

# 肺がん発生に関与する複製ストレス応答制御機構の解明

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、肺がんの発生と悪性化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  $\delta$  (pol  $\delta$ ) 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にした (1)。これらの知見より、POLD4 は肺がん発生や悪性化を防ぐ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抑制に寄与しているのか、その詳細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 は複製ストレスにより引き起こされる DNA 損傷応答制御機構 (DNA damage response: DDR) の活性化を促進する役割を担っている可能性が示唆された。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 (2, 3)。本申請では複製ストレス応答制御機構における POLD4 の働きを明らかにし、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) 蛍光抗体法を用いた POLD4 及び複製ストレス関連因子の検出

POLD4 ノックダウン (siPOLD4) A549 細胞をカバーグラス上にて培養し、10 $\mu$ M シスプラチン (CDDP) で 4 時間処理後、培地交換をして更に 72 時間培養した。CDDP 処理直後、24、48、72 時間培養後のカバーグラスをそれぞれ固定し、POLD4 または各種複製ストレス関連因子に対する抗体を用いて蛍光抗体法による細胞染色を行った。解析に用いた抗体のうち、CHK2 抗体 (CST) 及び p53 抗体 (CST) は本研究資金より購入した。染色したサンプルは蛍光正立顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いて観察した。

#### (2) 免疫沈降法による POLD4 相互作用因子の解析

A549 細胞から抽出した total RNA より、POLD4 cDNA 全長をクローニングして N 末に Flag タグを付加した発現ベクターを構築した。また、POLD4 cDNA 全長の C 末側から様々なサイズを欠損させた POLD4 欠変異体も同時に作成した。サブクローニングに用いたプライマーなどの消耗品は本研究資金により購入した。Flag-POLD4 全長及び欠変異体の発現ベクターは Neon Transfection system (Invitrogen) を用いて約  $1 \times 10^7$  個の A549 細胞に導入し、発現を確認した後に Dynabeads Co-Immunoprecipitation kit (Thermo Fisher) を用いて Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られた共沈画分はウェスタンブロッティング法 (WB) により解析した。

### 3. 研究結果

#### (1) 複製ストレスにより誘導される DNA 損傷応答関連因子の細胞内における挙動解析

POLD4 低発現細胞では複製ストレスにより引き起こされる DDR 活性化が抑制されることが、申請者による WB 予備実験の結果から示唆されている。そこで蛍光抗体法による細胞染色を行い、関連因子の細胞内挙動について、より詳細な解析を試みた。DDR 活性化指標の一つである RPA リン酸化について、siPOLD4 細胞においてはコントロール細胞に比べて CDDP により誘導されるシグナルが減弱していることが確認された。一方で、DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break: DSB) のマーカーである $\gamma$ H2AX の foci 数については、サンプルを取得した全てのタイムポイントを通じて siPOLD4 細胞とコントロール細胞の間で明瞭な差異は観察されなかった。更に、コントロール細胞に対して POLD4 抗体による蛍光抗体を行ったところ、少なくとも今回の実験条件下では $\gamma$ H2AX と共局在する POLD4 の foci は観察されなかった。

#### (2) POLD4 相互作用因子の検索

申請者らが行った免疫沈降-質量分析法による予備実験の結果から、POLD4 は複数の

DDR 関連因子と相互作用している可能性が示されている。そこで、Flag タグを付加した POLD4 欠失変異体を A549 細胞にて発現させて免疫沈降を行うことで、POLD4 とそれらタンパク質との相互作用の確認及び相互作用に必要な領域の同定を試みた。CDDP 存在下、非存在下、どちら場合においても共沈画分に強い Flag-POLD4 シグナルを得たが、相互作用が期待されるタンパク質についてはいずれもシグナルを検出することができなかった。pol  $\delta$  複合体サブユニットの一つである POLD1 も共沈していなかったことから、過剰発現させた外来性 Flag-POLD4 は pol  $\delta$  複合体にサブユニットとして含まれない可能性が強く示唆された。

#### 4. 考察

本申請研究では、POLD4 が複製ストレス存在下において DDR 活性化を促進し、ゲノム不安定化を抑制する分子メカニズムの解明を試みた。蛍光抗体法による RPA32 リン酸化シグナルの観察結果より、POLD4 は DDR 活性化を担う因子であることが改めて確認された。一方で、siPOLD4 細胞においても  $\gamma$ H2AX foci 数の増加や減少速度には明らかな違いが見られなかったこと、また、 $\gamma$ H2AX シグナルと共局在する POLD4 の foci 様シグナルが得られなかったことから、POLD4 は複製ストレスにより引き起こされる DSB の生成やその修復ステップには大きく関与していない可能性が示唆された。適切な DDR 活性化は DNA 修復の促進以外にも、細胞周期の停止や複製フォークの安定化等に重要であるが、今回の結果は POLD4 がそれらの経路に主に関与している可能性を示しているのかもしれない。今後、複製ストレス存在下における細胞周期進行や複製フォーク進行が POLD4 発現量によりどのような影響を受けるのか、それによりゲノム不安定化がどのように変化するか、更に解析を進めていきたい。POLD4 相互作用因子の検索については、過剰発現させた外来性の Flag-POLD4 は pol  $\delta$  複合体に含まれないという結果となった。これは、POLD4 による DDR 活性化促進には POLD4 タンパク質単独ではなく、pol  $\delta$  複合体の一部として存在する必要があることを間接的に示しているものの、今後解析を進めるうえで、新たな実験系を構築する必要性が明らかとなった。今後の課題とし、CRSPR/Cas9 系を用いてゲノム上の POLD4 遺伝子を直接利用した欠失変異体を作成するなど、更なる検討を行う予定である。

#### 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. Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A: Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer.* 15(5):276-89, 2015
3. Macheret M, Halazonetis TD: DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol.* 10:425-48, 2015

## 6. 論文発表

### 論文発表

1. Shi H, Niimi A, Takeuchi T, Shiogama K, Mizutani Y, Kajino T, Inada K, Hase T, Hatta T, Shibata H, Fukui T, Chen-Yoshikawa TF, Nagano K, Murate T, Kawamoto Y, Tomida S, Takahashi T, Suzuki M: CEBP $\gamma$  facilitates lamellipodia formation and cancer cell migration through CERS6 upregulation. *Cancer Sci.* 2021 May 2. doi: 10.1111/cas.14928. Online ahead of print.

### 学会発表

1. Atsuko Niimi, Yasuyoshi Mizutani, Toshiyuki Takeuchi, Motoshi Suzuki, A suppressor role of POLD4, the smallest subunit of DNA polymerase  $\delta$  complex, in lung cancer

第 79 回日本癌学会学術総会 広島 2020 年 10 月