

新規複製ストレス応答因子を介した発がん制御機構の解明

藤田医科大学

医学部 分子腫瘍学講座 准教授 新美敦子

藤田医科大学

医学部 分子腫瘍学講座 教授 鈴木元

1. 研究の背景・目的

肺がんは年間死亡者数のがん腫中で第一位であり、発がん過程の解明、予防、治療法の開発が強く望まれている。申請者の所属する研究グループはこれまで、臨床検体と培養細胞双方から肺がんの組織型特徴的な遺伝子発現プロファイルに注目し、肺がん発生と悪性化、転移に関係する遺伝子や経路を単離してきた。一連の研究の中で、DNA複製酵素 DNAポリメラーゼ δ (pol δ) 複合体の最小サブユニット POLD4 が小細胞肺がんの一部の非小細胞肺がんにおいて発現量が低下しており、肺腺がん患者においては POLD4 低発現群では高発現群に比べて術後の予後が悪いことを明らかとした (1)。これらの知見より、POLD4 が肺がん発生や悪化の抑制に何らかの重要な役割を担っていることが推測される。しかし、POLD4 が実際にどのように発がんの抑制に寄与しているのか、その詳細については現在までほとんど明らかとなっていない。

申請者は肺がん発生における POLD4 機能解析を目的として各種検討を行った。培養細胞を用いた実験の結果、POLD4 は複製ストレス応答制御機構に何らかの役割を担っている可能性が示された。複製ストレスの適切な応答制御はゲノム不安定化を介した発がん過程の抑制に重要であることが知られている。本申請では POLD4 の複製ストレス応答機構への関与を明らかにし、ゲノム不安定化から肺がん発生に至るメカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究方法

(1) ウェスタンブロッティング (WB) 法による複製ストレス関連因子の解析

実験にはヒト肺腺がん細胞株 A549 及び不死化ヒト線維芽細胞 MRC5 を用いた。POLD4 をノックダウンし、10 μ M シスプラチン (CDDP) または 1mM ヒドロキシウレア (HU) 処理により複製ストレスを誘導した後に全細胞溶解液を調整し、SDS-PAGE 及び WB 法により各種シグナル検出を行った。解析に用いた phospho-RPA32(S4/8)抗体 (bethyl) 及び DNA Damage Antibody Sampler Kit (CST) は本研究資金より購入した。得られたシグナルは CS Analyzer4 (ATTO)を用いて定量解析を行った。

(2) 質量分析法による POLD4 相互作用因子の解析

約 1x10⁸ 個の A549 細胞を用い、Dynabeads Co-Immunoprecipitation kit (Invitrogen) による抗 POLD4 抗体の免疫沈降を行った。得られた共沈画分は質量分析により解析し、POLD4 相互作用因子を検索した。質量分析は名古屋大学トランスフォーメティブ生命分子研究所分子構造センターとの共同研究により行なった。独立した実験を 3 回施行し、全てにおいてコントロール IgG 画分より 3 倍以上の存在比が確認されたタンパク質を POLD4 相互作用候補因子とした。

3. 研究結果

(1) POLD4 ノックダウン細胞における複製ストレス応答関連因子の挙動解析

POLD4 発現量の変化が複製ストレス応答関連因子の挙動にどのような影響を与えるのかを WB 法を用いて解析した。A549 と MRC5 両細胞株において、POLD4 ノックダウン細胞 (siPOLD4 細胞) ではコントロール細胞に比べ、CDDP または HU 添加により誘導される RPA32 リン酸化が著しく抑制されることが明らかとなった。また、同じく複製ストレスにより誘導される CHK1 リン酸化についても siPOLD4 細胞では大きく減弱することが示された。

(2) POLD4 相互作用因子の検索

質量分析法により解析した結果、少なくとも 10 種類のタンパク質が POLD4 相互作用候補因子として同定された。既に POLD4 との相互作用が報告されている pol δ 複合体のサブユニット POLD1, POLD2, POLD3 (2) については特に高頻度で検出されており、実験の妥当性が確認された。その他の相互作用候補因子に関しては、これまでに報告のない新規のものであり、DNA 複製関連因子及び DNA 修復因子が大部分であった。一方で、がん転移関連因子や転写調節因子等も含まれており、POLD4 の機能が多岐に渡っている可能性が示された。

4. 考察

複製ストレス応答制御機構はゲノム不安定化を抑制する一方で、DNA 損傷性抗がん剤に対する抵抗性の要因となるなどの二面性を有しており、その包括的理解は将来的ながん治療研究に発展する可能性が期待できる。本申請研究では POLD4 が複製ストレス応答制御にどのように関与するのか、その分子メカニズムの解明を試みた。POLD4 発現量の低下は複製ストレスにより誘導される RPA 及び CHK1 リン酸化レベルの低下をもたらした。これらのリン酸化シグナルは複製ストレス存在下における DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) の活性化の指標であることから、複製ストレスによる DDR 活性化は POLD4 に依存している可能性が示された。適切な DDR 活性化は細胞周期停止や複製フォーク安定化、DNA 修復に重要であり、POLD4 発現量の低下はゲノム不安定化を介して発がん及びその悪性化を導く要因の一つである可能性が示唆された。また、本申請研究により、複数の新規 POLD4 相互作用候補因子を同定することができた。今後、これらが POLD4 とどのように機能的に関与しているのかについて解析を進め、POLD4 が複製ストレス存在下において DDR 活性化を引き起こす分子メカニズムの更なる解明を行う予定である。

5. 文献

1. Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M: Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res.* 70(21):8407-16, 2010
2. Li H, Xie B, Zhou Y, Rahmeh A, Trusa S, Zhang S, Gao Y, Lee EY, Lee MY: Functional roles of p12, the fourth subunit of human DNA polymerase delta. *J Biol Chem.* 281(21): 14748-55, 2006

6. 論文発表

論文発表

無し

学会発表

1. **新美敦子**、岩瀬咲良、竹内俊幸、水谷泰嘉、鈴木元、DNA ポリメラーゼ δ 複合体サブユニット POLD4 の肺がん発生における役割解析 第 42 回日本分子生物学会年会 福岡、2019 年 12 月