

ATM 遺伝子変異による乳癌発症機構を解明 —HBOC 症候群の乳腺特異的発症機構の解明に貢献—

概要

乳癌の 5-10% は遺伝性 (HBOC 症候群※1) で、変異している遺伝子の代表は *BRCA1*, *BRCA2*※2 です。次に頻度の高い遺伝子変異は *ATM* 遺伝子※3 です。これらの遺伝子の変異が、なぜ特定臓器 (乳腺) の発癌を上昇させるのか、その分子機構は不明でした。

山田真太郎 京都大学医学研究科助教、Rifat Najnin 医学研究科大学院生、武田俊一 深圳大学教授、Scott Keeney NY メモリアルスローンケタリングがん研究病院ラボヘッドらの共同研究グループは、*ATM* キナーゼ欠損がエストロゲン (E2) ※4 の細胞増殖刺激効果を大きく上昇させることを示しました。さらに、その分子機構を解明しました。具体的には、E2 刺激時に、*c-MYC* 発癌遺伝子※5 のエンハンサー-DNA 配列※6 にゲノム切断が発生することを発見しました (図1)。ATM は、この切断の再結合を促進することを証明しました。ATM が欠損し再結合が遅れると、E2 曝露による *c-MYC* 転写因子の発現誘導 (図1、中段) がさらに亢進する (図1、下段) ことを、ヒト細胞株とマウスで確認しました。この亢進が ATM 欠損による乳腺特異的発癌の分子機構です。

様々な外部刺激に応答して遺伝子発現が誘導することを、early transcriptional response (早期転写応答) ※7 と呼びます。早期転写応答時に、エンハンサーにゲノム切断が発生することは、新発見です。今後は、*BRCA1*, *BRCA2* が ATM と同様の作用機序によって、乳腺特異的に発癌抑制するか否かを解明します。予備実験結果から、多様なエンハンサーにゲノム切断が発生していました。今後、ゲノム切断修復と早期転写応答のあいだのクロストークという新研究分野を樹立します。

本成果は、2022 年 12 月 30 日 (現地時刻) に国際学術誌「*Cell Reports*」にオンライン掲載されました。

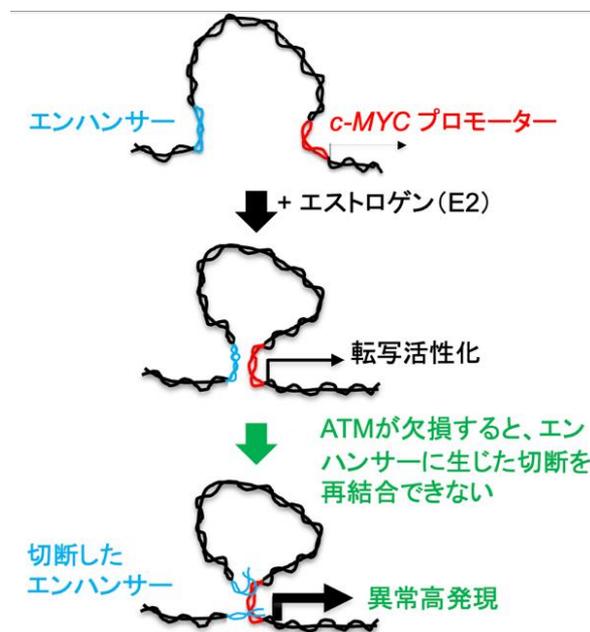


図1 ATM が欠損すると、*c-MYC* 発癌遺伝子の、エストロゲンへの早期転写応答が異常に高まる。

1. 背景

ATM キナーゼ※3 は、ホモ欠損の場合、毛細血管拡張性運動失調症（Ataxia Telangiectasia）を発症します。一方、変異の保因者では乳癌発症が増加します。ATM の既知機能は、ゲノム切断時の P53 活性化と DNA 複製時に自然発生するゲノム切断を修復することです。これらは、すべての増殖細胞で機能し発癌を抑制するが故に、なぜ、保因者では特定の臓器（乳腺上皮）で発癌が増加するのか、その分子機構は不明でした。

ヒトゲノムは、生理的な状態でも多数の切断が各細胞で毎日発生します。自然発生するゲノム切断の原因の1つが DNA topoisomerase II (TOP2) ※8 の触媒反応の失敗（図2, ④）です（*Mol Cell* 2016, PMID: 27814490）。切断は、染色体転座など変異を起こして発癌を促進することが知られています。切断が早期転写応答に影響することは未知でした。

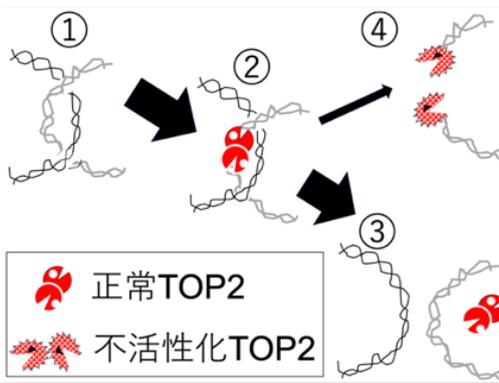


図2 TOP2 の触媒反応 TOP2 は①→②→③の反応で、もつれた2本の DNA のもつれを解消する。解消時に一過性に2本の DNA の片方を切断する（②）。TOP2 は切断端に共有結合する（Gated break, ②）。もう一方の DNA が Gated break を通過して、もつれを解消する（③）。TOP2 は再結合（②→③）に失敗し、病的ゲノム切断を作ることがある（②→④）。不活性化した TOP2 は病的ゲノム切断（④）を再結合できない。この切断を再結合する分子の1つが ATM である（図3、④）。

2. 研究手法・成果

● 生理的濃度のエストロゲン(E2)はゲノム切断を誘導し、ATM がその再結合を促進

ヒト乳癌細胞とマウスを E2 に短時間曝露し、ゲノム切断発生を免疫染色によって定量しました。その結果、ATM が欠損すると、短時間曝露時に生じたゲノム切断が乳癌細胞とマウス乳腺上皮において1日近く修復されないまま残ることを発見しました。切断発生には、エストロゲン受容体と TOP2※8（図2）の両方が必要でした。切断の再結合には、ATM と非常相同末端結合経路（G₀/G₁ 期に発生したゲノム切断の修復に必須）が両方共同する必要がある（図3）ことを確認しました。

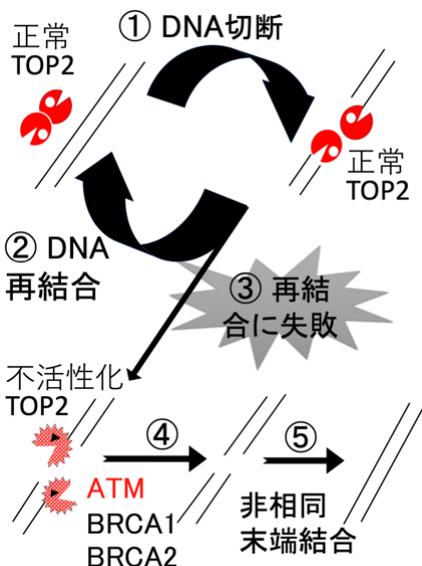


図3 Topoisomerase II (TOP2) は DNA 切断（①）、再結合（②）を高速で繰り返す。早期転写応答時に TOP2 触媒反応が活発化し、再結合失敗（③）が頻発する（図2、②→④に相当）。失敗すると、非同相末端結合経路（⑤）が修復する。修復には、切断端からの TOP2 剥取り（④）が必要である。本研究は、ATM が切断端から TOP2 を剥取る（④）ことを証明した。我々は、BRCA1、BRCA2 も剥取りに関与すると考え、実験を進めている。

- **ATM の基質とリン酸化サイトの決定**

データマイニングから、ATM の基質とそのリン酸化サイトを CtIP の Thr847 と Thr859 と予測しました。その予測を遺伝学的手法で検証しました。具体的には、野生型細胞と ATM 欠損 (*ATM*^{-/-}) 細胞のリン酸化サイトに変異 (*CtIP*^{T847A/T859A} 変異) をノックインし、*ATM*^{-/-}、*CtIP*^{T847A/T859A}、薬剤で ATM を阻害した *CtIP*^{T847A/T859A} が TOP2 依存的ゲノム切断の修復についてよく似た表現型であることを示しました。CtIP の DNA 切断活性 (既知) は、切断端に共有結合した TOP2 を剥せます (図3、④)。この既知データと我々の遺伝学的解析データから、ATM の基質は CtIP と結論しました。

- **ATM 欠損がゲノム切断修復の機能を低下させると、E2 応答性エンハンサーの活性化が異常になり早期転写応答が変化する**

我々は、E2 曝露時に生じた TOP2 依存的ゲノム切断 (図3、③) が E2 応答性エンハンサーに発生したという仮説を立てました。早期転写応答※7 中にエンハンサーが切断され、それがすぐに再結合されないと、早期転写に異常が生じる可能性があります。この可能性を検証するために、NET-CAGE 法※9 によって、E2 曝露後の、エンハンサー活性と早期転写応答を継時的に調べました。ATM 欠損細胞を含め、TOP2 依存的ゲノム切断が効率よく修復できない細胞 (図3、④と⑤) が機能低下) では、野生型細胞に比べ、エンハンサーの活性化と早期転写応答が大きく変化しました。この結果は、(1) E2 曝露への早期転写応答中にエンハンサーにゲノム切断が発生、(2) ゲノム切断がすぐに修復されないと早期転写応答が異常になる、の2点 (図1) を示唆します。

- **E2 刺激時に、*c-MYC* 遺伝子のエンハンサーに切断が発生し、その再結合が遅れると *c-MYC* の発現が亢進する**

我々は、ヒト ATM 欠損乳癌細胞は野生型に比べ、E2 曝露による *c-MYC* の発現誘導がさらに3倍程度亢進し長く続くことを見つけました。そこで *c-MYC* のエンハンサー※6 に TOP2 依存的切断が E2 曝露中に起こると考えました。ゲノム切断を検出する為に、 γ H2AX 抗原をクロマチン免疫沈降法で解析しました。非相同末端結合 (⑤) 欠損細胞を E2 曝露中にエンハンサーが切断されることを確認しました。さらに CRISPR/Cas9 によって野生型乳癌細胞のエンハンサーにゲノム切断を発生させると、E2 曝露中に、ATM 欠損乳癌細胞に E2 曝露した時のように、*c-MYC* の発現が亢進することを見つけました。以上の実験結果から、前段落の2つの結論、(1) と (2) が、*c-MYC* の、E2 曝露への早期転写応答において正しいことを証明しました。

- **ATM が欠損すると、E2 刺激時の *c-MYC* 発現誘導がマウス乳腺上皮で亢進する**

我々は、E2 を野生型マウスと ATM 欠損マウスに腹腔注射し、マウス乳腺上皮の *c-MYC* 発現を組織免疫染色法によって解析しました。E2 注射をすると *c-MYC*⁺細胞は、野生型マウスでは4%から10%に増加したのに対し、ATM 欠損マウスでは4%から30%にも増加しました。そして、E2 を毎日一回ずつ3日連続して腹腔注射すると、3日間に一回以上細胞分裂した細胞は、野生型マウスでは6%から14%に増加したのに対し、ATM 欠損マウスでは6%から36%に増加しました。この増殖細胞の増加は、E2 と同時にエストロゲン受容体阻害剤もしくは *c-MYC* 阻害剤も注射すると、完全に抑制されました。以上の実験結果から、ATM が欠損すると、E2 刺激時の *c-MYC* 発現誘導がマウス乳腺上皮で亢進し、上皮が異常増殖すると結論しました。

3. 本研究の意義と今後の展望

本研究は、ATM 欠損が乳癌発症を促進する機序を解明しました。本研究は、早期転写応答中にエンハンサー

一にゲノム切断が発生することと、その切断再結合経路を解明しました。この解明によって、ゲノム切断修復経路と早期転写応答という、これまで無関係と考えられてきた2つの生化学反応のあいだに密接なクロストークが存在することを明らかにしました。

このクロストークは、ATM 欠損による前立腺癌発症と進行性小脳失調、および HBOC 症候群の発癌機序の解明に貢献します。

<用語解説>

※1 **HBOC 症候群** 遺伝性乳癌卵巣癌 (hereditary breast and ovarian cancer : HBOC) は、特定の遺伝子のヘテロ接合体変異を持つ保因者に発症する癌である (図4)。乳癌、卵巣癌の他に、前立腺癌や膵癌が高頻度で発症することもある。変異が HBOC 症候群の原因になる遺伝子は、*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2* がある。これらの遺伝子のヘテロ接合体変異がホモ接合体変異になった時 (Loss of heterozygosity: LOH と呼ぶ、図4) に、発癌が促進される。LOH は、 10^5 細胞にたった 1 細胞程度しか生じない。故に、乳腺上皮は正常 *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* 蛋白分子を失うやいなや、その発癌が一気に促進されるはずである (図4)。「発癌が一気に促進」の分子機構は不明である。なぜ肺癌や大腸癌ではなく、乳癌、卵巣癌か、発癌の臓器特異性の分子機構も不明である。

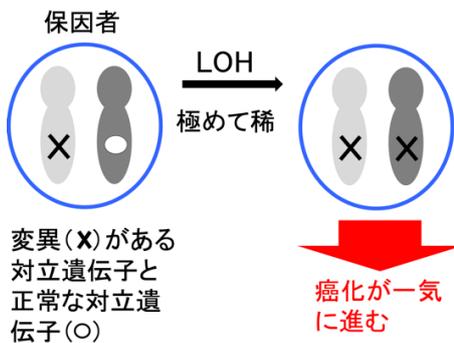


図4 HBOC 症候群の発症機構。

※2 ***BRCA1*, *BRCA2*** *BRCA1*, *BRCA2* 蛋白分子は、ゲノム切断を再結合する。ゲノム切断は、抗癌治療時に発生する他、1 回の DNA 複製毎に各細胞に数個生じる。ゲノム切断は、修復されないと、染色体転座や長い領域の染色体ロスを起こし発癌を促進する。*BRCA1*, *BRCA2* は、全ての増殖細胞において DNA 複製時にゲノム切断修復に重要な働きをする。なぜ *BRCA1*, *BRCA2* が機能欠損すると、特定の臓器にのみ発癌が促進されるのか、その機序は不明である。

※3 ***ATM* 遺伝子** この遺伝子は、ATM キナーゼをコードする。日本人乳癌患者群での *ATM* 遺伝子病的バリエーションの保有者は 0.31% である。ATM は、ゲノム切断のセンサーであり、P53 腫瘍抑制転写因子をリン酸化によって活性化する。ATM は、DNA 複製時にゲノム切断修復を促進する。以上 2 つの、ATM による腫瘍抑制機構はすべての細胞において機能する。*ATM* 遺伝子変異の保因者がなぜ乳癌を多発するのか、発癌のその臓器特異性の分子機構は不明である。

※4 **エストロゲン** 女性ホルモンの 1 つで、乳腺上皮の増殖を強く刺激する。乳癌発症においても重要な役割を持つ。エストロゲン受容体阻害剤は、乳癌の、主要な治療法の 1 つである。

※5 ***c-MYC* 発癌遺伝子** 転写因子をコードする。*c-MYC* 蛋白分子は多くの悪性腫瘍で高発現する。3 倍程度

c-MYC をマウスで高発現させると、発癌を確実に増加できる。

※6 エンハンサー-DNA 配列 エンハンサーは、300 塩基程度の機能 DNA 配列であり、同じゲノム DNA 上にある転写開始部位（プロモーター）を活性化する。エンハンサーとそれが制御するプロモーターは、1 MB 距離が離れていることもある。各遺伝子の転写は、平均5ヶ所のエンハンサーによって制御されている。未同定のエンハンサーが多く存在すると推定され、「5ヶ所」という数字は今後増加する。c-MYC 遺伝子のエンハンサーは 30 以上の配列が 1 MB のゲノム上に分布し、全体をスーパーエンハンサーと呼ぶ。各配列の役割分担は不明である。エンハンサーがプロモーターを活性化する機序は、蛋白分子を介して両者が3次元的に近接することによる（図1）。この近接の分子機構は未解明である。DNA topoisomerase II (TOP2) ※8 と呼ばれる、ゲノム切断とその再結合を繰り返す酵素が近接の為のゲノム3次元構造変化に必要である。

※7 Early transcriptional response（早期転写応答） ホルモン、サイトカイン、ニューロトランスミッター、熱ショックが細胞を刺激した直後（15分から6時間）に誘導される遺伝子転写を早期転写応答と呼ぶ。エストロゲンを含む、ステロイドはその受容体が直接に転写因子として機能し、早期転写応答を起こす。恒常的に活性化されているエンハンサーはよく解明されているが、早期転写応答に関与するエンハンサーは未同定である。このタイプのエンハンサーの同定には、NET-CAGE 法※9 が最適である。

早期転写応答時には、エンハンサーとプロモーターのゲノム構造の動的変化が起こる（図1）。この動的変化に TOP2※8 の非常の活発な触媒反応（ゲノム切断とその再結合の繰り返し）が必要である（図3）。本研究の発見は、早期転写応答中に TOP2 が原因のゲノム切断がエンハンサーに発生することと、その切断がすぐに修復されないと、異常な早期転写応答が起こることである。

※8 DNA topoisomerase II (TOP2) TOP2 は、ゲノム切断とその再結合を高速で繰り返す（図3）酵素で、DNA 複製、転写、M 期の染色体凝縮に必須である。切断直後から再結合までの短時間に TOP2 は切断端に共有結合する（gated break と呼ぶ）。TOP2 は、gated break を作って2本の DNA のもつれを解消するのである（図5）。数万回以上の触媒反応が各細胞で毎日起こる。TOP2 は、再結合にしばしば失敗し、その結果、TOP2 が切断端に共有結合した病的ゲノム切断が自然発生する（図5、④）。本研究は、エンハンサーとプロモーターのゲノム構造変化時（図1）に、TOP2 が再結合反応を仕損なった結果、病的ゲノム切断がエンハンサー配列に発生することを証明した。

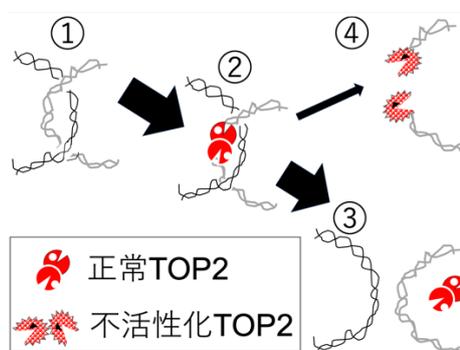


図5 TOP2 の触媒反応 TOP2 は①→②→③の反応で、もつれた2本の DNA のもつれを解消する。解消時に一過性に2本の DNA の片方を切断する(②)。TOP2 は切断端に共有結合する(Gated break, ②)。もう一方の DNA が Gated break を通過して、もつれを解消する(③)。TOP2 は再結合(②→③)に失敗し、病的ゲノム切断を作ることがある(②→④)。不活性化した TOP2 は病的ゲノム切断(④)を再結合できない。この切断を再結合する分子の1つが ATM である(図3、④)。図2と図5は同じ図である。

※9 NET-CAGE 法 活性化されたエンハンサーはエンハンサーRNA (eRNA) と呼ばれる noncoding RNA を発現する。eRNA はその半減期が1分しかなく、その検出は通常の RNA Seq 法では無理である。eRNA の感度を

向上する為に、細胞核を単離し試験管内で転写された eRNA を Deep Seq する手法 (GRO-Seq、Pro-Cap) がある。この手法は、恒常的に活性化されている eRNA を高感度に検出できる。しかし、プロモーターで転写を停止している Paused RNA polymerase II が、試験管内では転写を始めるというアーチファクトによる偽陽性が起こる。早期転写応答では、Paused RNA polymerase II (Pol2) による転写再開が主要な転写応答機構である。それ故に、GRO-Seq、Pro-Cap は、早期転写応答に関与するエンハンサーの検出に不適である。この問題を克服したのが、村川泰裕教授 (理研・京大高等科学院) の開発した NET-CAGE 法 (*Nature Genet* 2019, PMID: 31477927) である。この手法は、RNA 抽出中に新たな RNA 合成が始まることを阻害しながら、Pol2 と細胞内で複合体を作っている長い RNA (Paused Pol2 由来でない RNA) のみを Deep Seq する。NET-CAGE 法が早期転写応答に関与する eRNA の定量に最適である。本論文は、DNAFORM 社に NET-CAGE による Deep Seq 解析を委託し、エストロゲン添加後に eRNA 発現を継時的に解析した。

<論文タイトルと著者>

タイトル : ATM suppresses c-Myc overexpression in the mammary epithelium in response to estrogen.

著者 : Rifat Ara Najnin¹, Md Rasel Al Mahmud¹, Md Maminur Rahman¹, Shunichi Takeda², Hiroyuki Sasanuma¹, Hisashi Tanaka³, Yasuhiro Murakawa^{4,5,6,7}, Naoto Shimizu¹, Salma Akter¹, Masatoshi Takagi⁸, Takuro Sunada⁹, Shusuke Akamatsu⁹, Gang He², Junji Itou¹⁰, Masakazu Toi¹⁰, Mary Miyaji¹¹, Kimiko M. Tsutsui¹¹, Scott Keeney^{12,13}, and Shintaro Yamada^{1,12,*}

*責任著者

著者の所属機関

- 1 京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学
- 2 中国深圳大学
- 3 米国シダーズ・サイナイ医療センター
- 4 理化学研究所
- 5 IFOM, Milan, Italy
- 6 京都大学大学院医学研究科システムゲノム医学分野
- 7 京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点(WPI-ASHBi)
- 8 東京医科歯科大学
- 9 京都大学医学研究科泌尿器科学
- 10 京都大学医学部附属病院乳腺外科
- 11 岡山大学
- 12 Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA
- 13 Howard Hughes Medical Institute, New York, NY, USA

掲載誌 : Cell Reports

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111909>