

ゲノムストレスが惹起する炎症応答の理解と制御法開発

慶應義塾大学薬学部 分子腫瘍薬学講座

柴田淳史

概要：

慢性炎症は様々な疾患発症に関わる。近年、慢性炎症状態にある細胞は、ゲノムストレスを引き起こすことが分かってきた。また一方で、ゲノムストレスが炎症性遺伝子を活性化することも明らかになりつつある。すなわち慢性炎症組織を細胞レベルで捉えた場合、細胞は炎症によりゲノムストレスを引き起こし、一方でゲノムストレスをきっかけに炎症性遺伝子を活性化するという、炎症の増悪化に向けた負のループを形成する。我々はこれまで、ゲノムストレスの修復応答を専門とし (Mol Cell 2014, Cell 2018, Cell Rep 2022)、近年はゲノムストレス由来のシグナル伝達を介した炎症・免疫調節機構を明らかにしてきた (Nat Comm 2017, Mol Cell 2022)。我々を含めた最新の基礎研究により、ゲノムストレス下では核外核酸センサーである cGAS/RIG-I を通じて、IL6 を中心とした多数の炎症遺伝子が活性化されることが明らかになっている (未発表データ)。しかしながら、ゲノムストレス後に活性化される複数の炎症性遺伝子が、どのように連動して発現制御されているか未だ多くが明らかになっていない。そこで本研究課題では、ゲノムストレスを起点とする炎症性遺伝子群の発現調節機構を解明し、炎症応答増悪化に対抗する制御方法の開発を目指して研究を行った。本研究で得られた知見は、がん化や老化、さらにはアレルギー性疾患や自己免疫性疾患など、慢性炎症に関わる様々な疾患の予防や治療法開発に繋がると考えている。

背景：

ゲノムストレスは、細胞の DNA に損傷を与え、さまざまな病理学的変化を引き起こす重要な要因である。DNA 損傷は突然変異の発生だけではなく、炎症応答を惹起する可能性が示唆されており、それらが慢性炎症を介した発がんに関わりうるというアイデアが生まれつつある。一方でがん治療においては、放射線治療によって誘発される DNA 損傷が炎症応答を惹起し、免疫チェックポイント阻害剤投与時には特に抗腫瘍免疫活性が優位となり、アブスコパル効果という放射線を当てていない部位の腫瘍縮小効果を発揮することがある。

ゲノムストレスが引き起こす炎症応答は、自然免疫応答に関わることが示唆されている。細胞に対して放射線や化学療法剤などによって DNA 損傷が発生すると、cGAS/STING 経路や RIG-I 経路などの核外核酸センサーが活性化され、免疫反応が誘導される。これにより、腫瘍微小環境内で免疫活性化が進み、インターフェロンなどの免疫シグナルが放出される。本研究課題では、放射線照射によって生じたゲノムストレスがどのような分子メカニズムを介して炎症応答へと繋がるのか、その分子機構の解明と制御法開発を目指して研究を行った。

結果：

cGAS/STING や RIG-I などによって認識され活性化される自然免疫応答は、核から細胞質に放出された核酸がその起点となることが報告されている¹。核外に放出される核酸の要因として、微小核由来の核酸、ミトコンドリア DNA、DNA 複製の停止異常、テロメア、転写に関連した R-loop など、様々な要因が提唱されている。特に、放射線照射の場合には、微小核に由来した核酸放出が大きく寄与すると考えられていることから、我々は DNA 損傷と微小核形成を中心に研究を展開させた。

微小核の形成には、DNA 修復や細胞周期チェックポイントとの関連が示されている。放射線照射により DNA 切断が発生した場合、特に G2 期の停止が¹うまくいかず、DSB を有したまま細胞分裂が進行すると、細胞分裂の過程で微小核が形成される。微小核が有する核膜は、48-72 時間程度で崩壊することから、核膜崩壊後に微小核内の核酸が細胞質へと放出され、結果として自然免疫応答を介したインターフェロン経路が活性化されると考えられている。

まず我々は、微小核の核膜崩壊と、核外核酸センサーである cGAS の局在を検討するため、超高解像度顕微鏡を使用して、微小核の詳細な可視化を行った。LaminB1 や EdU を使った染色により、DNA 損傷を受けた細胞の核膜は一部が損傷し、おそらく cGAS などの核外核酸センサーが流入しやすい状態になっていることが可視

化した。さらに、通常の蛍光顕微鏡を用いることで、LaminB1 が陰性の微小核では、明確な cGAS の流入が起きていることを可視化することに成功した。この結果から、LaminB1 および cGAS の共染色を行うことで、自然免疫応答を活性化しやすい細胞（微小核を有する細胞）を検出する実験系を確立した。

次に DNA 損傷修復機能の欠損と、炎症応答との関連性を調べるために、ヒト希少疾患患者由来の初代線維芽細胞を用いて、放射線照射後の微小核形成数と炎症遺伝子発現を検証した。本研究課題では、正常の初代線維芽細胞 (IBR3 細胞) および ATM 欠損 (AT1BR)、ATR 欠損 (F02-98)、MRE11 欠損 (ATLD2)、XLF 欠損 (P2)、Artemis 欠損 (CJ179)、BRCA2 欠損 (HSC62) の DNA 修復欠損細胞を用いた。これらの細胞に 2Gy の X 線を照射し、24、48、72、96 時間後の微小核形成を評価した結果、ATM、ATR、MRE11 が欠損した細胞では、正常細胞に比べて微小核の形成が著しく増加していた。一方で、XLF、Artemis、BRCA2 が欠損した細胞では、微小核形成の増加は観察されなかった。この結果は、ATM および ATR の活性喪失が G2/M チェックポイントの停止を妨げ、異常な細胞分裂を引き起こすことが原因であると考えられる。また、MRE11 欠損細胞では、ATM シグナル伝達の増幅が不十分であるため、ATM 欠損に類似した表現型を示すと推測される。次に、RNA シーケンス解析では、ATM、ATR、MRE11 が欠損した細胞において、炎症関連遺伝子およびインターフェロン誘導性遺伝子の発現が有意に上昇していた。経路解析により、RIG-I、MDA-5、IL6、IRF7、そして JAK/STAT 経路が活性化されていることが判明した。特に、ATM、ATR、MRE11 が欠損している細胞では、これらの経路が強く誘導されていた。さらに我々は、転写因子ベースの下流遺伝子発現マッピング (TDEM) 解析により、ATM 欠損条件では STAT1 経路が優位に活性化し、ATR 欠損条件では STAT3 経路の活性化が相対的に優勢であることが示唆された。これらの結果は、ATM、ATR、MRE11 の欠損がそれぞれ異なる経路で炎症応答を制御している可能性を示している。これらの結果を統合すると、ATM、ATR、MRE11 欠損は、IR 後の微小核形成を増加させ、cGAS/STING や RIG-I/MDA-5 経路を介した炎症応答を増強すると結論付けられる。本研究の知見は、放射線治療の感受性が高い患者を特定するための新たなバイオマーカーの開発に貢献すると考えている²。

次に、放射線治療中に重篤な炎症性副作用を呈した患者が、どのような分子機構を介して重篤な炎症応答を引き起こしたかを知るために、当該患者由来の放射線感受性線維芽細胞 (RS-Fs) を用いて、正常線維芽細胞 (NHDF) を比較検討を行った。RS-Fs は、放射線照射後、RS-Fs は NHDF に比べて微小核形成が顕著に増加していた。微小核は、G2/M チェックポイントが不完全である細胞が未修復の DNA 二本鎖切断を持つ状態で分裂を行う際に形成されることが確認された。RS-Fs では、IR 後に一時的な G2/M チェックポイント停止が観察されたものの、その後の再開が早期であり、G2/M チェックポイントの維持が不十分であることが示唆された。ATM および ATR シグナル経路の活性を調べたところ、ATM の自己リン酸化と下流標的である Chk2 のリン酸化は部分的に減少していた。一方で、G2/M 停止の維持に重要な ATR-Chk1 シグナル経路は大幅に低下していた。また、RS-Fs では DSB 修復における HR (相同組換え) の初期段階である DNA 末端の削り込みが低下しており、これに関連する BRCA1、RPA、RAD51 のフォーサイ形成が有意に減少していた。これにより、ATR-Chk1 経路の活性低下と G2/M チェックポイント維持の障害が微小核形成の増加に寄与していると考えられた。さらに我々は、RNA シーケンス解析を行うことで、RS-Fs において炎症関連遺伝子の発現が有意に増加していることを明らかにした。特に RIG-I、MDA-5、IRF7、IL6、JAK/STAT 経路が活性化されており、RS-Fs ではこれらの経路が異常な炎症応答を引き起こしていることが示唆された。一方で、cGAS や STING の発現レベルには有意な変化が見られなかった。これらの結果から、RS-Fs では G2/M チェックポイントの維持不全と ATR-Chk1 経路の低下が微小核形成および炎症応答の増強に関与していることが示された。本研究の知見は、放射線治療中の予期しない炎症性副作用を予測するバイオマーカー開発に寄与する可能性がある³。

さらに我々は、ヒト胆道がん腫瘍オルガノイドに対する放射線照射後の炎症応答の解析を行った。ヒト胆道がん腫瘍オルガノイドに放射線照射を行った結果、2 Gy 照射後 72 時間の時点で、オルガノイドの形態異常および炎症性遺伝子発現の増加が確認された。また、CD47 などの免疫抑制系の細胞膜表面リガンドが、放射線照射後に強く発現しており、胆道がんにおける応答性を反映した標的候補因子として着目し、現在解析を行っている (未発表)。

考察

本研究では、放射線照射により生じる DNA 損傷を起点として発生する炎症性応答の分子メカニズムを解明することを目的に、微小核形成と DNA 修復経路の関係性を中心に解析を行った。微小核形成は、核から細胞質に放出された核酸が自然免疫応答を活性化する起点として知られており、放射線照射後の炎症誘導において重要な役割を果たすとされる。本研究の結果は、微小核形成が DNA 修復機能の欠損や G2/M チェックポイントの維持不全により促進され、炎症関連経路を介して自然免疫応答を活性化することを示唆している。

特に、DNA 損傷シグナル伝達因子である ATM、ATR、MRE11 の欠損は、微小核形成の増加に大きく寄与していた。これらの因子は DNA 二本鎖切断の修復や G2/M チェックポイントの制御において中心的な役割を果たしており、これらの欠損がチェックポイントの維持不全を引き起こし、DSB を持つ細胞が分裂を継続することで微小核が形成されると考えられる。さらに、微小核が持つ核膜の脆弱性により、核酸が細胞質に放出され、cGAS/STING や RIG-I などの核外核酸センサー経路が活性化されることが確認された。これにより、インターフェロン経路や炎症関連遺伝子が誘導され、自然免疫応答が増強されると考えている。今後は遺伝学的解析

により、これらエビデンスの立証を目指したい。

放射線感受性線維芽細胞 (RS-Fs) の解析からは、ATR-Chk1 経路の低下が微小核形成を増加させる主因であることが示された。特に、DNA 末端の削り込みに関与する BRCA1 や RAD51 の活性低下が観察され、HR (相同組換え) の低下が G2/M チェックポイント維持不全と関連していることが示唆された。加えて、RNA シーケンス解析では、RIG-I、MDA-5、IRF7、IL6 などの炎症関連遺伝子および JAK/STAT 経路が RS-Fs において顕著に活性化されていることが明らかとなった。このことから、RS-Fs では DNA 修復障害が炎症応答を引き起こす主要な因子となっている可能性が示された。

一方で、cGAS や STING の発現に有意な変化が見られなかった点は興味深い結果である。cGAS/STING は遺伝子発現上昇として反応するわけではなく、細胞内の局在変化に依存していると考えられるが、一方で放射線誘発性炎症応答が必ずしも cGAS/STING 経路単独に依存するものではなく、RIG-I や MDA-5 などの他の核酸センサー経路が補完的な役割を果たしている可能性も考えられる。このように、本研究は、放射線治療における予期しない炎症性副作用の分子機構を明らかにするとともに、治療感受性の高い患者を特定するためのバイオマーカー開発に貢献する可能性を提示している。

今後は、ヒト臨床検体やオルガノイドモデルを用いた解析を通じて、DNA 修復経路の欠損と炎症応答の因果関係を詳細に解明することが重要である。また、得られた知見をもとに、G2/M チェックポイントの維持を標的とした新たな治療戦略を開発することで、放射線治療の安全性を向上させることが期待される。

引用文献

1. Chen, J., Harding, S.M., Natesan, R., Tian, L., Benci, J.L., Li, W., Minn, A.J., Asangani, I.A., and Greenberg, R.A. (2020). Cell Cycle Checkpoints Cooperate to Suppress DNA- and RNA-Associated Molecular Pattern Recognition and Anti-Tumor Immune Responses. *Cell Rep* 32, 108080. 10.1016/j.celrep.2020.108080.
2. Haruna, S., Okuda, K., Shibata, A., Isono, M., Tateno, K., Sato, H., Oike, T., Uchihara, Y., Kato, Y., and Shibata, A. (2024). Characterization of the signal transduction cascade for inflammatory gene expression in fibroblasts with ATM-ATR deficiencies after Ionizing radiation. *Radiother Oncol* 194, 110198. 10.1016/j.radonc.2024.110198.
3. Oike, T., Okuda, K., Haruna, S., Shibata, A., Hayashi, R., Isono, M., Tateno, K., Kubo, N., Uchiyama, A., Motegi, S.I., et al. (2024). Exacerbated Inflammatory Gene Expression After Impaired G2/M-Checkpoint Arrest in Fibroblasts Derived From a Patient Exhibiting Severe Adverse Effects. *Adv Radiat Oncol* 9, 101530. 10.1016/j.adro.2024.101530.