

課題番号 55

ゲノムストレス応答因子 PLK1 を介した オートファジー経路の染色体維持機構における機能考察

[1] 組織

代表者：古谷 寛治

(京都大学大学院生命科学研究科
附属放射線生物研究センター)

対応者：田中 耕三

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

がん細胞の性質として、ゲノム DNA 上に、ある程度の損傷が生じてこれら DNA 損傷ストレスに耐性を示し異常細胞増殖を続けることが知られている。これまでに我々は、DNA 損傷ストレス耐性を示し、異常増殖を促進する機構の一つとして細胞増殖促進キナーゼである PLK1 とオートファジーが協調して働くことを見出してきた。

オートファジー経路は、アミノ酸源の再利用経路であり、かつ正常細胞においてはがん抑制に非常に重要である。その一方で、オートファジー経路は、がん細胞において、がんの生存戦略として悪用されていることも知られていた。オートファジー経路はタンパク質の分解装置としての側面も持っており、非特異的、あるいは特異的なタンパク質を分解し、上述のように、アミノ酸のリサイクルに寄与するだけでなく、タンパク質ネットワークのバランスを変える働きも予想されている。

本研究では、田中耕三教授とメールにて議論を進め、がん細胞特有の分子ネットワークの変化を検出する目的で、DNA 損傷マーカーである、g-H2AX の動態に着目した研究をおこなった。H2AX は DNA を折りたたむタンパク質、ヒストンタンパク質のバリエーションであり、リン酸化されたヒストンは DNA 損傷部位に集積することが知られている。申請者の所属する施設である、京都大学、放射線生物研究センターの井倉毅准教授のこれまでの解析から、g-H2AX はヒストンアセチル化により動的に制御をうけること、g-H2AX のゲノム DNA 損傷部位への集積のパターンを細胞内で視覚化すると、アセチル化がままならない細

胞株では、g-H2AX を蛍光標識した際にドット状に見える (DNA 損傷部位が染色されて見える) パターンが人の目には違いが見えないものの、統計的には各ドットのおおきさ、明るさが異なって見えることが見出されていた。また、g-H2AX のアセチル化の異常はがん化シグナルの亢進を引き起こすことも明らかにされていた。そこで我々は、g-H2AX のドット状パターンの違いにより、がん化シグナルが亢進した細胞とそうでない細胞を見分けることができるのではないかとこの仮説にたどりついた。

近年、機械学習解析種の発展が、画像解析において大きな成果を上げている。人工知能は、人間の目では検出できない微妙な変化やパターンを識別し、その中に埋もれたルールを抽出することに長けている。

機械学習解析には、教師あり機械学習と教師なし機械学習がある。教師あり機械学習では、私たちがあらかじめつけた正解 (教師データ) を学習した機械学習モデルを使い未知のデータが正解かどうかを判定する。また、教師なし機械学習では検出したパターンの似ているものをグループ化 (クラスタリング) する。本研究では、これらの機械学習の両手法を用いることで、野生型と HAT 変異体発現細胞間の g-H2AX ドット状シグナルのパターンを解析したので報告する。

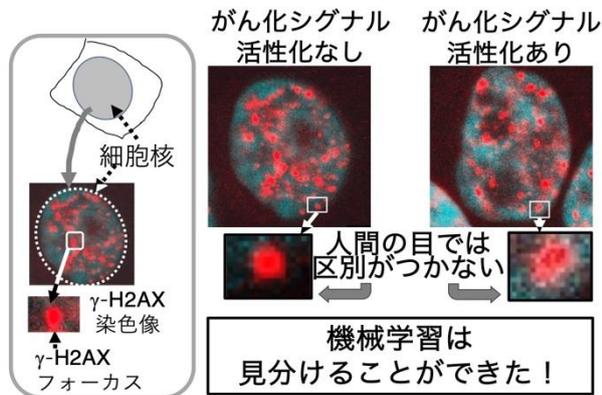
このように本年度の共同研究においては、分子として PLK1 タンパク質を直接扱わなかったものの、がん増殖とゲノムストレス応答の関連性をヒストンタンパク質の観点から機械学習を用いた解析を試みることで、PLK1 の過剰活性化も含めたがん化のプロセスに共通の要素を抽出することに成功した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

まず、教師あり機械学習を行った。g-H2AX ドットの「輝度」と「サイズ」の情報を教師データとして用いて機械学習モデルを構築することで初めて TIP60-HAT (ヒストンアセチル化酵素) 変異型細胞を効率よく言い当てることができるようになった。TIP60 による H2AX のアセチル化がままならないとがん化シグナルが亢進することを考えると、この機械学習モデルはがん化シグナルが亢進した細胞を g-H2AX ドット

のパターンから見分けることができると考えられた。また、比較的がんリスクが低い低線量率放射線においてもこの教師あり機械学習により、TIP60 HAT 変異型細胞を言い当てることができた。このことは、非常に微弱ながん化シグナルの亢進も検出できる高感度な手法となりうることを示していた（下図参照）。



次に、教師なし機械学習の中でも次元削減法と呼ばれる Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)法とクラスタリング手法である k-means 法を用い g-H2AX ドットの輝度、大きさをもとにグループ分けを試みた。その結果、HAT 変異型細胞を多く含む細胞をグループとして同定することができた。これはがん化シグナルが亢進した「細胞集団」が存在することを示しており、これらの細胞集団に共通の g-H2AX ドット状パターンの特徴が存在することを初めて実証した成果であるといえた。興味深いことに、野生型細胞のなかでもがん化シグナルが亢進した細胞に分類された細胞が見られた。野生型細胞では TIP60 のアセチル化酵素活性は保たれている。このことは、がん化シグナルが TIP60 のアセチル化阻害のみに依存しているわけではないことを示していると考えられ、PLK1 も含めたその他の因子の関与が示唆されると考えている。

(3-2) 波及効果と発展性など

今回構築した、機械学習により g-H2AX ドット状パターンからがん化シグナルが亢進しているかを判定するシステムは、低線量率放射線におけるリスク予測評価、放射線誘発がん予防などに将来的に貢献することができるシステムであると思われた。

生命現象は非常に多様であり、細胞ごと、個体ごとに転写や、細胞応答が異なることが、近年のシングルセル解析をはじめとした成果により明らかになっている。我々の成果は、細胞ごとに多様なシグナルの中から意味のある特徴的なパターンを抽出することに、機械学習によるアプローチが長けていることを表している。

今回、上述したように、機械学習解析ではがん化が亢進した細胞の教師データとしてヒストン H2AX アセチル化酵素の活性変異体を用いた。効率よく機械学習はアセチル化酵素変異体を検出できたものの、完全ではなかったことを付記する。この点について、TIP60 の野生型の細胞においてもがんシグナルに特異的な g-H2AX ドット状パターンが確認されたことに着目したい、TIP60 のアセチル化に依存しないがんシグナルに特異的な g-H2AX ドット状パターンに影響を与える因子の存在が考えられるが、例えば、PLK1 やオートファジーとの関わりも想定される。

今後はさらに因子を拡張していくことで、クロマチンを基盤としたがん化シグナルのより詳細なネットワークの同定とともに、本研究のアプローチをもってすれば、より精度の高い機械学習モデルの構築に貢献できるのではと期待している。

[4] 成果資料

原著論文

(1) Ikura M., Furuya K., Matsuda T., Ikura T. Impact of Nuclear *De Novo* NAD⁺ Synthesis via Histone Dynamics on DNA Repair during Cellular Senescence To Prevent Tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* (2022) 42 (11) : e0037922. doi: 10.1128/mcb.00379-22.

(2) Furuya K., Ikura M., Ikura T. Machine learning extracts oncogenic-specific γ-H2AX foci formation pattern upon genotoxic stress. *Genes to Cells* (2023) 28(3):237-243. doi: 10.1111/gtc.13005

学会発表

(1) 日本放射線影響学会第 65 回大会
ワークショップ企画

「放射線影響の多様性研究と放射線防護・医学物理研究の接点を探して」

演題：ゲノムストレス下におけるがん異常増殖の分子機構

発表：古谷 寛治