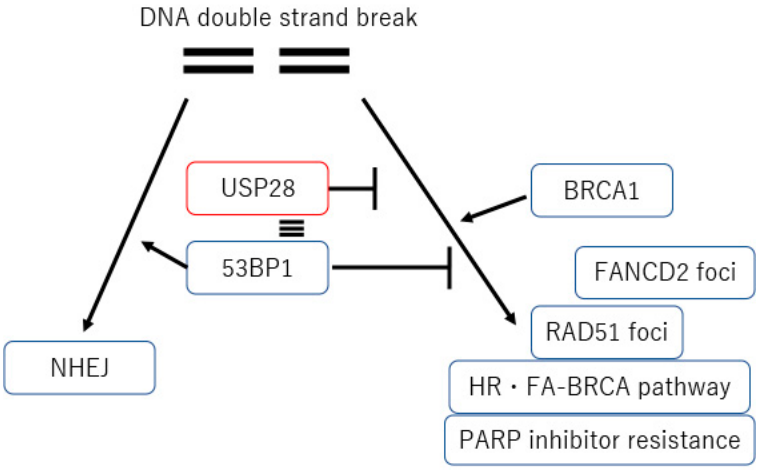
30　USP28によるファンコニ貧血BRCA経路の制御機序	谷口　俊恭

【目的】ファンコニ貧血 BRCA 経路（FA-BRCA pathway）および相同組換え（homologous recombination：HR）はがんの発症の抑制にも、抗がん剤感受性・耐性にも関わる重要な DNA 修復経路である。我々は脱ユビキチン化酵素である USP28 がこれらの DNA 修復経路を制御すると仮説した。本研究はこの仮説を検証し、USP28 による FA-BRCA pathway および HR の制御機序を明らかにすることを目的としている。

【方法】1. ヒト由来の培養細胞（U2OS 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 細胞など）において USP28 および 53BP1 を siRNA またはゲノム編集を用いて発現低下・欠損・変異させた細胞を用いた。これらの細胞に USP28 の様々な変異体を発現させて、それぞれの機能を調べた。放射線による DNA 損傷後の RAD51 foci 形成、FANCD2 foci 形成を評価した。また、DR-GFP reporter を用いて相同組換え（homologous recombination：HR）、EJ5-GFP reporter を用いて非相同末端連結（non-homologous endjoining：NHEJ）への影響を調べた。2. TCGA の卵巣がん登録症例（TCGA_OV）のデータを用いて USP28mRNA 発現の高低による予後の違いを評価した。

【結果】USP28 は FANCD2、RAD51 の DNA 損傷部位への集積を負に制御し、HR も負に制御する一方で、 NHEJ へは影響を与えなかった。BRCA1 欠損細胞は HR が低下しており PARP 阻害薬高感受性を呈するが、BRCA1 欠損細胞でさらに USP28 も抑制すると HR が回復し PARP 阻害薬に耐性になった。また、卵巣がんにおいて *USP28* mRNA 低発現群は高発現群に比べて予後が悪かった。USP28 は 53BP1 と相互作用することが知られていたが、USP28 と 53BP1 の相互作用に必要とされる 53BP1 の BRCT ドメインは USP28 による HR の抑制には重要ではなかった。USP28 には exon 19 にコードされている 32 amino acids（aa）からなる領域を alternative splicing のために欠く short form と、完全長の long form が存在するが、この 32 aa が USP28 による HR の抑制に必要であることがわかった。一方、USP28 の脱ユビキチン化酵素活性は HR の抑制には不必要であった。これらの結果から、USP28 が HR および FA-BRCA pathway を負に制御すること（概念図参照）が確認され、その機序の一端が明らかになった。

概念図 USP28 は相同組換えと FA-BRCA pathway を負に制御する



30. USP28 によるファンコニ貧血 BRCA 経路の制御機序

谷口　俊恭

東海大学 医学部 医学科 基礎医学系 分子生命科学

Key words：DNA 修復，相同組換え，PARP 阻害剤，USP28，ファンコニ貧血

緒　言

DNA は様々な原因により損傷を受けるが、DNA 修復メカニズムが備わっているため通常は即座に DNA 損傷は修復される。しかし DNA 修復に異常があると、損傷が修復しきれずに細胞死が起きたり、不正確な修復の結果として変異が蓄積しがん化が促進されたりしうる。一方、DNA 修復異常のあるがん細胞は DNA 損傷を起こす抗がん剤に高感受性を呈する。このように DNA 修復はがんの発症・治療の双方に関わるため、DNA 修復メカニズムの解明は重要な課題である。

ファンコニ貧血 BRCA 経路（Fanconi anemia（FA）-BRCA pathway）および相同組換え（homologous recombination：HR）はがんを考える上で重要な DNA 修復経路である。我々は遺伝性疾患ファンコニ貧血（FA）の原因蛋白（遺伝性乳がん卵巣がん症候群原因蛋白 BRCA1/FANCS、BRCA2/FANCD1、その他の FA 蛋白（FANCD2 など）を含む）が共同して DNA 鎖間架橋修復を制御する FA-BRCA pathway として働くことを提唱してきた［1］。この pathway は DNA 鎖間架橋の認識、架橋周囲の DNA 切断、損傷乗り越え DNA 合成、相同組換えが関わる複雑なプロセスである。また我々はこの pathway がプラチナ製剤、poly（ADP-ribose）polymerase（PARP）阻害薬などに対する腫瘍細胞の耐性・感受性を決める重要な因子であること、特に BRCA1/2 変異腫瘍においては BRCA1/2 の復帰変異による機能回復が臨床的に重要なプラチナ製剤・PARP 阻害薬共通の耐性獲得メカニズムであることを見出し、さらに FA-BRCA pathway を阻害すると腫瘍細胞をプラチナ感受性にできることも示した［2］。しかし、我々のこの pathway の制御機序の理解は不完全である。そこで FA-BRCA pathway の新規制御因子を同定するために、FANCD2 の DNA 損傷部位への集積を負に制御する因子を探索する siRNA library screening を行い、脱ユビキチン化酵素 USP28 を同定した（unpublished）。USP28 は、非相同末端連結（non-homologous endjoining：NHEJ）を正に制御する 53BP1 と相互作用することが知られていた［3］。我々は「USP28 は FA-BRCA pathway および HR を制御する」と仮説し、本研究ではこの仮説を検証し、USP28 による FA-BRCA pathway および HR の制御機序を明らかにすることを目的とした。FA-BRCA pathway と HR ががんの臨床で広く使われているプラチナ製剤（シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン）及び、乳がん・卵巣がん・膵がん・前立腺がんに使用されている PARP 阻害薬の耐性・感受性を決める重要な pathway であること［4］を鑑みると、USP28 によるこれらの制御機序を明らかにすることは、がん臨床への応用が期待される重要なテーマである。

この研究により、我々は以下の結果を得た。USP28 は FANCD2、RAD51 の DNA 損傷部位への集積を負に制御し、さらに HR も負に制御する一方で、NHEJ へは影響を与えなかった。BRCA1 欠損細胞は HR が低下しており PARP 阻害薬高感受性を呈するが、BRCA1 欠損細胞で USP28 を抑制すると HR が回復し PARP 阻害薬に耐性になった。また、卵巣がんにおいて USP28 mRNA 低発現群は高発現群に比べて予後が悪かった。USP28 は 53BP1 と相互作用することが知られていたが［3］、USP28 と 53BP1 の相互作用に必要な 53BP1 の BRCT ドメイン［5］は USP28 による HR の抑制には重要ではなかった。USP28 には exon 19 にコードされている 32 amino acids（aa）からなる領域を alternative splicing のために欠く short form と、完全長の long form が存在するが、この 32 aa が USP28 による HR の抑制に必要であることがわかった。一方、USP28 の脱ユビキチン化酵素活性は HR の抑制には不必要であった。

この結果から、USP28 は HR および FA-BRCA pathway を抑制すること、特に BRCA1 欠損細胞において USP28

が欠損・発現低下すると HR が回復し、PARP 阻害剤耐性を引き起こしうること、また卵巣がんにおいては USP28 発現が予後因子になりうることが示唆され、USP28 が HR および FA-BRCA pathway を負に制御する機序の一端が明らかになった。

方　法

1. 使用した細胞

ヒト由来の培養細胞（U2OS 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 細胞など）などにおいて USP28 および 53BP1 などを siRNA またはゲノム編集を用いて発現低下・欠損・変異させた細胞を用いた。

2. USP28 の機能評価

上記の細胞に USP28 の様々な変異体を発現させて、それぞれの機能を評価した。放射線などによる DNA 損傷後の RAD51 foci 形成、FANCD2 foci 形成を評価した。また、DR-GFP reporter を用いて HR、EJ5-GFP reporter を用いて NHEJ を評価した。

3. USP28 発現の臨床的意義の評価

TCGA の卵巣がん登録症例（TCGA_OV）のデータを用いて USP28 mRNA 発現の高低による予後の違いを評価した。

結果および考察

1. USP28 欠損細胞において RAD51、FANCD2 の foci 形成は促進される

DNA 損傷後の FANCD2、RAD51 の foci 形成は FA-BRCA pathway および HR の活性化の指標として使われる。U2OS 細胞において siRNA を用いて USP28 を deplete し、放射線 10 Gy 照射後に FANCD2、RAD51 の foci 形成を調べたところ、control に比べて FANCD2、RAD51 の foci 形成が促進していた（図 1）。このことから、USP28 が FA-BRCA pathway、HR を抑制することが示唆された。

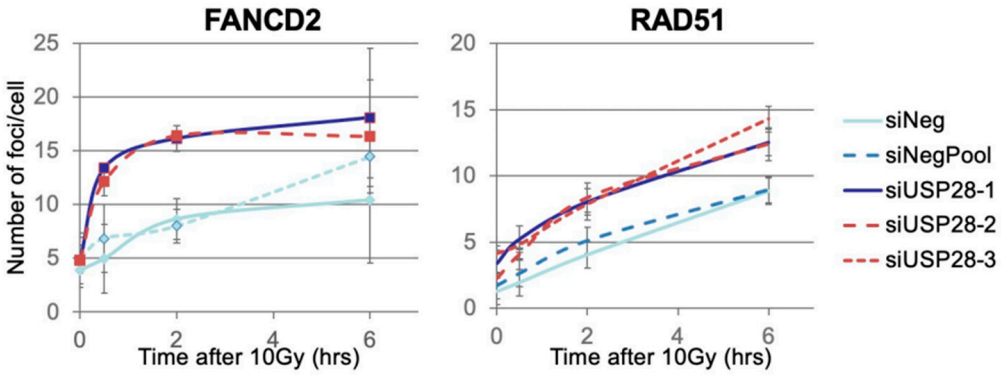


図 1. USP28 欠損細胞では RAD51、FANCD2 foci 形成が促進している
U2OS 細胞において siRNA を用いて USP28 を deplete し、放射線照射前、10 Gy 照射 30 分後、2 時間後、6 時間後の FANCD2 と RAD51 の foci 形成を蛍光免疫細胞染色で調べ定量した。USP28 を deplete した細胞では control に比べて照射後の FANCD2、RAD51 の foci 形成が促進していた。

2. USP28 は相同組換え（homologous recombination：HR）を抑制する

USP28 の HR に対する影響を直接調べるために、HR が起きると GFP が発現する DR-GFP レポーター（図 2）を組み込んだ U2OS 細胞において siRNA で USP28 を deplete し、HR 効率を調べた。USP28 を deplete した細胞では control よりも HR 効率は上昇しており（図 2）、USP28 が HR を抑制することが示された。一方、USP28 の NHEJ に対する影響を調べるために、EJ5-GFP レポーターを組み込んだ U2OS 細胞において siRNA で USP28 を deplete し、NHEJ 効率を調べたが、有意な影響は見られなかった（図 3）。

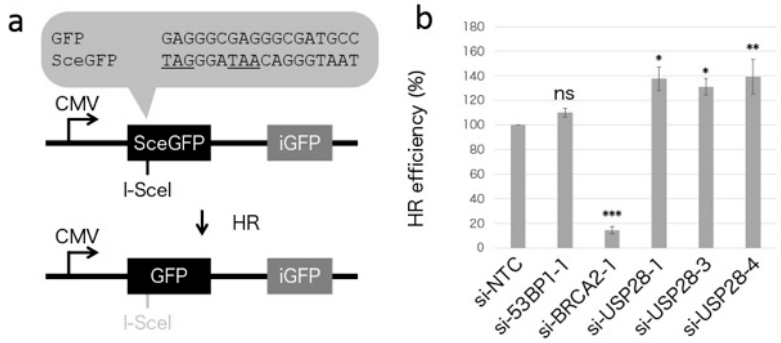


図 2. USP28 欠損細胞では HR 効率が上昇する

a) DR-GFP レポーター。I-SceI で切断された *SceGFP* 遺伝子が HR で修復されると GFP が発現する。GFP 陽性細胞を定量することで HR 効率を調べられる。

b) DR-GFP レポーターを組み込んだ U2OS 細胞において USP28 を deplete し、HR を定量した。USP28 deplete 細胞では HR が上昇していた（mean±SEM、n＝4、one-way ANOVA（Dunnett's）、*** p＜0.001、** p＜0.01、* p＜0.05）。

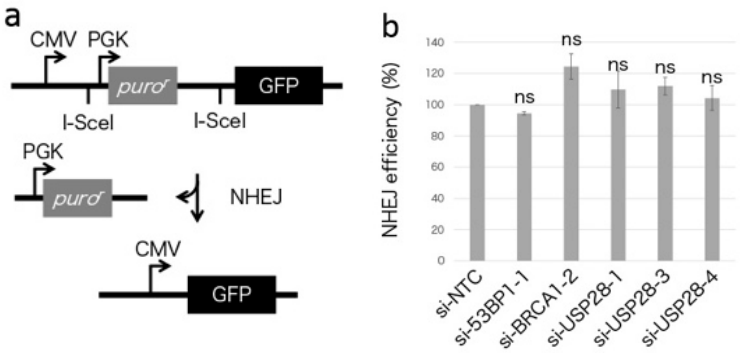


図 3. USP28 欠損は NHEJ 効率に影響を与えない

a) EJ5 レポーター。I-SceI で切断されたレポーターが NHEJ で修復されると GFP が発現する。GFP 陽性細胞を定量すると NHEJ 効率を調べられる。

b) EJ5 レポーターを組み込んだ U2OS 細胞で USP28 を deplete し NHEJ 効率を定量した。（mean±SEM、n＝3、one-way ANOVA（Dunnett's）、ns：not significant）。

BRCA1 欠損細胞では HR が低下することが知られているが、その細胞で USP28 を欠損させると HR が回復する可能性があると推測し検証した。U2OS 細胞において BRCA1 と同時に USP28 も siRNA で deplete し、放射線照射後の RAD51 foci 形成（HR の指標）を定量した（図 4）。BRCA1 単独を deplete すると RAD51 foci 陽性細胞の割合は低下するが、さらに USP28 も deplete すると RAD51 foci 陽性細胞の割合は回復することがわかった（図 4）。これは BRCA1 欠損細胞の HR が USP28 欠損によって回復することを示唆する。

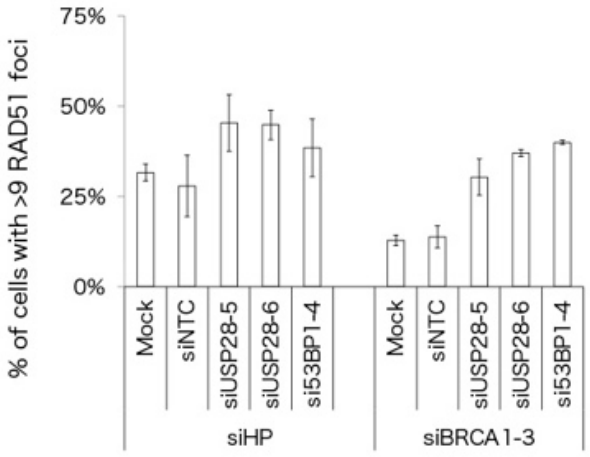


図 4. USP28 欠損は BRCA1 欠損細胞の HR 効率を回復させる
U2OS 細胞で USP28、BRCA1 を deplete し、放射線照射後の RAD51 foci を定量した。BRCA1 単独を deplete すると RAD51 foci 陽性細胞の割合が低下するが、USP28 も同時に deplete すると、RAD51 foci 陽性細胞の割合が回復する。

BRCA1 欠損細胞のように HR が低下しているがん細胞は PARP 阻害薬高感受性を呈することが知られており、臨床応用されている［4］。しかし PARP 阻害薬に対する耐性をがん細胞が獲得することが臨床上、大きな問題である［4］。そこで、「BRCA1 欠損細胞において USP28 の発現低下がおきると PARP 阻害薬に対する耐性を生じる」と仮説して、PARP 阻害薬に対する感受性を調べた（図 5）。その結果、BRCA1 を deplete した細胞は PARP 阻害薬を感受するが、さらに USP28 も deplete すると PARP 阻害薬に対する耐性を呈することがわかった（図 5）。

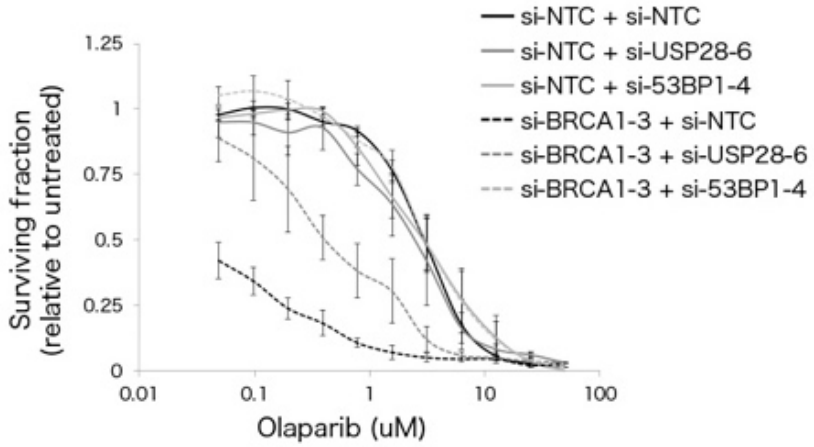


図 5. USP28 欠損は BRCA1 欠損細胞を PARP 阻害薬に耐性にする
HeLa 細胞で USP28BRCA1 を deplete し、PARP 阻害薬（Olaparib）に対する感受性を crystal violet assay で調べた。BRCA1 を deplete した細胞は PARP 阻害薬高感受性を呈するが、さらに USP28 も deplete すると PARP 阻害薬に耐性になった。

卵巣がん治療には PARP 阻害薬やプラチナ製剤が使われることから、USP28 mRNA 発現が卵巣がんの予後因子になるかを検証した。TCGA の卵巣がんデータセット（TCGA_OV（ovarian cancer））を用いて USP28 mRNA 高発現群と低発現群の全生存率をプロットした（図 6）。予想通り、USP28 mRNA 低発現群は高発現群に比べて予後が悪かった。

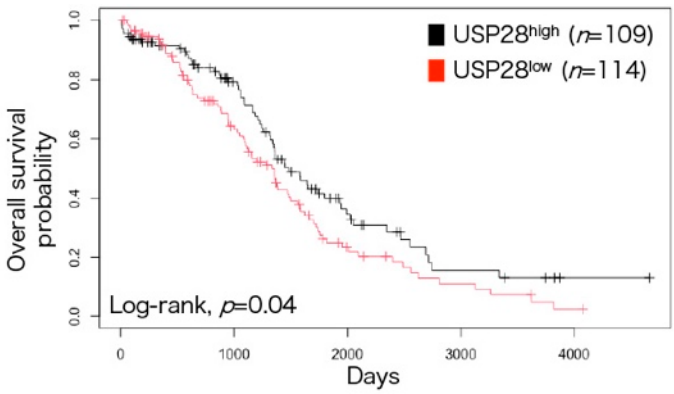


図 6. 卵巣がんにおける *USP28* mRNA 発現と予後の関係
TCGA データベース(TCGA_OV)に登録されている卵巣がん症例のうち *USP28* mRNA の expression z-score が−0.5 未満のものを低発現群、0.5 を超えるものを高発現群として全生存率の Kaplan-Meier curve を作成した。(Log-rank、p=0.04)

3. USP28 による HR 抑制機序の検討

USP28 と 53BP1 の結合には 53BP1 タンパクの BRCT ドメインが必要である [5]。USP28 の HR 抑制にも USP28 と 53BP1 BRCT ドメインとの結合が必要かを検証した。MCF-7 細胞にゲノム編集を行って作製した BRCT ドメインを欠く 53BP1 のみを発現する細胞（ΔBRCT)、および 53BP1 を全て欠損する細胞（53BP1Δ）[6] を使い、USP28 depletion の放射線照射後 RAD51 foci 形成への影響を調べた（図 7)。BRCT ドメインを欠く 53BP1 を発現する細胞（ΔBRCT）でも正常の細胞と同様に、USP28 を deplete すると RAD51 foci 形成が促進された。53BP1 を全欠損する細胞（53BP1Δ）では USP28 depletion の有無に関わらず、RAD51 foci 形成が促進されていた。これは USP28, 53BP1 はいずれも HR の抑制に関わるが、HR の抑制には USP28-53BP1 BRCT ドメイン間の結合は必要ないことを示唆する。

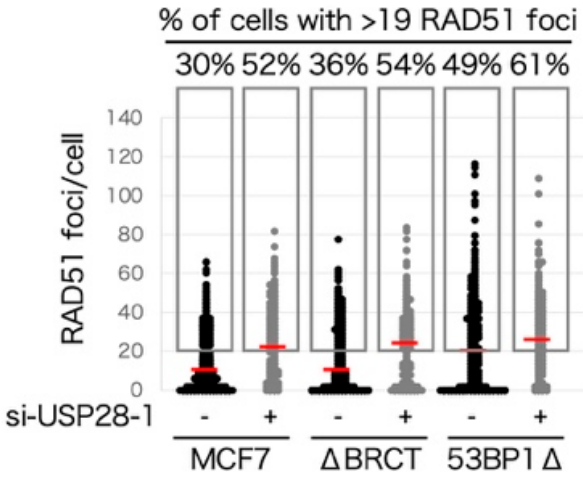


図 7. HR の抑制には USP28-53BP1 BRCT ドメイン間の結合は必要ない
BRCT ドメインを欠く 53BP1 のみを発現する細胞（ΔBRCT)、および 53BP1 を全て欠損する細胞（53BP1Δ）を使い、USP28 depletion の放射線照射後 RAD51 foci 形成への影響を調べた。ΔBRCT では USP28 を deplete すると RAD51 foci 形成が促進された。53BP1Δ では USP28 depletion の有無に関わらず、RAD51 foci 形成が促進された。

USP28 の脱ユビキチン化酵素活性には 171 番目のシステイン残基（C171）が必須である［3］。C171 をアラニンに変えた変異体 C171A は脱ユビキチン化酵素活性がない。USP28 には exon 19 にコードされている 32 aa からなる領域を alternative splicing のために欠く short form（S）と、完全長の long form（L）が存在する。USP28 を deplete した細胞に C171A 変異体、32 aa を欠く short form、完全長の long form を発現させ、放射線照射後の RAD51 foci 形成への影響を調べた（図 8）。C171A 変異体は RAD51 foci 形成を抑制したが、32 aa を欠く short form（S）は抑制しなかった。これは、USP28 による HR 抑制には exon19 のコードする 32 aa が必要であるが、USP28 の脱ユビキチン化酵素活性は必要ではないことを示唆する。

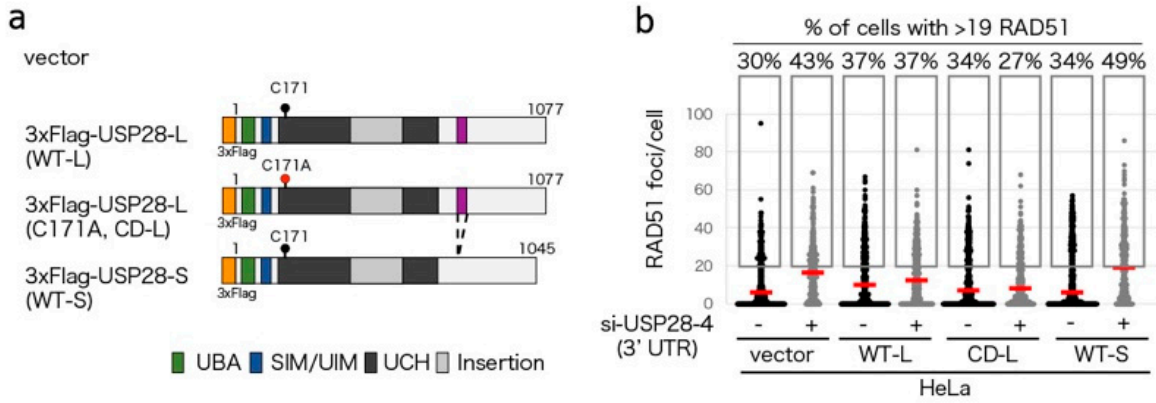


図 8. HR 抑制には USP28 の exon19 で code される 32 aa が必要である

a）実験に用いた USP28 コンストラクトの模式図。

b）細胞に様々な USP28 変異体を発現させ、内在性の USP28 を deplete した細胞を用いて放射線照射後の RAD51 foci 形成を定量した。Exon19 がコードする 32 aa を欠く isoform（WT-S）は RAD51 foci 形成を抑制しなかったが、脱ユビキチン化酵素活性を欠く C171A 変異体（CD-L）は RAD51 foci 形成を抑制した。

これらの結果から、USP28 は相同組換え（HR）を抑制すること、特に BRCA1 欠損細胞において USP28 が欠損・発現低下すると HR が回復し、PARP 阻害剤耐性を引き起こしうること、また卵巣がんにおいては USP28 発現が予後因子になりうることが示唆された。また USP28 が HR および FA-BRCA pathway を制御する機序の一端が明らかになった。今後は、USP28 による HR および FA-BRCA pathway 抑制メカニズムのさらに詳細な解析と臨床的意義の検討を行いたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東海大学医学部基礎医学系分子生命科学谷口研究室（現所属：筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構の史蕭逸研究室）の山崎寛之博士、Fred Hutchinson Cancer Research Center, Divisions of Human Biology and Public Health Sciences, Taniguchi Lab の Celine Jacquemont 博士である。

文　献

1） Cheung RS, Taniguchi T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. Int J Hematol. 2017 Sep;106(3):335-344. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28631178 PMCID: PMC5904331 DOI: 10.1007/s12185-017-2283-4

2) Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. Nature. 2008 Feb 28;451(7182):1116-20. Epub 2008 Feb 10. PMID: 18264087 PMCID: PMC2577037 DOI: 10.1038/nature06633
3) Zhang D, Zaugg K, Mak TW, Elledge SJ. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. Cell. 2006 Aug 11;126(3):529-42. PMID: 16901786 DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.039
4) Dhillon KK, Bajrami I, Taniguchi T, Lord CJ. Synthetic lethality: the road to novel therapies for breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2016 Oct;23(10):T39-55. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27528623 DOI: 10.1530/ERC-16-0228
5) Knobel PA, Belotserkovskaya R, Galanty Y, Schmidt CK, Jackson SP, Stracker TH. USP28 is recruited to sites of DNA damage by the tandem BRCT domains of 53BP1 but plays a minor role in double-strand break metabolism. Mol Cell Biol. 2014 Jun;34(11):2062-74. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24687851 PMCID: PMC4019063 DOI: 10.1128/MCB.00197-14
6) Cuella-Martin R, Oliveira C, Lockstone HE, Snellenberg S, Grolmusova N, Chapman JR. 53BP1 integrates DNA repair and p53-dependent cell fate decisions via distinct mechanisms. Mol Cell. 2016 Oct 6;64(1):51-64. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27546791 PMCID: PMC5065530 DOI: 10.1016/j.molcel.2016.08.002