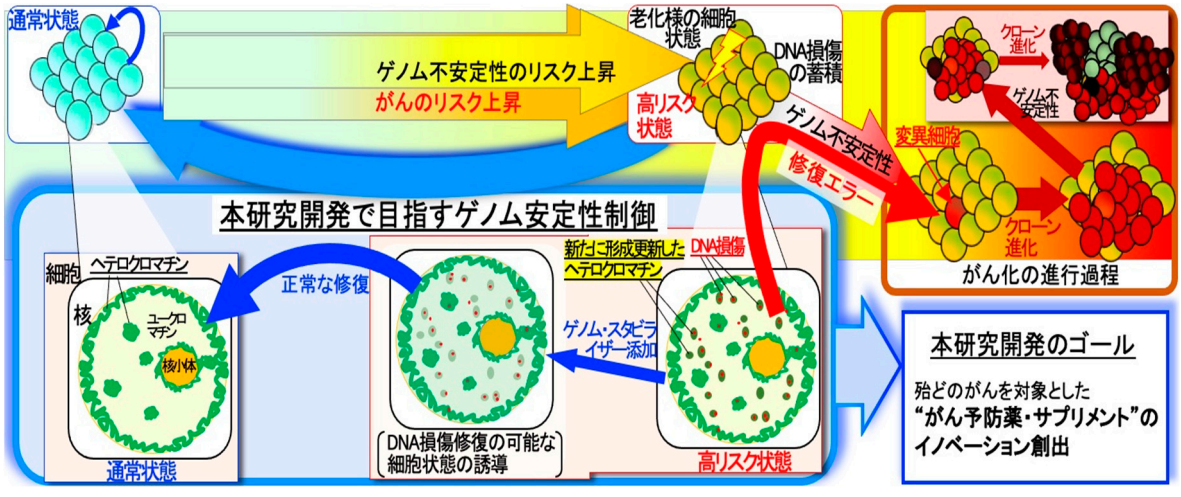
97　ゲノム安定性制御を作用点としたがん予防の研究	吉岡　研一

【目的】がん化過程は変異細胞のクローン進化によって進行し、このクローン進化が複数回誘導されて発がんに至ると考えられている。最近の我々の解析からは、このクローン進化には、ゲノム不安定性が引き金となることが示された。実際、殆どのがんは、ゲノム不安定性に伴って発症している。重要なことに、この知見からは、原理的に、『これらのがんは“ゲノム安定性が保持・制御”される限り抑制される』と考えられる。そこで本研究では、ゲノム安定性制御を作用点とした新規がん予防法の創出を目指し、そのための基礎概念の構築を目指す。
【方法】まず、ゲノム不安定性の高リスク状態を明確にすることを目指し、共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析によってクロマチン因子を解析した。ゲノム不安定性のリスク上昇の要因となる責任因子の特定を目指して、クロマチン状態変化に関わるクロマチン因子のノックアウト細胞を作製し、その影響解析によって責任因子を特定した。一方で、これまでに我々が“ゲノム安定性を促進する効果”を誘導することを見出した一部のポリフェノールをリード化合物と位置づけ、その抑制効果を解析した。さらに、『どの様にゲノム不安定性の高リスク状態が形成されているのか』、その状態変化への影響を解析した。
【結果】ゲノム不安定性の高リスク状態では、ヘテロクロマチンのフォーカス形成が亢進していることが見出された。本研究で、さらに、ヘテロクロマチン形成の亢進につき、これを制御するヒストンメチル基転移酵素 X の関与が明確になった。実際、ヘテロクロマチン領域は液-液相分離（LLPS）状態を形成し、相同組替え修復能が低下した領域であることが知られている。このため、ゲノム不安定性のリスクの高い状態が現れると考えられる。一方で、幾つかの低分子化合物の投与で、有意なゲノム安定性の促進効果（高リスク状態の抑制効果）が認められている。本研究で、これは、DNA 損傷の修復を誘導する効果と過剰なヘテロクロマチン形成の亢進を抑制する効果に伴って誘導されていることが示された。さらに、DNA 損傷修復とヘテロクロマチン抑制を指標とし、高リスク状態を抑制する成分のスクリーニング、その効果の最適化テストを行い、ヘテロクロマチン液-液相分離（HC-LLPS）抑制剤を作製し、この HC-LLPS 抑制剤の効果を解析したところ、実際に、有意な HC-LLPS の抑制効果、これに伴う DNA 損傷の修復誘導の効果が現れることが示された。さらに、次世代シーケンサーによる解析でも、その状態が“低リスク状態と同程度の状態”にまで戻っていることが認められた。現在、動物モデルでの影響解析、作用機序の解析が進行しており、最終的には、実際の“がん予防効果”に与える影響を明確にすることを目指す。

ゲノム不安定性リスクの高い状態の誘導と“ゲノム安定性制御”を作用点としたがん予防への挑戦の概念図



97. ゲノム安定性制御を作用点としたがん予防の研究

吉岡　研一

国立がん研究センター 研究所 ゲノム安定性制御研究ユニット

Key words：ゲノム不安定性，発がん，ゲノム安定性，がん予防，DNA 修復

緒　言

従来、がんは不運の疾患（ランダムに入る複製エラーが“特定の遺伝子”に入った場合に発症する疾患）で、がん予防は基本的に無理と信じられてきた。このため、がん研究は、主に、治療・診断を目的として実施されてきた。実際、がん予防研究は、疫学が中心で、分子機構に基づく予防研究は非常に限定的である。

がん化過程はクローン進化を介して進行し、ゲノム不安定性に伴って発症している。我々は、ゲノム不安定性の誘導機構とその影響を研究してきた。最近の我々の解析からは、『“新規形質を有する細胞のクローン進化”には、ゲノム不安定性に伴う不均一性（多様性）誘導が引き金となる』と考えられる［1〜3］。実際、『静止状態の MEF（マウス胎仔線維芽細胞）からは、ゲノム不安定性によって“増殖能を回復した細胞（ARF/p53 変異に伴う）”のクローン進化が誘導される』し、『放射線照射で生き残ったがん細胞では、ゲノム不安定性に伴って“放射線耐性細胞”のクローン進化が誘導される』［4〜6］。さらに我々は、『ゲノム不安定性のリスクは“老化様の表現系が現れた背景（DNA 損傷の蓄積に伴う）”で上昇すること、そのリスクは“放射線などの外的ストレス”で促進する』ことを見出している。重要なことに、この知見からは、『原理的に、ゲノム安定性が保持される限り、これらのがんの発症は防御される』と考えられる。実際、殆どのがんがゲノム不安定性を伴って発症していることから、この“ゲノム安定性保持”を作用点としたがん予防法では、殆どのがんが対象となると期待される。

がん細胞のゲノム不安定性では、様々な“高次の染色体構造の異常（ゲノム再編）”が認められる。これらのゲノム再編は“DNA 損傷の修復エラー”で生じるが、実際の殆どのがんでは、DNA 修復能に遺伝的な異常は見当たらない。このため、メカニズムを明確にするために“鍵となる疑問”は、『どの様な背景で“ゲノム不安定性リスクの高い状態”が誘導され、どの様に形成・制御されているのか？』という点である。これまでに我々は、『細胞が“老化様の表現系”を示す背景で、ゲノム不安定性のリスクが上昇している』ことを見出している。さらに、このリスク上昇には、この背景で誘導される“クロマチン状態の変化”が関係することが明確になってきた。

一方で、これまでの解析からは、一部のポリフェノールの投与によって“ゲノム安定性を促進する効果”が現れることを認めている［7］。そこで、これらのポリフェノールをリード化合物と位置づけ、本研究を実施する。特に、その作用点・作用機序を解析し、さらに、動物モデルでの効果を検証する。

方　法

1. 細胞培養と放射線照射によるゲノム不安定性の高リスク状態の誘導とその責任因子の解析

解析には、『以前、ゲノム不安定性の高リスク状態誘導を確認した“マウス胎仔線維芽細胞（MEF）”用いる』こととし、細胞培養は 3T3 法によって実施した［5］。初代培養から継代し、ゲノム不安定性の高リスク状態をその都度誘導し、解析を実施した。ゲノム不安定性の高リスク状態の誘導は、^{137}Cs の Gammacell 40 Exactor (Best Theratronics)を用いた放射線ばく露（1 Gy）による誘導法と、通常の 3T3 培養法で“老化様の表現系を伴

って現れる方法”による誘導法の、2 種類の方法を用いた。放射線ばく露による誘導法では、以前の解析で明確にした 24 時間後に現れる“ゲノム不安定性の高リスク状態”を指標として、照射前の状態との比較によって解析した。また、HC-LLPS 抑制剤の影響は、放射線照射の折に、培養液中に同時に投与することで実施した。

2. 免疫染色による細胞のイメージング解析

細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1%TritonX100/PBS によって透過処理し、0.3%TritonX100と2%ゴート血清を含むPBSでブロックした後に、一次抗体、二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。顕微鏡は、Olympus FV10i、Olympus FV3000, Leica SP8を用いた。このとき、抗体はγH2AX (9718, Cell Signaling Technology)、53BP1(PC712-100ULCN、Merck)などを用いた。

3. 次世代シーケンサー解析

ChIP-seq解析はCUT&RUNキット（Cell Signaling）のプロトコールに従ってサンプルを準備し、ATAC-seq解析はATAC-seq Kit（Active motif）のプロトコールに従ってサンプルを準備した。トランスクリプトーム解析には、RNAをキット（Qiagen）によって精製し、reverse transcriptaseを用いてfirst cDNAを作製し、サンプルを準備した。得られたDNAは、MinION Mk1C（オックスフォードナノポアテクノロジー社）によって解析した。

結　果

1. 細胞培養と放射線照射によるゲノム不安定性の高リスク状態の誘導

これまでの解析で、ゲノム不安定性の高リスク状態で、特定のクロマチン状態の形成が亢進していることが明確になった。そこで本研究では、まず、共焦点高解像顕微鏡による解析法により、高リスク状態のクロマチン状態の特徴を明確にすることを目指した。その結果、高リスク状態で、ヘテロクロマチン因子 HP1α のフォーカス形成が亢進しており、初期には多数のマイクロフォーカスとして現れることが分かった（図 1A）。さらに、ヘテロクロマチンはエピゲノム状態変化（ヒストン H3K9-3me）に伴って誘導されることから、この“ヘテロクロマチン形成の亢進”の責任因子を解析したところ、ヒストンメチル基転移酵素 X の関与が見出された。実際、この転移酵素 X のノックアウトにより、複製ストレスに伴うヘテロクロマチン形成は抑制され、この背景では、ゲノム不安定性マーカーの“微小核”の形成も抑制された（図 1B、C）。

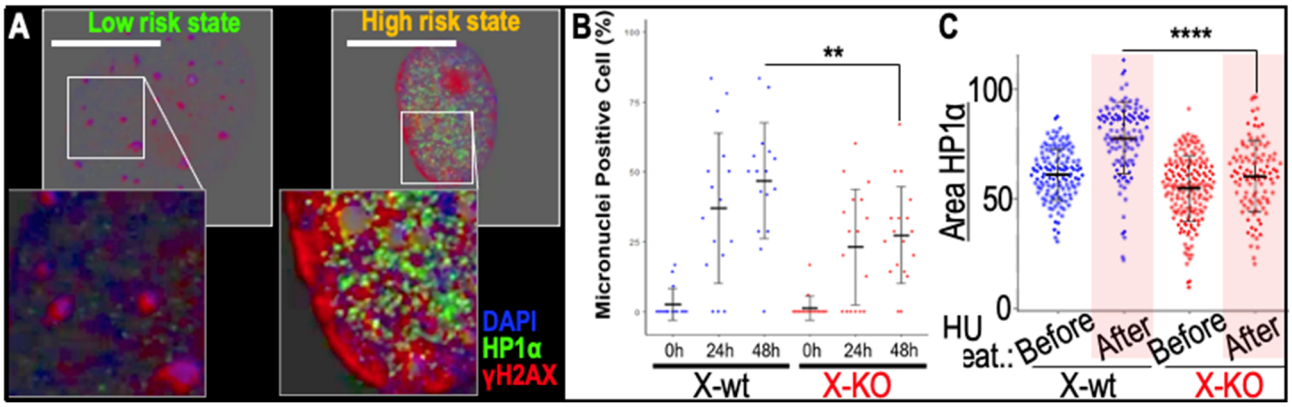


図1. ゲノム不安定性の高リスク状態におけるHP1α フォーカス形成の亢進

A） ゲノム不安定性の低リスク状態と高リスク状態でのHP1αおよびγH2AXのフォーカス形成レベルの比較。スケールバー：5μm。

B,C）ヒストンメチル基転移酵素Xのノックアウトに伴う微小核形成の抑制（B）とヘテロクロマチン形成の抑制（C）。**はP＜0.002、****はP＜0.0001。

2. HC-LLPS 抑制効果を示す成分の探索と HC-LLPS 抑制剤の構築

続いて、“ヘテロクロマチン因子 HP1α のフォーカス形成”を主な指標とし、図 2A のスキームに従って高リスク状態を抑制する物質を探索し、さらに、様々な濃度、複数の物質を混合することなどで、その効果を高めることを目指した。その結果、最終的に、高効率で、ヘテロクロマチンの形成亢進を抑制し、これに伴って DNA 損傷の蓄積を抑制する効果を示す“ヘテロクロマチン液-液相分離（HC-LLPS）抑制剤”を構築した（図 2）。実際、HC-LLPS 抑制剤の投与では、ヘテロクロマチン形成を抑制する効果をもたらすことが示された。そこで、以降の解析では、この“HC-LLPS 抑制剤”を用い、その効果を明確にすることを目指した。

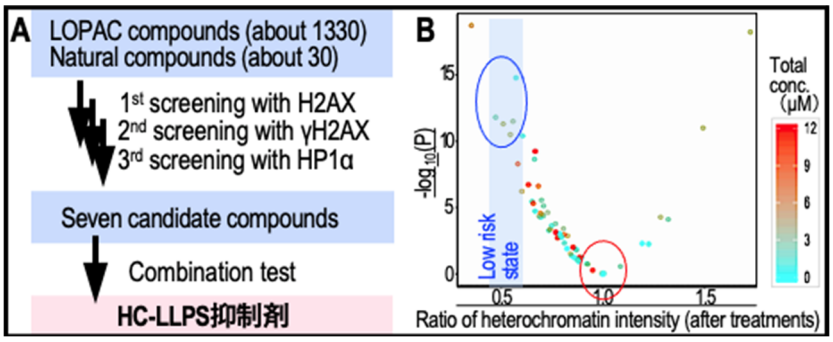


図2. 高リスク状態を抑制する成分の探索とHC-LLPS抑制剤の構築

A) 高リスク状態の誘導を抑制する物質のスクリーニング・スキーム。

B) A）のスクリーニング成分のコンビネーションの影響、高リスク状態の抑制効果のvolcano plot。グラフ内の赤丸は高リスク状態、青丸は低リスク状態に対応する領域を示す。

3. HC-LLPS 抑制剤の効果の解析

HC-LLPS 抑制剤の効果を明確にするため、まず、共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。その結果、『HP1α の形成が、HC-LLPS 抑制剤によって有意に抑制される』ことが明確になった（図 3）。また、これに伴って、『DNA 損傷のマーカーである γH2AX フォーカスの形成も有意に抑制される』ことが示された。

さらに、HC-LLPS 抑制剤の効果は、次世代シーケンサーを用いた解析（ChIP-seq 解析、ATAC-seq 解析、Transcriptome 解析）も実施した。その結果、共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析の結果と同様、高リスク状態の特徴が抑制され、低リスク状態の程度にまで抑えられていることが示された（図 4）。

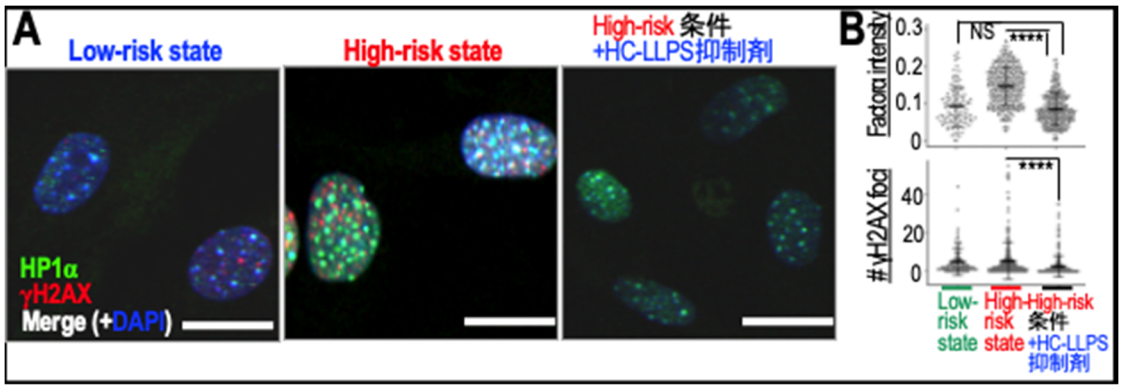


図3. HC-LLPS抑制剤によるゲノム安定性の保持効果の画像解析

A) ゲノム不安定性の高リスク状態で形成亢進するHP1α とDNA損傷マーカーであるγH2AXを共染色した。画像は代表的な染色像を示す。スケールバー：10μm。

B) A）のデータの定量解析。Two-tailed Welch's t testによる統計処理。****は P＜0.0001。NSは有意差なしを示す。

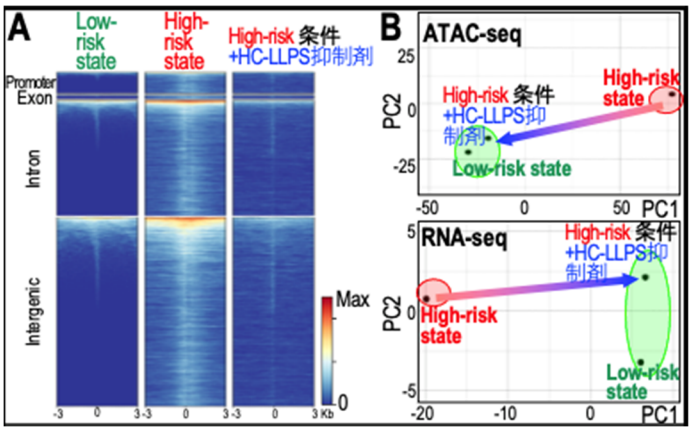


図4. HC-LLPS抑制剤によるゲノム安定性の保持効果のNGS解析

A）HP1αを対象としたChIP-Seq解析。

B）ATAC-seq解析（上段）とトランスクリプトーム解析（下段）の結果の、主成分解析による解析評価。

考　察

本研究では、ゲノム不安定性の高リスク状態で、クロマチン構造変化が誘導されること、さらに、その責任因子が明確になった。具体的には、DNA 複製ストレスに起因して誘導される“ヘテロクロマチン形成の亢進”に伴ってリスクが上昇していることが明確になり、さらに、このヘテロクロマチン形成に関わる“ヒストン H3K9-3me のメチル基転移酵素 X”が明確になった。実際、このメチル基転移酵素 X をノックアウトした場合、DNA 複製ストレスで誘導されるヘテロクロマチン形成は抑制され、さらに、これに伴って、ゲノム不安定性誘導も抑制されることが示された（“微小核の形成”をマーカーとしたゲノム不安定性誘導の解析）。以上のことは、『DNA 複製ストレスに応答したエピゲノム状態の変化、これに起因した“ヘテロクロマチン形成の亢進”に伴ってゲノム不安定性のリスクが上昇している』ことを示している。疑問なのは、『どうして“ヘテロクロマチン形成の亢進”に伴ってゲノム不安定性のリスクが上昇するのか？』という点である。恐らくこれは、『ヘテロクロマチン領域が、“液-液相分離（LLPS）状態を形成”し、これに伴って“相同組替え（HR）修復能が低下した領域”となっている』ことが影響していると考えられる。実際、HR 修復能の欠損は、“ゲノム不安定性に伴うがん”の主要なリスク要因である。重要なことに、このヘテロクロマチン形成の亢進に伴う“ゲノム不安定性リスク”の上昇は、背景に“修復因子群の変異が無い場合”でさえも認められた。実際、『多くのがんは、ゲノム不安定性に伴う発症にも関わらず、DNA 修復能に異常が認められない』ことを併せて鑑み、多くのがん場合で、本研究で認めた“DNA 複製ストレスに起因したヘテロクロマチン形成の亢進”が関与している可能性が考えられる。

ゲノム不安定性のリスク上昇に関わる“クロマチン状態”が明確になったことから、この“リスク状態の抑制”を指標とした“ゲノム安定性の促進に貢献する物質”の探索が可能になった。実際、本研究内で実施したスクリーニングでは複数の成分が特定され、さらに、構築された“HC-LLPS 抑制剤”は、優位にヘテロクロマチン領域を抑制し、DNA 損傷を抑制する効果を示した。この HC-LLPS 抑制剤によるリスク抑制に関わる効果は、次世代シーケンサーを用いた複数の解析からも確認された。これらの結果からは、『ゲノム不安定性のリスクは、HC-LLPS 抑制剤によって抑制が可能』と考えられる。しかし、現段階で、その分子レベルでの作用点・作用機序は不明である。一つの可能性として、『ヘテロクロマチン領域で形成される“LLPS”の相分離状態を形成している HP1α タンパク質の物性に対し、直接の影響している』との可能性が考えられる。これまでに最もよく研究されてきた LLPS は“水-油の間で認められる LLPS”である。『その“水-油の LLPS”は洗剤などによる界面活性作用によって混ざる』ことを鑑み、ヘテロクロマチン LLPS 形成の理由で“修復出来ない DNA 損傷（一部の修復因子がアクセ

ス出来ない損傷）”の場合でも、『界面活性作用に伴って分子間相互作用に対する障壁が抑制され、DNA 損傷修復が誘導される』との可能性が考えられる。これは、多くの既存薬とは全く異なる原理に基づく作用機序である。HC-LLPS 抑制剤の作用点・作用機序については、現在、その解析が進行中である。実際、最終的に構築した“HC-LLPS 抑制剤”は、異なる骨格構造を有する“３種成分の混合物”である。このため、実際にも、『その作用は、一般に“鍵と鍵穴”の関係で説明される分子標的阻害剤などの作用機序とは、全く異なっている』と予想される。

これまで長く、がんは不運の疾患で、がん予防は基本的に無理と信じられてきた。これは、『ランダムに入る複製過程の変異が、不運にも“がん化を促進する領域”に入った場合に発がんに至る』と考えられたためである。この背景の理由で、現在世界的に、主ながん予防対策は早期発見・治療を目的とした検診である。しかし、近年の複数の研究報告と最近の我々の解析知見からは、『殆どのがんは、原理的には、ゲノム不安定性に起因して誘導されているため、“ゲノム安定性の保持・制御”によって予防が可能』との可能性が考えられる。本研究で見出された我々の研究知見からは、『DNA 複製ストレスに起因して誘導される“ヘテロクロマチン形成の亢進”に伴ってリスクが上昇している』と考えられるため、“HC-LLPS 抑制剤”によって、そのリスクを抑制する効果が現れると期待される。しかし、HC-LLPS 抑制を作用点とした“がん予防の実現”には、今後、作用点・作用機序を明確にし、さらに、様々なマウスモデルを用いて、がん予防効果を検証する必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究は、上原記念生命科学財団から援助により実施されました。深く感謝申し上げます。

文　献

1） Yoshioka, K. and Matsuno, Y. Genomic Destabilization and its Associated Mutagenesis Increase with Senescence-Associated Phenotype Expression. **Cancer Science**, **112** (2021) 515–522. DOI: 10.1111/cas.14746.

2） Yoshioka, K., Matsuno, Y., Hyodo, M., and Fujimori, H. Genomic-destabilization-associated mutagenesis and clonal evolution of cells mutated in tumor-suppressor genes. **Cancers 11** (2019) 1643. doi:10.3390/cancers11111643.

3） Yoshioka, K., Kusumoto-Matsuo, R., Matsuno, Y., and Ishiai, M. Genomic Instability and Cancer Risk Associated with Erroneous DNA Repair. **Int. J. Mol. Sci.**, **22** (2021) 12254. https://doi.org/10.3390/ijms222212254

4） Matsuno, Y., Hyodo, M., Suzuki, M.,Tanaka, Y., Horikoshi, Y., Murakami, Y., Torigoe, H., Mano, H., Tashiro, S., and Yoshioka, K. Replication Stress-Associated DSBs Arisen by Ionizing Radiation Risk Genomic Destabilization and the Associated Clonal Evolution. **iScience**, **24** (2021) 102313. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102313.

5） Matsuno, Y., Atsumi, Y., Shimizu, A., Katayama, K., Fujimori, H., Hyodo, M., Nakatsu, Y., Kaneko, S., Hamamoto, R., Shimamura, T., Miyano, S., Tsuzuki, T., Hanaoka, F., and Yoshioka, K. Replication stress triggers microsatellite destabilization and hypermutation leading to clonal expansion in vitro. **Nature Communications**, **10** (2019) 3925. doi:10.1038/s41467-019-11760-2.

6） Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Shinohe, K., Shinohara, A., Takeda, S., Takagi, M., Takamatsu, N., Nakagama, H., Teraoka, H., and Yoshioka, K.* ATM and SIRT6/SNF2H mediate transient H2AX stabilization when DSBs form by blocking HUWE1 to allow efficient γH2AX foci formation. **Cell Reports**, **13** (2015) 2728-2740. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.054.

7) Matsuno, Y., Atsumi, Y., Alauddin, M., Rana, M.M., Fujimori, H., Hyodo, M., Shimizu, A., Ikuta, T., Tani, H., Torigoe, H., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Komai, M., Shirakawa, H., and Yoshioka, K. Resveratrol and its Related Polyphenols Contribute to the Maintenance of Genome Stability. **Scientific Reports**, **10** (2020) 5388. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62292-5.