

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08127

研究課題名(和文) DNA修復と細胞周期制御のカップリング機構の解明による放射線治療の最適化

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms underlying the coupling between DNA repair and cell cycle regulation for the optimization of radiotherapy

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：相同組換え関連分子が細胞周期制御に果たす役割を調べるために、正常の上皮細胞において相同組換え関連分子の発現を抑制し、細胞周期の進行に与える影響を解析した。その結果、複数の相同組換え関連分子の発現抑制によって、G0/G1期の細胞周期の進行が遅延する現象が見られた。DNA二本鎖切断に対する主要な修復機構である相同組換え修復は、DNA複製時に生成される姉妹染色分体を修復の鋳型として用いることから、S期後半からG2期に限定して働くと考えられている。今回の結果からは、相同組換え関連分子は、細胞核のDNAの二本鎖切断に対する修復以外の機能を介して、G0/G1期進行を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換え関連分子が、G0/G1期の細胞周期の進行を制御していることが分かった。このことから、相同組換え関連分子は、S期後半からG2期にかけての細胞核におけるDNAの二本鎖切断に対する修復以外の機能も有していることが示唆され、相同組換え分子の新たな役割を探索するきっかけになった点で意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the link between DNA repair and cell cycle regulation, we investigated the roles of the proteins involved in homologous recombination in cell cycle progression in G0/G1 phase. We found that RAD51 and some other homologous recombination-related proteins promote cell cycle progression in G0/G1 phase, which cannot be explained by their roles in DNA double-strand break repair in the cell nucleus acting in the S and G2 phases.

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修復 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

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、修復されずに残存すれば細胞死が引き起こされるが、細胞の持つ DNA 修復能力によって修復された場合にはがん細胞は生き残ってしまう。がん治療が目指すのは、正常細胞にダメージを与えずにがん細胞だけを選択的に損傷させることであるから、放射線治療や抗がん剤治療の成否は、がん細胞と正常細胞の DNA 修復能の違いに大きく依存することになる。有効ながん治療を行うためには、正常細胞には存在せず、がん細胞のみに存在する DNA 修復の制御異常の特性を捉えて治療戦略に生かすことが重要である。

一方、DNA 修復以外で放射線治療の効果に影響し得る重要な生物学的因子として、細胞周期がある。体内に存在する正常細胞の殆どは、常に増殖するわけではなく、増殖能力を保ちながらも、G1 期から G0 期（静止期）に入り、分裂を停止して、G0/G1 期にとどまるが、がん細胞は、G0/G1 期にとどまることはなく、無制限に増殖を続ける。細胞周期ごとの放射線感受性の違いはよく知られており、G2~M 期では放射線感受性が高く、DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復機構が働く S 期後半では最も放射線感受性が低くなる。一方、G0 期（静止期）の細胞は、放射線だけでなく抗がん剤に対しても抵抗性である。腫瘍不均一性の原因となるがん幹細胞も G0/G1 期に存在するため、放射線治療抵抗性の原因になる。G0/G1 期における細胞周期進行の制御については、他の細胞周期に比べて、解明が遅れており、放射線治療抵抗性を克服し、より効果的な放射線治療を行うためにも G0/G1 期の細胞周期制御を理解することは不可欠である。

DNA 修復、細胞周期制御の個々の細胞機能において中心的役割を果たす分子を含めた情報伝達経路の解明は国内外で飛躍的に進んできたものの、DNA 修復や細胞周期制御のそれぞれの細胞機能を個別に理解するだけでは、効果的な放射線治療の開発は極めて困難である。なぜなら、DNA 修復は、生体の恒常性を維持するために、細胞周期制御を含む他の細胞機能と連携して機能し、また、多様な因子によって制御を受け、細胞機能ネットワークを形成していることが想定されるからである。DNA 修復分子群がどのように細胞周期進行制御とカップリングして放射線感受性を制御しているのかについては、未だ十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

相同組換え修復は、細胞核 DNA の二本鎖切断の修復を担う主要な経路の 1 つであり、修復の鋳型として無傷の姉妹染色分体を必要とするため、すべての細胞周期で働くわけではなく、S 期から G2 期限定で働くとされる。本研究では、DNA 修復の中でも、研究代表者らが特に重点的に研究をしてきた相同組換え修復に関与する分子群に焦点を当て、それらの分子が、細胞周期制御をはじめとする他の細胞機能とどのように連携しているのかに焦点をあてて機能解析を行い、放射線治療を含むがん治療の最適化のための治療戦略を提唱するための基本原理を確立することを目的とする。特に、未だ制御機構が分かっていない G0/G1 期の細胞周期進行において、相同組換え修復が関与している可能性について検証を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) G0/G1 期の細胞周期の進行制御における相同組換え修復分子の役割の解析

G0/G1 期は、放射線治療抵抗性を特徴する「がん幹細胞」とも関係が深く、G0/G1 期の進行制御のメカニズムの解明は不可欠であるが、国内外で解明が遅れている領域でもある。

ヒトの正常網膜上皮細胞において、相同組換え関連分子をノックダウンした後に、serum starvation により、細胞周期を G1 期に同調した後、血清入りの通常培地で培養をして、その後の細胞周期の進行状況を解析する。

相同組換え修復の早期過程においては中心的な役割を果たす酵素である RAD51 をはじめ、BRCA1, BRCA2, PALB2 など、多数の分子が関与する。RAD51 パラログ分子群も、RAD51 と類似した構造を示し、相同組換えを補助する。これらの分子が G0/G1 期の進行に及ぼす影響を解析する。

(2) G0/G1 期の細胞周期の進行制御の標的分子、および、それを上流で制御する機構の同定

(1)における G0/G1 期同調後の進行の指標として、Cyclin D1 や CDK4 の発現レベル、Cyclin D1-CDK4/6 の複合体形成、Rb のリン酸化などを追跡する。これらの中で、相同組換え修復分子の発現抑制による影響が見られる場合には、それを上流で制御する候補分子の変動について、定量 PCR やウェスタンブロットングによって解析することにより、上流の分子を同定する。制御する分子が同定できた場合には、プロモーターに結合する転写因子をクロマチン免疫沈降によって同定することにより、その発現誘導機構を探索する。

#### 4. 研究成果

正常の網膜上皮細胞において、相同組換え関連分子の発現を抑制した上で、G0/G1 期に細胞周期を同調させた後の細胞周期の進行に与える影響を解析することを複数の相同組換え修復分子を対象として実施した。その結果、RAD51 を含む複数の相同組換え関連分子について、その発現抑制によって細胞周期の進行が遅延する現象が見られた。

これらの相同組換え関連分子の発現抑制細胞において、G0/G1 期同調後に血清入り培地を加えてリリースした後、時系列毎に細胞を回収し、ウェスタンブロットにより、Rb リン酸化状態を調べた。その結果、相同組換え関連分子の発現抑制群の細胞では、Rb のリン酸化が著明に遅延していることが分かった。このことから、相同組換え関連分子が G1 期から S 期への進行に促進的に働いている可能性が示唆された。

相同組換えは、修復の鋳型として DNA 複製によって生成された姉妹染色分体を用いることから、細胞周期の中では S 期後半から G2 期に限定して作動する。それ以外の細胞周期においては、姉妹染色分体が存在しないために鋳型が利用できず、相同組換えは働かないと考えられている。このような定説に従えば、相同組換え関連分子の欠損細胞が G0/G1 期で遅延することは、細胞核の DNA における修復の役割だけでは説明できないことになる。

以上の結果に基づき、相同組換え関連分子の新しい機能を発見すべく、あらためて、相同組換え関連分子の細胞内局在を解析したところ、相同組換え関連分子が細胞核内だけでなく、細胞質の中のミトコンドリアにも局在していることを確認した。そこで、S 期後半から G2 期にとどまらない相同組換え関連分子の働きが、細胞核内ではなく、ミトコンドリアにおける機能に起因する可能性を想定し、その機能の探索を開始している。

## 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 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morgan Chris、Nayak Aditya、Hosoya Noriko、Smith Gerald R.、Lambing Christophe	4. 巻 151
2. 論文標題 Meiotic chromosome organization and its role in recombination and cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Curr Top Dev Biol	6. 最初と最後の頁 91 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.ctdb.2022.04.008	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 該当する
1. 著者名 Hosoya Noriko、Miyagawa Kiyoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Implications of the germline variants of DNA damage response genes detected by cancer precision medicine for radiological risk communication and cancer therapy decisions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i44 ~ i52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrab009	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 Ochi Yotaro、Yoshida Kenichi、Huang Ying-Jung、Kuo Ming-Chung、Nannya Yasuhito、Sasaki Ko、Mitani Kinuko、Hosoya Noriko、Hiramoto Nobuhiro、Ishikawa Takayuki、Branford Susan、Shanmuganathan Naranie、Ohyashiki Kazuma、Takahashi Naoto、Takaku Tomoiku、et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23097-w	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 該当する
1. 著者名 Hosoya Noriko、Miyagawa Kiyoshi	4. 巻 112
2. 論文標題 Synaptonemal complex proteins modulate the level of genome integrity in cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 989 ~ 996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14791	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 Ikegami Masachika, Kohsaka Shinji, Ueno Toshihide, Momozawa Yukihide, Inoue Satoshi, Tamura Kenji, Shimomura Akihiko, Hosoya Noriko, Kobayashi Hiroshi, Tanaka Sakae, Mano Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 High-throughput functional evaluation of BRCA2 variants of unknown significance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16141-8	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6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 細谷紀子
2. 発表標題 DNA修復を標的とするがん治療
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第13回放射線生物学セミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細谷紀子、宮川清
2. 発表標題 The roles of the synaptonemal complex protein SYCE3 in inducing genomic instability in cancer
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 細谷紀子
2. 発表標題 相同組換え修復研究が切り拓く今日のがん治療
3. 学会等名 第58回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智陽太郎, 吉田健一, 南谷泰仁, 佐々木光, 三谷絹子, 細谷紀子, 石川隆之, 大屋敷一馬, 高橋直人, 塩澤裕介, 牧島秀樹, 白石友一, 真田昌, 高折晃史, 宮野悟, 小川誠司
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病急性転化のクローン進化および遺伝子異常と予後
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 越智陽太郎, 吉田健一, 南谷泰仁, 佐々木光, 三谷絹子, 細谷紀子, 平本展大, 石川隆之, 大屋敷一馬, 高橋直人, 高久智生, 土屋俊, 兼村信宏, 中村信彦, 上田恭典, 吉原哲, 塩澤裕介, 趙蘭英, 竹田淳恵, 綿谷陽作, 奥田瑠璃花, 牧島秀樹, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 真田昌, 高折晃史, 宮野悟, SHIH Lee-Yung, 小川誠司
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病急性転化におけるクローン進化および遺伝子異常と予後の解析
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hosoya Noriko, Miyagawa Kiyoshi
2. 発表標題 The roles of the cancer-testis antigens in regulating the DNA damage response
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 東京大学工学教程編纂委員会、上坂 充 (編)、細谷 紀子 (共著)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 162
3. 書名 原子力工学 放射線生物学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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