

研究報告書
2019年度：A課題

2021年 4月 26日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 長崎大学

住 所 長崎県長崎市坂本1丁目12番4号

研究者氏名 佐々木由香



(研究課題)

肺がん細胞におけるポリ（ADP-リボース）分解酵素（PARG）とDUSP22機能阻害条件下
における合成致死誘導メカニズムの解析

2019年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

【研究の背景・目的】

翻訳後修飾の一種であるポリ(ADP-リボシル)化は、ポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)ファミリータンパク質により触媒され、細胞内の NAD⁺を基質として、標的タンパク質にポリ(ADP-リボース)(PAR)を合成する反応である。PARP ファミリータンパク質により合成された PAR は、主に PAR 分解酵素である PARG により、ADP-リボースへと分解される(図 1)。これまでに、PARG の機能阻害は、細胞内への PAR 集積を伴い、特定のがん細胞に対して放射線やシスプラチニなどの DNA 損傷剤に対して増感作用を示すことが報告されている。このことから、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ(PARG)が合成致死性抗がん剤の標的分子になり得ると考えた。近年、PARG を標的とした阻害剤の開発が進められており、申請者の所属している研究グループ(長崎大学分子標的医学分野 益谷美都子教授)では、PARG を機能阻害した際に認める細胞内 PAR 集積を指標として新規 PAR 集積化合物 M02455 を同定した。これと並行して、合成致死遺伝子の同定は特定の変異を持ったがん細胞に対して、抗がん剤処理が特異的に致死を誘導する個別化医療に繋がることから、申請者らは肺がん細胞株における PARG 機能阻害条件下における新規の合成致死性遺伝子として、DUSP22(dual specificity phosphatase 22)を同定した(Sasaki, Y. et al., Cancer Res. (2019) 79(15):3851-3861.)。

そこで本研究では、PARG と DUSP22 の両者のノックダウンにより誘導される合成致死誘導メカニズムを解明することを目的として研究を行った。本研究では特に、PARG 機能阻害条件下における合成致死性遺伝子である DUSP22 が含まれる DUSP ファミリータンパク質の一種である DUSP1 に着目して、解析を行った。

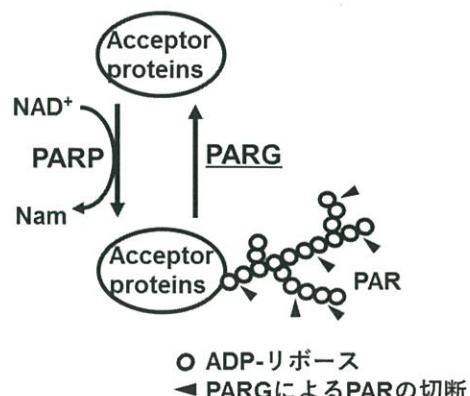


図1 PARGはPARPにより合成されたPARをADP-リボースへと分解する。

PARGはexo-, endo-活性を有し、PAR鎖の(リボース)-1(リボース)結合を切断する反応を触媒する。

【方法】

Transfection

24-well plate に A549 は 6×10^4 cells/well となるよう播種し、siRNA の濃度が終濃度 10 nM になるように Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies) を用いて推奨プロトコールに従って transfection を行った。

MTT assay

細胞生存アッセイは CCK Assay Kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo) を用いて添付のプロトコールに従って行った。96-ウェルプレートで培養した細胞に、CCK-8 液を添加し 37°C でインキュベーション後、450 nm の吸光度 (reference 600 nm) を測定することにより細胞の生存率を算出した。

qRT-PCR

RNA は各細胞より High Pure RNA isolation Kit (Roche) を用いて単離した。RNA からの cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) のマニュアルに従って行った。また、この時に RNase 阻害剤としては RNase I inhibitor (Applied Biosystems) を用いた。qRT-PCR は SYBR Green を用いて、StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) で解析した。標的遺伝子の mRNA

NA レベルは GUSB (Glucuronidase Beta) の mRNA レベルで normalize した。

コロニー形成法

siRNA を用いて標的遺伝子をノックダウンした細胞を 6 well plate (Trueline) に 300 cells/well で播種し、7 日間培養した。その後、4% ホルマリンで細胞を固定し、0.02 % クリスタルバイオレットで細胞を染色した後、50 個以上の細胞からなるコロニー数を数えることで、細胞の生存率を算出した。

【結果・考察】

これまでに、過酸化水素処理条件下で、PARP1 は DUSP1 の転写発現を抑制し、p38 MAPK 及び JNK のリン酸化を亢進することにより、細胞死を誘導する可能性が報告されていた (B. Racz et al., Free Radic. Biol. Med., (2010) 49, 1978–1988)。申請者らは、テトラサイクリン誘導型 PARG ノックダウン T-Rex HeLa 細胞における DUSP22 のノックダウンは、MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) である p38 のリン酸化レベルを上昇させることを既に報告している (Sasaki, Y. et al., Cancer Res. (2019) 79(15):3851–3861.)。そこで、本研究では、DUSP22 及び PARG の機能阻害により誘導される細胞死において、DUSP ファミリータンパク質の一種である DUSP1 の寄与について評価することにした。

肺がん細胞 A549において、PARG、DUSP22 を単独または両者をノックダウンした細胞における DUSP1 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR により解析した。その結果、PARG 及び PARG/DUSP22 のノックダウン条件下において、コントロール細胞と比べて、DUSP1 レベルは約 20 %程度低下することが分かった。PARG の機能阻害が DUSP1 の発現レベルを低下させたことから、DUSP1 が PARG の機能阻害条件下における合成致死の誘導に寄与しているのかを評価するために、A549 細胞において PARG 及び DUSP1 のダブルノックダウンを行い、細胞の生存率をコロニーフォーメーションアッセイにより解析した。その結果、PARG、DUSP1 の単独ノックダウンおよびダブルノックダウンのより細胞の生存率に違いは認められなかった。このことから、DUSP22 の場合と異なり、PARG と DUSP1 の両者の機能阻害下では合成致死が誘導されないことが明らかとなつた。従って DUSP22 と DUSP1 の機能重複はないと考えられる。アポトーシス誘導に関わる p38 及び JNK の脱リン酸化に関わる他の DUSP ファミリータンパク質が、PARG/DUSP22 機能阻害条件下における細胞死誘導に寄与していないのかを今後評価していきたいと考えている。

【学会発表】

第 94 回日本薬理学会年会、2021 年 3 月 8 日～10 日

佐々木由香、藤森浩彰、小野寺貴恵、野崎中成、小泉史明、益谷美都子

肺がん細胞における PARG 及び DUSP22 の機能阻害による合成致死誘導機序の解析

【発表論文】

なし

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に心より感謝申し上げます。