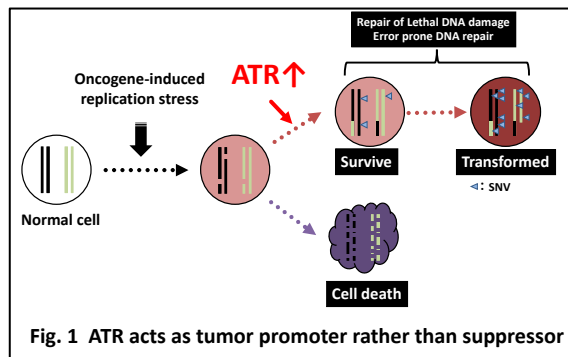


Fig. 1 ATR acts as tumor promoter rather than suppressor

において ATR 高発現が発がんを促進する結果を得ており上記アイデアを検証するモデルを有している。これにより ATR が変異型 KRAS による DNA 複製ストレスに応答し致死的 DNA 損傷を修復・細胞の生存を優先することにより、むしろ突然変異を含むゲノム異常を促進し、ゲノムの不安定性獲得・発がんを促進する機能の解明に取り組んだ。(Fig.1)

3. 研究の方法

ヒト正常肺上皮細胞 (SAEC) に ATR 高発現系を導入し、これらの細胞において変異型 ER-KRAS^{G12V} (4OHT により誘導) を導入し、肺腺がん発生モデルを作成した。これらの細胞において足場非依存的増殖能を獲得したクローンを取得し Replication Stress Tolerant Cell (RSTC) を樹立し解析に用いた。コントロールおよび ATR 高発現細胞における変異型 KRAS 発現による DNA 複製に及ぼす影響を、DNA ファイバー法を用いて DNA 複製フォークの進行速度を解析した。DNA 複製ストレス要因を解析するため、RNA 転写抑制剤 (DRB)、ヘテロクロマチン解消剤 (クロロキン)、及び EZH2 阻害剤 (GSK126) 存在下の DNA 複製フォークの進行速度を解析した。また、クロマチン動態について HistoneH3K27me3 レベルを免疫染色法、ゲノム DNA の MNase 感受性試験によってヘテロクロマチン化を評価した。さらには RSTC におけるゲノム不安定性を WGS によって解析した。

4. 研究成果

課題①：がん遺伝子の活性化による ATR 活性化メカニズム

がんドライバー遺伝子の活性化は、異常な DNA 複製ストレスを誘発し、ゲノム不安定性を誘発する。これまでに、KRAS^{G12V} 肺腺がんモデルを作成したところ、DNA 複製ストレス応答の中心的な役割を果たす ATR の高発現が形質転換を促進する実験結果を認めた。コントロール条件下で KRAS^{G12V} 発現によってわずかに足場非依存性細胞増殖能を獲得した DNA 複製ストレス耐性クローン (Replication Stress Tolerant Cell: RSTC) を取得し解析したところ、KRAS^{G12V} を発現する前の細胞に比べて ATR の発現が上昇する結果を得た。すなわち、ATR 高発現は KRAS^{G12V} によって誘導される形質転換において必要十分条件を満たすことが強く示唆された。この DNA 複製ストレス耐性獲得過程において KRAS^{G12V} 発現後、14 日経過ごろから ATR 発現の上昇が認められた。次に、ATR 発現上昇のメカニズムについて検証し、ATR 発現を抑制する miR-158 が KRAS^{G12V} によって発現抑制され、ATR の mRNA が発現上昇することや ATR 遺伝子の増幅によることを明らかにした。

課題②：がん遺伝子活性化に起因する DNA 複製ストレス要因を明らかにする

KRAS^{G12V} 発現が DNA 複製の進行に及ぼす影響を、DNA ファイバーアッセイを用いて解析したところ、KRAS^{G12V} によって DNA 複製フォーク進行速度の著しい低下を認めた。KRAS^{G12V} による DNA 複製ストレス誘発要因を解析するため、転写阻害剤 DRB やヘテロクロマチン解消剤 CQ 処理を用いたところ複製フォークの進行遅延が回避された。すなわち転写依存的なヘテロクロマチン形成が複製ストレスの要因となることが示唆された。KRAS^{G12V} によって誘導される DNA 複製ストレスの要因として RNA 転写が要因の一つと考えられたことから、R-loop 量について検証したところ、ATR 高発現の有無にかかわらず KRAS^{G12V} による R-loop 量の増加を認めなかった。また R-loop の解消に関わる RNaseH1 を導入した細胞においても KRAS^{G12V} によって誘導される DNA 複製フォーク進行遅滞が解消されなかった。さらに、RNA 転写装置と DNA 複製の衝突を PLA 法にて検討したが DNA 複製ストレスの要因となりうる結果を得られなかった。そこで DRB によって発現抑制される RNA を解析したところ、H3K27me3 ChIP-seq シグナルと重複することが認められた。また KRAS^{G12V} 発現によって H3K27me27 レベルが上昇すること、またこれは DRB や EZH2 阻害剤 GSK126 によって抑制されたことから、KRAS^{G12V} 発現によって誘導された RNA 転写依存的に PRC2 複合体がヘテロクロマチンを誘発し DNA 複製ストレス要因となることを明らかにした。非常に興味深いことに ATR 高発現細胞において KRAS^{G12V} による複製進行速度低下の回復を認めた。またこの DNA 複製ストレス耐性には ATR 依存的な PrimPol 依存的な再プライミングが関与することを明らかにした。興味深いことに H3K27me3 が関連するヘテロクロマチン近傍には ATR-PrimPol 経路依存的な再プライミングによる ssDNA が多発することを明らかにした。

課題③：活性化された ATR によって促進するゲノム不安定性獲得メカニズムを明らかにする

KRAS^{G12V} 発現による DNA 複製ストレスに対して ATR 高発現によって PrimPol 依存的な DNA 複製ストレス耐性を示した細胞や、KRAS^{G12V} 誘導形質転換細胞 (RSTC: 後天的に ATR 高発現を獲得) においてゲノム不安定性の指標について検証したところ、micronuclei 形成や UFB (Ultra fine bridge) が顕著に上昇することを認めた。また RSTC の全ゲノム解析から、SV や SNV 頻度の上昇に加えて whole genome duplication (WGD) が生じることから、ATR 高発現によって DNA 複製ストレス耐性を示し生存した RSTC は、同時にゲノム不安定性を獲得することが示された (Fig 2)。最後に TCGA 及び国立がん研究センターにおける肺腺がん (LUAD) コホートにおいて KRAS 変異 LUAD における ATR 高発現は有意に予後不良を示すことが明らかとなった。以上より ATR-PrimPol 経路は KRAS 変異による複製ストレス耐性を制御し、ゲノムの不安定性を蓄積しながらクローン拡大すること、更には ATR 高発現が KRAS 変異肺がんの悪性化と関連することが明らかとなった。

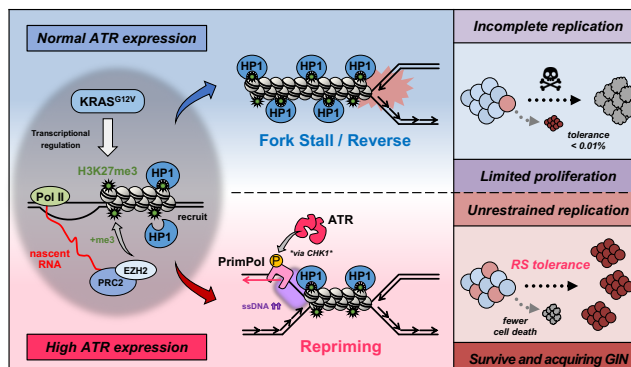


Fig. 2 Proposed model for ATR-PrimPol-mediated RST under KRAS^{G12V}-induced RS.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yano Kimiyoshi, Takahashi Ryou-u, Shiotani Bunsyo, Abe Junko, Shidooka Tomoki, Sudo Yuki, Yamamoto Yusuke, Kan Shisei, Sakagami Hiroki, Tahara Hidetoshi	4. 巻 297
2. 論文標題 PRPF19 regulates p53-dependent cellular senescence by modulating alternative splicing of MDM4 mRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100882 ~ 100882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100882	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 Kurashima Kiminori, Kashiwagi Hideto, Shimomura Iwao, Suzuki Ayako, Takeshita Fumitaka, Mazevet Marianne, Harata Masahiko, Yamashita Takayuki, Yamamoto Yusuke, Kohno Takashi, Shiotani Bunsyo	4. 巻 2
2. 論文標題 SMARCA4 deficiency-associated heterochromatin induces intrinsic DNA replication stress and susceptibility to ATR inhibition in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 zcaa005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/narcan/zcaa005	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 Yasuhara Takaaki, Kato Reona, Hagiwara Yoshihiko, Shiotani Bunsyo, Yamauchi Motohiro, Nakada Shinichiro, Shibata Atsushi, Miyagawa Kiyoshi	4. 巻 175
2. 論文標題 Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.08.056	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 -

1. 著者名 Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Sakai Satoshi, Iijima Kenta, Kitagawa Kyoko, Ohhata Tatsuya, Shiotani Bunsyo, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 1870
2. 論文標題 p130RB2 positively contributes to ATR activation in response to replication stress via the RPA32-ETAA1 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119484 ~ 119484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2023.119484	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 -

1. 著者名 Yano Kimiyoshi, Shiotani Bunsyo	4. 巻 -
2. 論文標題 Emerging strategies for cancer therapy by <scp>ATR</scp> inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.15845	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27件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Igarashi Taichi, Yasuhara Takaaki, Yano Kimiyoshi, Zou Lee, and Shiotani, Bunsyo
2. 発表標題 Heterochromatin-associated replication stress induced by oncogenic KRAS is tolerated by an ATR-PrimPol pathway
3. 学会等名 The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐太一 塩谷文章
2. 発表標題 ATR-PrimPol経路によるKRASG12V誘導性DNA複製ストレス耐性機構はがん悪性化に関与する
3. 学会等名 第35回発癌病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五十嵐 太一, 矢野 公義, 塩谷 文章
2. 発表標題 ATR-PrimPol経路によるKRAS誘導性DNA複製ストレス耐性機構はがん悪性化に関与する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 Therapeutic Strategies Using ATR Inhibitors to Target DNA Replication Stress Caused by undruggable Gene Mutations
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 An ATR-PrimPol pathway confers Tolerance to oncogenic KRAS-induced Replication Stress
3. 学会等名 Gordon Research Conference-Genomic Instability, DNA Repair and Human Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 ATRを介した複製ストレス寛容機構による細胞形質転換の促進
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 SMARCA4欠損によって誘導されるDNA複製ストレスを標的としたATR阻害治療
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 ATR依存的DNA複製ストレス寛容による細胞形質転換機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 がんとDNA複製ストレス応答機構 -前立腺癌について
3. 学会等名 Urologist Premium Research Conference 4th (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 がんとDNA複製ストレス応答機構-乳がんについて-
3. 学会等名 第11回信濃町乳腺カンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 SMARCA4 defects-associated heterochromatin induces intrinsic DNA replication stress and vulnerability to ATR inhibition in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 A new therapeutic strategy for lung cancer with tumor suppressor gene mutations
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 肺腺がんにおけるSMARCA4欠損関連性ヘテロクロマチンによる内在性DNA複製ストレスとATR阻害感受性の誘導
2. 発表標題 塩谷文章
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 DNA replication stress Cause and consequence of cancer
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会オンライン年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉島公憲 塩谷文章
2. 発表標題 SWI/SNFクロマチン再構成異常を標的としたATR阻害剤によるがん治療基盤確立
3. 学会等名 第8回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 肺腺がん細胞における内在性DNA複製ストレスを標的とするATR阻害療法
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩谷文章 倉島 公憲 河野 隆志
2. 発表標題 SMARCA4 deficiency Confers Sensitivity to ATR Inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cells
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 倉島公憲 河野 隆志 塩谷文章
2. 発表標題 SMARCA4欠損はDNA複製ストレスの上昇と複製フォークの不安定化によりATR阻害剤感受性を高める
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 塩谷 文章
2. 発表標題 発がん過程におけるDNA複製ストレスに対するATR応答機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉島 公憲 柏木 秀人 山下 孝之 河野 隆志 塩谷 文章
2. 発表標題 SMARCA4欠損は内在性DNA複製ストレスの増加とreversed forkの不安定化を誘導しATR阻害剤感受性を高める
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 千晴 丹伊田 浩行 塩谷 文章 北川 雅敏
2. 発表標題 p130RB2はDNA複製ストレスにおけるATR活性化に正に関わる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 がん遺伝子誘導性DNA複製ストレスに対するATR応答機構
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 倉島公憲、柏木秀人、河野隆志、塩谷文章
2. 発表標題 Intrinsic DNA Replication Stress Provides an Indication of Sensitivity to ATR inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cel
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 Kininori Kurasima, Takashi Kohno, and Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 Intrinsic DNA Replication Stress Confers Sensitivity to ATR Inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cell
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 Bunsyo Shiotani
2. 発表標題 Intrinsic DNA Replication Stress Confers Sensitivity to ATR Inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cell.
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 内在性DNA複製ストレスを標的とした肺線がん細胞におけるATR阻害療法
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩谷文章
2. 発表標題 DNA replication stress response regulated by ATR in cancer cells
3. 学会等名 DNA損傷ワークショップ
4. 発表年 2018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
研究 分担者	中田 慎一郎 (Nakada Shinichiro) (70548528)	大阪大学・高等共創研究院・教授 (14401)	
研究 分担者	安原 崇哲 (Yasuhara Takaaki) (90757056)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教 (12601)	

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		
米国	Harvard Medical School		