

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

福田 貴代

専攻分野：応用分子腫瘍学

コース：

指導教授：太田 智彦

主論文の題目：

Class I Histone Deacetylase Inhibitors Inhibit the Retention of BRCA1 and 53BP1 at the Site of DNA Damage.

(クラス I HDAC 阻害剤は BRCA1 および 53BP1 の DNA 損傷部位への集積を阻害する)

共著者：

Wenwen Wu, Maiko Okada, Ichiro Maeda, Yasuyuki Kojima, Ryosuke Hayami, Yasuo Miyoshi, Ko-ichiro Tsugawa, Tomohiko Ohta

緒言

DNA 二本鎖損傷修復において BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) は相同組換え修復、53BP1 は非相同末端再結合をそれぞれ促進し、拮抗して両経路を制御している。53BP1 の損傷局所への集積には、ヒストン H4 Lys20 のジメチル化 (H4K20me2) と 53BP1 の結合が必須であり、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 TSA は、H4 をアセチル化 (H4ac) し、53BP1 の集積を抑制することが知られている。一方我々は、BRCA1 の損傷局所への集積には、BRCA1 と二量体を形成する BARD1 が HP1 を介してヒストン H3Lys9 のジメチル化 (H3K9me2) と結合することが必須であること、さらに、H3K9 特異的ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ (HKMT) 阻害剤 UNC0638 がこれを阻害することを明らかにした (Cancer Res. 2015 75:1311-21)。

HDAC 阻害薬は、ヒストンのアセチル化レベルを増加させ、クロマチン構造を変化させるが、H4に加え、H3K9にも作用する可能性がある。そこで今回我々は Class I HDAC 阻害剤で乳癌治療薬としても期待されている MS-275 と FK228 が、ヒストン修飾の変化を介して BRCA1 および 53BP1 の損傷局所への集積と相同組換え修復に与える影響を解析した。

方法・対象

①U2OS、HCT116、MCF-7 および HeLa 細胞は 10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地にて培養した。②HDAC 阻害薬である MS-275 と FK228 および HKMT 阻害剤 UNC0638 を培養液に添加し、DNA 損傷修復関連蛋白質の発現レベルとヒストン修飾をウェスタンブロットにて解析した。③放射線照射（10Gy）1 時間後の DNA 損傷部位への蛋白質の集積は、 γ H2AX を DNA 損傷の指標として蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。④DNA 相同組換え効率は DR-GFP レポーターをゲノムに導入した HeLa 細胞を用いて、gene conversion assay にて解析した。⑤HDAC 阻害剤の存在下または非存在下において PARP 阻害剤 olaparib を 24 時間暴露させた際の薬剤濃度依存的な殺細胞効果を clonogenic survival assay にて解析した。統計は SPSSVer. 17 を用い、両側 t 検定を行った。危険率 5%以下を有意とみなした。

結果

①HDAC 阻害薬によるヒストン修飾の変化：U2OS 細胞を用いて行った経時的分析では、MS-275 および FK228 は 24 時間で H3K9me2 を減少させ、H3K9Ac を亢進させた。濃度依存的な変化を解析したところ、MS-275 は 2.5 μ M, FK228 は 2.5 nM で DNA 修復因子である BRCA1、BARD、Rad51、53BP1 の発現レベルには影響を与えることなく顕著にヒストン修飾の変化をもたらすことがわかった。HKMT 阻害剤 UNC0638 が H3K9ac および H4ac に影響を与えないまま、H3K9me2 を選択的に抑制するのに対して、HDAC 阻害剤は H3K9ac と H4ac を亢進させて H3K9me2 を抑制した。これ

らの HDAC 阻害剤の効果は、MCF-7 細胞で再現性があることを確認した。BRCA2、ATM および RIF1 の発現レベルも FK228、MS-275 および UNC0638 によって影響を受けないことを RT-PCR で確認した。

②DNA 損傷部位へ修復因子の集積：修復因子としては BRCA1 と 53BP1 に加え、相同組換え修復に必須で BRCA1 とヘテロダイマーを形成する BARD1 と、非相同末端再結合において 53BP1 の下流で働く RIF1 を解析した。放射線照射による DNA 損傷部位への BRCA1 集積陽性細胞の率はコントロールに比較して MS-275、FK228 および UNC0638 では顕著に抑制された。(DMSO 66.9%, MS-275 7.5%, FK228 32.9%, UNC0638 7.4%) 同様に BARD1 の集積も全ての阻害剤で抑制された。(DMSO 80.8%, MS-275 22%, FK228 18.2%, UNC0638 8.6%) 一方、53BP1 の集積は MS-275 では抑制されたが、FK228 および UNC0638 では抑制を認めなかった。(DMSO 92.5%, MS-275 44.9%, FK228 83%, UNC0638 81.3%) しかし、FK228 では集積 (核内 foci) の蛍光強度が減弱した。そこで 53BP1 の下流で働く RIF1 を解析したところ、MS-275 と FK228 は顕著な低下を認めたのに対して UNC0638 の低下は軽度であった。(DMSO 79.2%, MS-275 14.4%, FK228 27.2%, UNC0638 51.6%) 以上より HDAC 阻害剤は BRCA1、BARD1 および 53BP1、RIF1 全ての損傷局所への集積を阻害するのに対して UNC0638 は、53BP1 と RIF1 に比較して BRCA1、BARD1 をより選択的に阻害することが明らかとなった。

③Gene conversion assay: UNC0638、MS-275、FK228 とともに GFP 陽性細胞率 (相同組換え修復率) を阻害したが UNC0638 で顕著であった。

④U2OS、HCT116、MCF7 および HeLa 細胞を用いて clonogenic survival assay をおこなったが、HDAC 阻害剤と Olaparib との間に相乗効果は認められなかった。

考察

今回我々は、修復経路における HDAC 阻害剤と HKMT 阻害剤の作用の差異を明らかにすることができた。HKMT 阻害剤が H3K9me2 を抑制して相

同組換え修復をより選択的に阻害するのに対して、HDAC 阻害剤が H3K9ac と H4ac を介してそれぞれ BRCA1/BARD1 と 53BP1/RIF1 の両経路を阻害し、相同組換え修復と非相同末端再結合を阻害する機序が明らかとなった。我々は、UNC0638 が Olaparib との間で合成致死性効果を生じることを報告した。しかし、HDAC 阻害剤と Olaparib との間に合成致死性効果は認められなかった。PARP 阻害剤は相同組換え修復不全と合成致死性を来すが、本研究結果からもわかるように、相同組換え修復と非相同末端再結合の両経路を阻害する場合には合成致死性を生じさせないものと考えられる。

結語

HDAC 阻害剤は放射線療法など、直接二本鎖切断を生じさせる治療法との併用に効果が期待され、HDAC 阻害剤が臨床応用された際には治療戦略上重要な知見となると考えられる。