

DNA 修復機構におけるがん可塑性と発がん分子基盤解明

公益財団法人東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト

笹沼 博之

序論

ゲノム DNA は常に損傷を受けている。外的な要因の代表例としては、紫外線や自然放射線、タバコや飲酒が挙げられる。非常に多くの研究により、これらの外的因子が DNA に対してどのような損傷を発生させているかが明らかになっている。例えば放射線では、DNA のホスホジエステル結合を切断し、単鎖切断あるいは二重鎖切断を発生させる。また紫外線は切断するほどのエネルギーがなく、塩基間の架橋(特に隣り合うチミン)を発生させる⁴。しかし外的要因による DNA 損傷量に比べ、内的要因による DNA 損傷は、圧倒的に多い⁵。内的要因の例としては、加水分解による塩基損傷や脱落、また活性酸素種による塩基損傷が挙げられる⁵。近年、内因性の DNA 損傷因子として、アルデヒドが DNA 損傷を引き起こす可能性を示唆する報告がある。アルデヒドは反応性の高い化学物質であり、脱メチル化反応過程だけでなく、常在菌叢の代謝分泌物や飲酒などによる細胞内アルコール代謝でも生成する。これらのアルデヒドは、生体分子間を架橋し分子活性を損なわせるだけでなく、蛋白質-DNA 架橋では DNA 複製や転写反応を阻害するため、架橋された蛋白質が除去されない場合は、細胞生存に重篤な影響が出る。アルデヒドによる DNA 損傷は、放射線などによって発生するそれと比べ、生体分子間架橋反応に、より複雑な DNA 損傷を引き起こす。細胞は、DNA 損傷の種類に応じた修復経路を持っている。塩基除去修復では、二本鎖 DNA の塩基損傷部位を除去し、正常な鎖を鋳型として DNA 合成を行うことにより修復する経路である。ヌクレオチド除去修復では、紫外線によって発生した架橋塩基を含む数十塩基を除去し、正常な鎖を鋳型として DNA 合成を行う経路である¹⁴。塩基除去修復は、個体生存に必須であり遺伝性疾患は未だ見つかっていない。一方、ヌクレオチド除去修復では、現在までに 10 つの遺伝子変異が同定されており、紫外線過敏症、皮膚がん、神経疾患、早老症など病態は多岐にわたることが知られている。相同組換え経路は、放射線曝露により発生する DNA 二重鎖切断を修復する経路である。相同組換えは、大腸菌からヒトまで進化的に保存された修復経路であり、ヒトを含む哺乳類においては細胞と個体生存に必須である。相同組換えは、切断された二重鎖 DNA を、姉妹染色体を利用してコピーアンドペースト様式で修復する。相同組換えでは、二重鎖切断端が 5' からヌクレアーゼによる消化を受け約 1kb ほどの 3' 末端突出一本鎖 DNA ができる。一本鎖 DNA 上に Rad51 が結合する。Rad51 結合は姉妹染色体上の相同鎖を検索し、相同鎖を見つけると相同鎖と右巻きのヌクレオフィラメント構造を形成する。BRCA1 と BRCA2 は、Rad51 が相同鎖とのヌクレオフィラメント形成をするために必須である。BRCA1/2 欠損細胞では、Rad51 が DNA 二重鎖切断に結合できず、放射線曝露に反応した Rad51 foci が形成できない^{22,23}。相同組換え修復は、脊椎動物においては必須であり、BRCA1/2 欠損は細胞レベルで致死である。致死である理由は、細胞増殖に伴う内因性 DNA 損傷の修復に、相同組換えが重要な役割を果たしているからと言われている。BRCA1 および BRCA2 遺伝子は、乳癌の家族性に着目した研究により 1990 年代半ばに同定された。BRCA1 は 1994 年に三木義男博士らによって、BRCA2 は 1995 年に Wooster 博士らによって単離された。これらの遺伝子の生殖細胞系列変異は、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍の発症リスクを顕著に上昇させる。疫学研究によると、BRCA1/2 変異保因者の 80 歳までの乳がん累積発症リスクは約 70%に達し、非保因者の約 12.5%と比較して著しく高い。また、卵巣がん

のリスクも BRCA1 変異で約 30%、BRCA2 変異で 5-10%と上昇する。本研究の目的は、BRCA2 遺伝子変異と合成致死性を示す遺伝子変異の探索を行い、合成致死性を示すメカニズム解明を通して新しい治療戦略の確立を目指すことである。

結果

AIDシステムを用いたCRISPR/Cas9による遺伝学的スクリーニング(研究背景も含む)

AIDシステムは、内在性のユビキチンリガーゼSCF複合体が、植物ホルモンであるAuxin依存的に標的分子をユビキチン化し、プロテアーゼ分解を促進する方法である。ヒトB細胞株であるTK6細胞を使用し、まずBRCA2遺伝子座のAID配列を挿入した。次にSafe harbor遺伝子座であるAAVS1遺伝子座にCMVプロモーター制御下で発現するように設計された0sTIR遺伝子を挿入し、BRCA2^{AID}細胞を樹立した。BRCA2蛋白質がAuxin依存的に分解することを確かめた上で、スクリーニングを実施した。スクリーニングでは、ヒト約2万遺伝子それぞれに対して、5つのgRNAを設計したライブラリーを使用した。このライブラリーからレンチウイルスを作製し、BRCA2^{AID}細胞に感染させた。感染後、細胞集団を二つに分け、一つをAuxin処理、もう一つをAuxinなしで5日間培養した。Auxin存在下でBRCA2蛋白質分解により増殖率が低下したものを合成致死性遺伝子変異として検出した。FDR値を0.1に設定した場合に、71遺伝子が合成致死性遺伝子として同定できた。

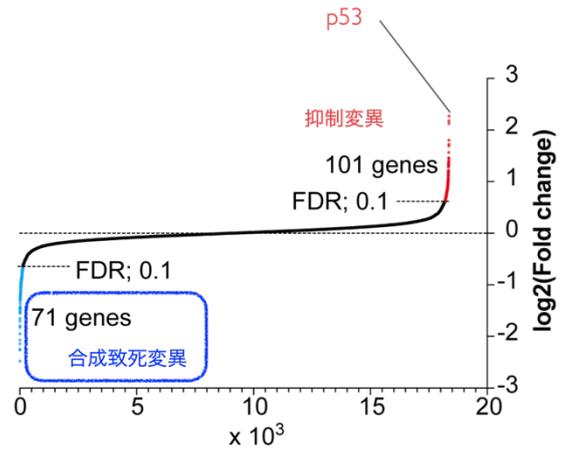


図1 スクリーニング結果
BRCA2^{AID}細胞を使い、BRCA2蛋白質分解細胞において、増殖率を低下させる遺伝子変異を71個同定した。一方で、抑制変異として、p53を含む101個を同定した。

BRCA2変異と合成致死性を示す修復経路とグルタチオン合成経路

合成致死性を示す遺伝子の機能を解析した結果、複数のDNA損傷修復経路とグルタチオン合成経路が含まれていることがわかった。このことは、BRCA2蛋白質分解によって、特定のDNA損傷が発生しているというよりは様々なDNA損傷、すなわちバルキーなDNA損傷が発生しているのではないかと考えた。細胞の中でバルキーなDNA損傷を発生させるものとして活性酸素種がある。そこでBRCA2蛋白質分解細胞におけるROS産生とそれによると思われるDNA損傷の検出を試みた。その結果、ヒトB細胞由来のTK6細胞において、BRCA2蛋白質分解に依存して、ROS産生量が増加していることがわかった。ROS産生の増加が、ヒトB細胞特異的な現象であるかどうかを調べるために、BRCA2に変異を持つ膵臓がん細胞株であるCAPAN1細胞で同様な実験を行った。野生型BRCA2遺伝子座を戻したCAPAN1細胞に比べ、CAPAN1細胞では、ROSシグナルがより強く検出された。このことから、BRCA2遺伝子の機能・発現減弱が細胞内ROS量を増加させていることがわかった。

BRCA2変異によって一本鎖DNA切断型DNA損傷量が增加する。

ROSは、DNAを損傷する。特に塩基を損傷することが知られている。塩基損傷は、塩基除去修復又はヌクレオチド除去修復経路によって修復される。これらの修復経路では、損傷塩基又は損傷塩基を含む数十塩基を取り除いた後で、DNA合成酵素がそのギャップを埋める。BRCA2変異によって

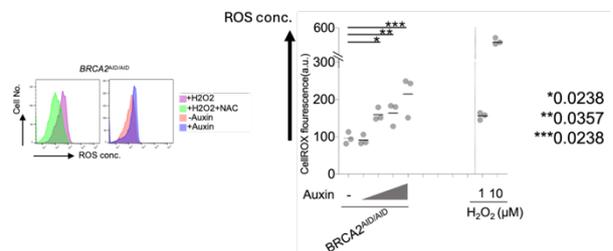


図2 BRCA2蛋白質分解TK6細胞におけるROS産生量の上昇
BRCA2^{AID}細胞に異なる濃度のAuxin処理を行い、ROSプローブを使ってROS産生量をFACSにより調べた。Auxin濃度依存的にROS産生量の増加が検出された。

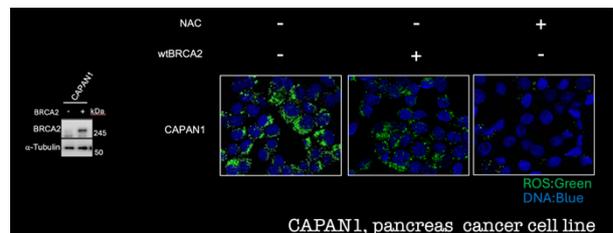


図2 CAPAN1(BRCA2変異膵臓がん由来)細胞におけるROS検出
CAPAN1細胞のROS産生量をROSプローブにより検出した。コントロール細胞として、野生型BRCA2を発現させたCAPAN1細胞、ROS除去剤であるNACを処理した細胞を示す。

増加したROSがDNA損傷を発生させているかを調べた。この目的のために、スロットブロット法による塩基損傷の検出とアルカリコメット法によるDNAギャップの検出をおこなった。スロットブロット法では、ROSによって発生する塩基損傷の中で代表的なものである、8-oxoguanine抗体により塩基損傷を検出した。BRCA2はBRCA1とPALB2と相互作用して、相同組換え修復を行うと考えられており、本解析ではBRCA2^{AID}だけでなく、BRCA1^{AID}とPALB2^{AID}細胞も併せて解析を行なった。その結果、Auxinによって標的蛋白質を分解すると8-oxoguanine損傷が増加すること、ギャップを持ったDNA鎖が増加することが分かった。ギャップDNAの増加は、Auxin処理後6時間で検出されていることから、ROS発生とDNA損傷がBRCA1/2, PALB2分解に伴い、比較的早くに引き起こされていることがわかった。

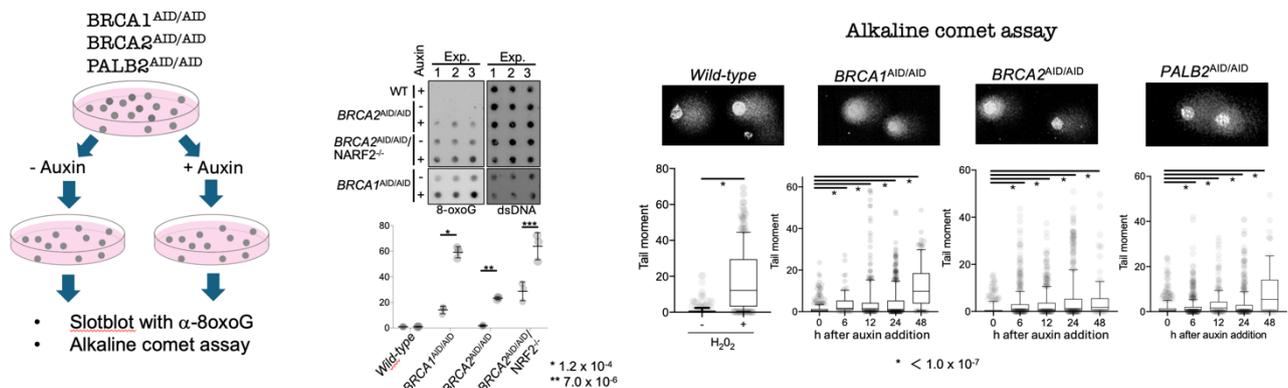


図2 BRCA1/2^{AID}, PALB2^{AID}細胞における8-oxoguanineとDNA損傷の検出
 実験方法(左)。Auxin処理をしたAID細胞からゲノムDNAを抽出し、DNAに含まれる塩基損傷(8-oxoguanine)を後退によって検出した(中央)。Auxin処理をしたAID細胞から細胞のDNA損傷を調べた。アルカリ条件で行なったコメットアッセイでは、二本鎖DNAは変性し、DNAギャップを検出できる。DNAギャップがあると電気泳動後に、コメットテールが発生し、このテールの長さを定量した。

考察

BRCA2蛋白質分解によってなぜROSが発生するかは不明であり、今後の研究を必要とする。ROSの多くは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化経路で発生する。仮説として、BRCA2蛋白質分解によって発生する異常なDNA代謝反応(偶発的なDNA損傷修復、DNA複製、遺伝子転写)に反応して、細胞はATP産生量を増加させている可能性がある。ATP産生は、解糖-TCA回路-酸化的リン酸化経路によって行われるが、余剰電子がROSを発生させることが知られている。今後の研究としては、BRCA2遺伝子変異の有無によるミトコンドリア活性の測定、さらにBRCA2変異のどのような異常を細胞が感知し、ミトコンドリアへそのシグナルを伝えているかを解析していきたいと考えている。