

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 丹羽 佑輔  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1038 号  
学位授与の日付 令和4年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Cyclin D1 binding protein 1 responds to DNA damage through the ATM-CHK2 pathway  
(CCNDBP1 は ATM-CHK2 経路を介した DNA 損傷に応答する)

論文審査委員 主査 教授 芝田 晋介  
副査 教授 高塚 尚和  
副査 准教授 坂田 純

### 博士論文の要旨

背景と目的: CCNDBP1 (Cyclin D1 binding protein 1, GCIP, HHM と呼ばれる) は周囲の状態に応じて TGF- $\beta$  シグナルによる細胞移動を負に調節するため腫瘍抑制因子の側面を持つ一方で、腫瘍細胞で発現すると癌細胞を化学療法による DNA 損傷から逃れさせ癌細胞の生存率を向上させる。申請者らはこの CCNDBP1 の分子メカニズムを解明するため、癌細胞の DNA 損傷に対する応答に焦点をあてて検討した。

方法: 肝細胞癌由来の細胞株および Ccndbp1 ノックアウトマウスの組織を用いて、in vitro および in vivo での CCNDBP1 の分子機序について検討した。X 線照射により DNA 損傷を誘導し、X 線照射による遺伝子およびタンパク発現の変化を評価した。

結果: HLE および HepG2 細胞株における CCNDBP1 遺伝子および CCNDBP1 タンパク質の発現を示す。CCNDBP1 はわずかに内因性の発現が見られるが、遺伝子導入株で CCNDBP1 は過剰発現している (図 1 a) MTT assay で細胞の増殖率を調べると、CCNDBP1 過剰発現細胞株は対照群と比較して増殖率の増加を示した (図 1b および 1c)。X 線照射後、CCNDBP1 発現細胞株は、細胞増殖が阻害された対象群と比べ有意に高い増殖速度を示した (図 1d および 1e)。この違いは 20  $\mu$ M の CDDP で処理した場合には見られなかった (図 1f および 1g)。これらの結果は、HCC における CCNDBP1 の過剰発現が、10%FCS および X 線に対する耐性の下で細胞増殖を刺激したことを示す。CCNDBP1 の過剰発現肝細胞癌株は X 線照射後も細胞増殖が保たれ、X 線照射に対する抵抗性を示した。

CCNDBP1 の分子メカニズムを決定するために、CCNDBP1 過剰発現 HLE (図 2) と Ccndbp1 ノックアウトマウスおよび野生型マウス (図 3) の遺伝子発現について、DNA マイクロアレイ分析を使用して比較した。遺伝子の階層的クラスター化後の遺伝子オンロジー用語の分析は、分子機能、触媒活性、ヌクレオチド、DNA、結合、RNA ポリメラーゼ II プロモーターから転写された場合の負の調節、RNA ポリメラーゼ II 調節領域配列特異的 DNA 結合の点で遺伝子発現の違いを示した。また細胞とマウスの両方の核クロマチン (図 2c、2d、3c、および 3d)。これらの用語に関与する遺伝子と、X 線照射による細胞とマウスのすべての比較で 2 倍以上の違いを示した遺伝子の中で、in vitro と in vivo との両方で発現の違いを示した EZH2 の enhancer に注目した

(図 2e および 3e)。EZH2 遺伝子発現は、対象群よりも CCNBP1 過剰発現細胞株で低く、非照射 CCNBP1 過剰発現細胞よりも照射 CCNBP1 過剰発現細胞株で低かった。これらの結果は、CCNBP1 の発現と照射が EZH2 の発現を阻害したことを示唆した。これらは、*in vivo* 遺伝子発現分析でも確認された。図 3e は野生型マウスよりも通常の飼育下および X 線照射後の *Cndbp1* ノックアウトマウスの *Ezh2* が高いことを示している。照射は、*Cndbp1* ノックアウトマウスの *Ezh2* 発現を減少させなかった (図 3e)。これらの結果は、*Cndbp1* が抑制的に *Ezh2* の発現を制御し、照射により *Cndbp1* 依存的に *Ezh2* の発現が減少したことを示している。

X 線による DNA 損傷に関与する DNA 損傷関連タンパク質 ATM と CHK2 を調べるため、培養細胞を用いた western blotting を行った。図 4a は HLE 細胞株の western blotting の代表的な結果を示し、図 4b は HLE および HepG2 細胞株におけるタンパク質発現の結果をまとめたものである。CCNBP1 の発現は、照射により時間依存的に活性化され、ATM の負の調節因子である EZH2 タンパク質の発現を抑制した。X 線照射は 24 時間後に EZH2 発現を阻害することにより ATM タンパク質のリン酸化を誘導した。さらに、CCNBP1 の過剰発現は、EZH2 の継続的な阻害を示し、その後、照射後少なくとも 72 時間は ATM のリン酸化が持続した。ATM の活性化に続いて、CHK2 は CCNBP1 過剰発現細胞でのリン酸化によって継続的に活性化されました。さらに、対象群よりも CCNBP1 発現細胞での p53 および p21 の高い増加、cdc25C の阻害、およびサイクリン D1 発現の段階的な増加は、照射および腫瘍増殖の回復時に細胞周期停止を示した (図 4)。

マウスにおける *Cndbp1* 遺伝子の働きを解明するため、X 線照射の前後に野生型および *Cndbp1* ノックアウトマウスから収集された組織を使用して調べた。図 5a は、胸腺組織の western blotting の代表的な結果を示す。照射後、*Atm* および *Chk2* タンパク質の発現レベルは両方のマウスで差はなかったが、ノックアウトマウスの胸腺細胞 (主にリンパ球) では、*Atm* および *Chk2* タンパク質のリン酸化が抑制された。さらに *Ezh2* の発現は、野生型マウスよりもノックアウトマウスの方が高かった (図 5a)。

図 5b は免疫組織化学的染色に基づく胸腺および肝臓でのタンパク質発現の分析結果をまとめたものである (代表的な画像を補足図 1 に示す)。肝細胞は同様の所見を示したが、照射時に *Ezh2* の発現がより明確に維持された (図 5b)。胸腺組織は、*Ezh2* 発現に比較的穏やかな違いを示した。これらの結果は、*Cndbp1* が *Ezh2* 発現の阻害を通じて *Atm*-*Chk2* 経路を活性化したことを示唆した。したがって、*Cndbp1* のノックアウトは *Ezh2* を活性化し、これが *Atm*-*Chk2* 経路の機能不全と、ノックアウトマウスでの照射時の *Chk2* リン酸化の抑制につながった。

考察：申請者らの研究では、CCNBP1 の分子メカニズムを評価することを目的とし、DNA 損傷からの回復に注目した。申請者らは HCC における CCNBP1 の過剰発現が、より高い細胞増殖と X 線誘発性 DNA 損傷に対する耐性に寄与し、このメカニズムが癌細胞における ATM-CHK2 経路の活性化に依存していることを示した。これらの結果は、ATM-CHK2 経路の異常な活性化が、化学放射線療法への耐性および鼻節外性 NK / T 細胞リンパ腫の予後不良と関連していたという事実によって裏付けられた。さらに、申請者らは CCNBP1 を過剰発現した細胞株が X 線照射に対して耐性を獲得したが、シスプラチンに対しては耐性を獲得していないことを示した。この違いは、電離放射線が多数の DSB の形成を引き起こし、ATM-CHK2 シグナリングの実質的な活性化を引き起こしたと報告した Ziegler らによって部分的に説明された。しかし、シスプラチンの DNA 架橋剤は、転写の実質的な遮断を引き起こしたが DSB には反映されず、ATM-CHK2 経路の発現を増加させなかった。さらに、ATM の負の調節因子であると報告されているヒストン H3K27 メチルトランスフェラーゼである EZH2 に対する CCNBP1 の抑制効果が、ATM-CHK2 経路の活性化に寄与することを示した。この結果は、EZH2 発現の減少が ATM リン酸化を増加させ、抗癌治療に対する耐性を誘発したことを示す既報によって裏付けられた。これらの結果は、*Cndbp1* ノックアウトマウスの肝臓、脾臓、胸腺への X 線照射後の ATM-CHK2 経路の活性化が弱いことを示した分析によってさらに裏付けられた。最近、CCNBP1 遺伝子の発現が DNA メチル化によって調節される可能性があることが報告され、このメカニズムは正常細胞での CCNBP1 発現の変化に関連して、悪

性形質転換の初期段階で悪性の可能性を獲得し、癌細胞で化学療法抵抗性になる可能性がある。申請者らの研究の限界として、CCNDBP1 と EZH2 の間の直接作用、および放射線療法と化学療法抵抗性への結果の適用を可能にするヒト HCC サンプルの分子ベースの分析が不足していることが挙げられる。標準的な治療にもかかわらず進行する前立腺癌に関する報告では、ポリアデノース二リン酸リボースポリメラーゼであるオラパリブによって DNA 修復システムが阻害された場合に化学療法に対する高い反応が見られた。同様に CCNDBP1 が従来の治療法に対する反応が不十分な HCC の治療標的となる可能性があり、さらなる発展につながりうる。

結論：CCNDBP1 は EZH2 を抑制することにより ATM-CHK2 経路を活性化し DNA 損傷を軽減することで、化学療法抵抗性を誘導することを示した。

#### 審査結果の要旨

TGF- $\beta$  シグナルの制御因子として知られる CCNDBP1 が、腫瘍細胞において有している下流分子メカニズムを解明するために、肝細胞癌由来の細胞株と Ccndbp1 ノックアウトマウスの組織を用い、X 線照射に伴う DNA 損傷に対する応答を解析するために、細胞増殖率の変化や抗癌剤への応答性を評価した。また CCNDBP1 の下流シグナルの探索のために、CCNDBP1 過剰発現細胞や遺伝子欠損動物の遺伝子発現変化について、マイクロアレイ法を用いて網羅的な下流標的解析を実施した。その結果、CCNDBP1 の下流には EZH2 が存在し、その発現量を抑制し、ATM-CHK2 経路の活性化を介して DNA 損傷を軽減していることや、p53 と p21、サイクリン D1 の発現増加を介して腫瘍細胞が抗癌剤化学療法への抵抗性を獲得しているメカニズムを解明するに至った。

以上の研究により、肝細胞癌の新たな治療標的となり得る分子機構の一端を明らかにした点で、非常に有意義な成果を残していることから、学位論文としての価値があると判断した。