

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15040

研究課題名（和文）18-1-8複合体は合成致死を利用した分子標的薬ターゲットとなり得るか？

研究課題名（英文）18-1-8 complex as a therapeutic target?

研究代表者

川澄 遼太郎（Kawasumi, Ryotaro）

東京都立大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：60943545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：がんは遺伝子の病気であり、細胞の異常増殖を引き起こす遺伝子変異により発がんする。そうした遺伝子の変異は相補的に働く遺伝子への依存性を高めることから、副作用のない分子標的薬による治療の対象となり得る。CTF18遺伝子はDNAの複製や分配に関与することが知られ、30以上の遺伝子と合成致死となることが示唆されており、標的薬のターゲットとして有望である。本研究では、遺伝学的解析によりCTF18とPRIMPOL遺伝子の潜在的な合成致死性を発見した。CTF18はDNA複製因子をDNA上に安定化する働きを持つことから、CTF18とPRIMPOLがリプライミングにおいて相補的に働いてい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

本研究ではCTF18がDNA複製中にリプライミングにおいて重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。これはDNA複製において、リーディング鎖においてもリプライミングが頻繁に起きている可能性を示すものであり、従来のDNA複製モデルに対して一石投じるものとなった。また、急性白血病などの治療薬であるシタラビンの耐性機構にCTF18とSAMHD1が並行して寄与していることを明らかにした。したがってCTF18やSAMHD1の阻害薬を用いることでシタラビンによる抗がん治療の有効性を高めることができる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Cancer is caused by mutations on genes that result in dysregulation of cellular proliferation. Oncogenic mutations often increase the dependency of cancer cells on complementary genes, thus such complementary genes are attractive targets of molecular targeting drugs. One of the great example is PARP inhibitors proven to be efficient in familial breast cancer treatment harboring BRCA mutations. CTF18 is known to be involved in DNA replication and segregation, and suggested to be synthetically lethal with over 30 genes, making it an attractive target for cancer therapy. In this study, we discovered that CTF18 and PRIMPOL are synthetically lethal in the absence of DDX11. As CTF18 stabilizes replication factors including polymeprase alpha complex on DNA, CTF18 and PRIMPOL may compensate each other for DNA repriming.

研究分野：分子生物学

キーワード：CTF18 合成致死 DNA複製 染色体分配 PRIMPOL

1. 研究開始当初の背景

近年、抗がん剤を使った化学療法では、がん細胞に特異的な遺伝子の変異を利用した特異性の高い分子標的治療薬の開発が進められている。複数の遺伝子が同時に不良となることで細胞死を引き起こす、「合成致死性」を利用してがん細胞を選択的にターゲットするこの手法はこれまでに一定の成果を挙げている。例として、遺伝性の乳がんや卵巣がんの患者の8割以上に見受けられるBRCA遺伝子の変異に対しては、PARP阻害薬が有効な場合があることが実証されている。その一方で、既存の治療薬に抵抗性の場合も多く、まだまだ選択肢が限定的であることから、遺伝子変異に則した分子標的薬のさらなる研究開発が急がれる。

CTF18、DCC1、CTF8は18-1-8複合体を形成し、PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) と呼ばれるDNAポリメラーゼのクランプをDNA上にロードする活性を持つ。18-1-8複合体はこの活性によりDNA複製、DNA修復、及び姉妹染色分体間接着において重要な役割を果たすことが知られており、申請者自身もこれまでの研究で18-1-8複合体がDNA複製の伸長反応を促進すること、18-1-8複合体がDDX11というDNAヘリカーゼと相補的に姉妹染色分体間接着を制御することを明らかにしてきた[1]。18-1-8複合体は酵母からヒトまで高度に保存された複合体であり、酵母において18-1-8複合体の欠損と合成致死になる遺伝子が多数報告されている[2]。また18-1-8複合体の遺伝子は3割の前立腺がん・乳がん増幅が[3,4]、また2割の小細胞肺癌で変異が確認されており[5]、18-1-8複合体は合成致死を利用した分子標的薬のターゲットとして期待される因子のひとつである。

2. 研究の目的

本研究ではDNA複製、DNA修復、姉妹染色分体間接着において機能する様々な遺伝子とCTF18との多重遺伝子欠損株の作製、解析を通じて、18-1-8複合体の欠損と合成致死になる遺伝子の探索を行い、さらにその合成致死の原因に迫る。

3. 研究の方法

本研究では主に遺伝子操作の容易なニワトリBリンパ球DT40細胞を用いて実験を行った。遺伝学的解析を行うために必須のCTF18条件遺伝子欠損株は既に作製済みであったため、これをベースに様々な二重条件遺伝子欠損株を作製し、細胞の増殖や抗がん剤への感受性などにおける遺伝学的解析を実施した。必要に応じてヒト細胞においてもCTF18条件遺伝子欠損株を作製し、発見した事象の保存性を確認した。

4. 研究成果

シタラピン耐性におけるCTF18とSAMHD1の遺伝学的関係

シタラピンは半世紀前から白血病の治療に使われてきた抗がん剤である。今もなお白血病の治療薬として使われているが、耐性のがん細胞の存在がしばしば問題となり、その原因の一つがSAMHD1の発現レベルの増加であることが分かっている[6]。DNA複製ポリメラーゼの校正活性もシタラピン耐性に寄与することが知られており[7]、ポリメラーゼのはたらきを助ける機能をもつCTF18も同様

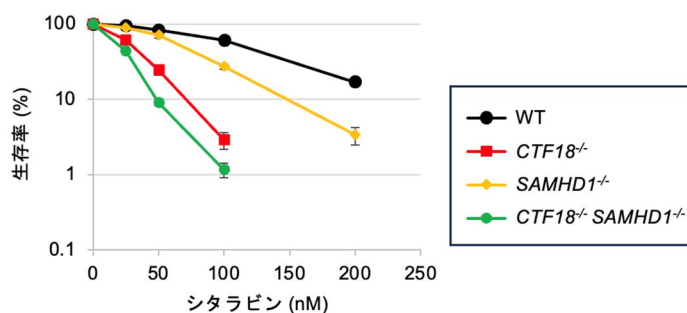


図1. シタラピン耐性におけるCTF18とSAMHD1の遺伝学的関係

である可能性が考えられた。そこでCTF18遺伝子欠損細胞のシタラピン感受性を検証したところ、やはりCTF18はシタラピン耐性に寄与することが明らかになった(図1)。さらに、CTF18とSAMHD1の遺伝学的関係を調べるために二重欠損細胞を作製したところ、それぞれの単独欠損細胞に比べて、二重欠損細胞では感受性が増加していた。これらの事実から、CTF18とSAMHD1がシタラピン耐性において独立して機能していることが明らかとなった。したがって、SAMHD1の発現量増加によるシタラピン耐性のがん治療において、CTF18の阻害薬が有効となる可能性が示された。

DNA複製におけるCTF18とPRIMPOLの遺伝学的関係

CTF18はDDX11と合成致死であることが知られており、動物細胞においてその致死性は染色体分配に関する機能をバイパスすることで抑制される[1]。一方、出芽酵母ではこの抑制は見られない。出芽酵母を使った先行研究や生化学の研究から、CTF18がDNAポリメラーゼをDNA上に安定化する機能を持つことが示唆されており[8,9]、プライマーゼ活性をもつポリメラーゼもCTF18非存在下だとDNAへの結合量は低下する。興味深いことに動物細胞ではプライマーゼ活性をもつポリメラーゼであるPRIMPOLが存在し、出芽酵母では保存されていない。そこで、CTF18-

DDX11の合成致死性は、染色体分配の異常だけではなく、リプライミングの不良によっても引き起こされるという仮説を立てた。この仮説の検証のため、CTF18-DDX11の合成致死の原因である染色体分配異常を抑制する三重遺伝子欠損細胞においてPRIMPOLを遺伝子破壊し、四重遺伝子欠損細胞を作製した。この細胞を用いて細胞の増殖を調査したところ、CTF18とDDX11の非存在下ではPRIMPOLが必須になることが分かった(図2)。したがって、CTF18とDDX11の非存在下ではPRIMPOLによるリプライミングが生存に必須となる可能性が示された。今後、この細胞を用いて細胞死が起こる細胞周期の調査、DNAファイバー法による複製ダイナミクスの調査を行うことでさらなる検証を進めていく。

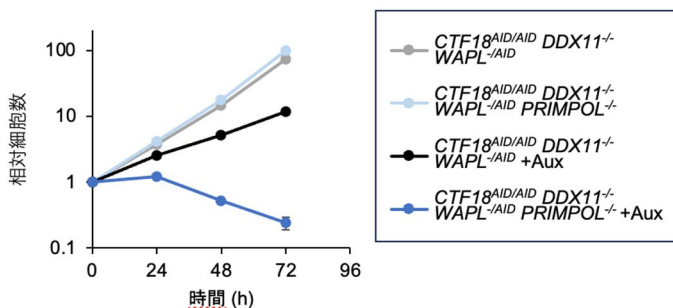


図2. CTF18とPRIMPOLの細胞増殖における遺伝学的関係

5. 参考文献

1. Kawasumi R, Abe T, Psakhye I, Miyata K, Hirota K, Brnzei D. Vertebrate CTF18 and DDX11 essential function in cohesion is bypassed by preventing WAPL-mediated cohesin release. *Genes Dev.* 2021;35: 1368-1382.
2. Guo E, Ishii Y, Mueller J, Srivatsan A, Gahman T, Putnam CD, et al. FEN1 endonuclease as a therapeutic target for human cancers with defects in homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117: 19415-19424.
3. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 2016;22: 369-378.
4. Pereira B, Chin S-F, Rueda OM, Vollan H-KM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun.* 2016;7: 1-16.
5. Mina M, Raynaud F, Tavernari D, Battistello E, Sungalee S, Saghafia S, et al. Conditional Selection of Genomic Alterations Dictates Cancer Evolution and Oncogenic Dependencies. *Cancer Cell.* 2017;32: 155-168.e6.
6. Schneider C, Oellerich T, Baldauf H-M, Schwarz S-M, Thomas D, Flick R, et al. SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2017;23: 250-255.
7. Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, et al. The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget.* 2017;8: 33457-33474.
8. Kubota T, Hiraga S-I, Yamada K, Lamond AI, Donaldson AD. Quantitative proteomic analysis of chromatin reveals that Ctf18 acts in the DNA replication checkpoint. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10: M110.005561.
9. Baris Y, Taylor MRG, Aria V, Yeeles JTP. Fast and efficient DNA replication with purified human proteins. *Nature.* 2022; 1-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Washif Mubasshir, Ahmad Tasnim, Hosen Md Bayejid, Rahman Md Ratul, Taniguchi Tomoya, Okubo Hiromori, Hirota Kouji, Kawasumi Ryotaro	4. 巻 127
2. 論文標題 CTF18-RFC contributes to cellular tolerance against chain-terminating nucleoside analogs (CTNAs) in cooperation with proofreading exonuclease activity of DNA polymerase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103503 ~ 103503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2023.103503	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 Kojima Kota, Ohkubo Hiromori, Kawasumi Ryotaro, Hirota Kouji	4. 巻 139
2. 論文標題 Pold4 subunit of replicative polymerase promotes fork slowing at broken templates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103688 ~ 103688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2024.103688	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 Hosen Md Bayejid, Kawasumi Ryotaro, Hirota Kouji	4. 巻 137
2. 論文標題 Dominant roles of BRCA1 in cellular tolerance to a chain-terminating nucleoside analog, alovudine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103668 ~ 103668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2024.103668	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 Ahmad Tasnim, Kawasumi Ryotaro, Taniguchi Tomoya, Abe Takuya, Terada Kazuhiro, Tsuda Masataka, Shimizu Naoto, Tsurimoto Toshiki, Takeda Shunichi, Hirota Kouji	4. 巻 51
2. 論文標題 The proofreading exonuclease of leading-strand DNA polymerase epsilon prevents replication fork collapse at broken template strands	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12288 ~ 12302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad999	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 Psakhye Ivan, Kawasumi Ryotaro, Abe Takuya, Hirota Kouji, Branzei Dana	4. 巻 30
2. 論文標題 PCNA recruits cohesin loader Scc2 to ensure sister chromatid cohesion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-023-01064-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 該当する

1. 著者名 Rahman Md. Ratul, Hirota Kouji, Kawasumi Ryotaro	4. 巻 5
2. 論文標題 Proofreading exonuclease activity of replicative polymerase epsilon promotes cellular tolerance to arabinosides in CTF18-dependent and -independent manner	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genome Instability & Disease	6. 最初と最後の頁 76 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s42764-024-00124-w	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川澄遼太郎
2. 発表標題 複製とコヒージョン形成の連動によるゲノム安定性の維持
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川澄遼太郎
2. 発表標題 DNA複製と連動した姉妹染色分体間接着形成メカニズム
3. 学会等名 第41回染色体ワークショップ・第22回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川澄遼太郎
2. 発表標題 DNA修復遺伝子ノックアウトパネルによる核酸アナログ遺伝毒性の評価
3. 学会等名 第11回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2024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	

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		
イタリア	IFOM分子腫瘍学研究所		