

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	飯島 順子
論文題目	RAP80 Acts Independently of BRCA1 in Repair of Topoisomerase II Poison-Induced DNA Damage (RAP80 はトポイソメラーゼII毒に起因する DNA損傷をBRCA1 非依存的に修復する)		
(論文内容の要旨)			
DNA 修復因子である RAP80 は、遺伝性乳癌の原因の一つとして知られる BRCA1 と複合体を作る因子として 2007 年に報告された。しかし、遺伝子破壊細胞が作製されておらず RAP80 の機能は未だ不明であった。DNA 損傷誘導ならびにその修復の詳細な研究は、抗がん治療効果の事前予測や選択毒性の高い薬剤を用いた治療につながり、副作用、耐性発現などの現在の抗がん治療における問題点の改善が期待できる。そこで本研究では RAP80 の DNA 修復における役割を解明するために、遺伝子破壊が容易で、複数の遺伝子を欠損した二重欠損細胞の作製も可能なニワトリ B リンパ球由来の DT40 細胞から RAP80 欠損細胞を樹立し、解析を行った。 RAP80 欠損細胞は、通常の培養条件下で野生型の細胞と同様に増殖した。しかし、様々な DNA 損傷原存在下での増殖と生存率を調べたところ、RAP80 欠損細胞はトポイソメラーゼ II 毒であるエトポシドに対してのみ強い感受性を示した。エトポシドはトポイソメラーゼ II の二重鎖切断後の反応を阻害することにより細胞毒として作用する。一方、二重鎖切断を伴わずにトポイソメラーゼ II の酵素活性を阻害する ICRF-193 に対しては、RAP80 欠損細胞は高感受性を示さなかった。エトポシドにのみ強い感受性を示すという表現型は、さまざまな DNA 損傷原に高感受性を示す BRCA1 欠損細胞とは明らかに異なるものであった。 エトポシドにより誘導された DNA 切断端の 5'側には、トポイソメラーゼ II が共有結合していることが知られている。このような切断端を修復するには、まず結合したトポイソメラーゼ II を取り除き、さらに相同組換えか非同末端結合により切断端を再結合しなくてはならない。相同組換えと非同末端結合の機能を、標的組換え効率、Rad51 の集積、線状プラスミドの環状化などで調べたところ、RAP80 欠損細胞ではこれらの経路は正常に機能していることが分かった。 次に、RAP80 が DNA 切断端のトポイソメラーゼ II を除去する事により二重鎖切断の修復を促進させる可能性を調べた。トポイソメラーゼ II の除去は、BRCA1 複合体による経路と、TDP2 による経路の二つが知られている。RAP80 が BRCA1 依存的にエトポシドに起因する DNA 損傷の修復に働くかを調べるため、RAP80 と BRCA1、および、RAP80 と BRCA1 結合因子 CtIP との二重欠損細胞を作製した。これらの細胞のエトポシドに対する感受性を調べたところ、各々の二重欠損細胞では各遺伝子欠損細胞と比較して感受性が増加した。一方、RAP80 と TDP2 の二重欠損細胞のエトポシドに対する感受性は、TDP2 欠損細胞の感受性と一致した。以上の実験結果から、RAP80 は TDP2 と共に働き、BRCA1 複合体とは独立して、トポイソメラーゼ II 毒による DNA 損傷を修復することが明らかとなった。			

本研究により、トポイソメラーゼ II 毒による DNA 損傷に関わる新たな因子が同定されたことは、抗がん剤の作用機序を理解する上で重要であり、将来、治療効果の事前予測や新規抗がん剤開発に有用な情報を提供すると期待される。 （論文審査の結果の要旨） DNA 損傷誘導を起こすエトポシドなど抗がん治療剤は、悪性腫瘍への選択毒性が必ずしも高くなく重篤な副作用を起こす。患者毎に抗がん治療効果を予測する事ができれば、抗がん治療が改善できる。予測には、各 DNA 修復因子の機能を知ることが必要である。 本研究では、RAP80 の、DNA 修復における役割を明らかにする為、ニワトリ DT40 B リンパ細胞株を用い、<i>RAP80</i> 欠損細胞を樹立、表現型を解析した。 RAP80 が寄与する DNA 修復経路を明らかにする為、様々な DNA 損傷原を細胞に暴露し、細胞の生存率を調べた。その結果、<i>RAP80</i> 欠損細胞ではトポイソメラーゼ II（トポ II）毒であるエトポシドに特異的に高感受性を示した。トポ II 毒は、DNA 二重鎖切断を作り、切断端 5'末端にトポ II を結合されたままにする。そこで RAP80 がトポ II を切断端から除去する反応に関与する可能性を考えた。同様の除去反応を起こす TDP2 と RAP80 との二重欠損株を作製したところ、RAP80 は TDP2 依存的にエトポシドによる DNA 損傷を修復することが分かった。 以上の研究はトポ II 毒による DNA 損傷の修復機構の解明に貢献し、この抗がん剤を用いた治療の改善に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 2 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降