

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689032
 研究課題名 (和文) 家族性乳癌原因遺伝子の多様な DNA 修復能の解析による
 新規分子標的の探索
 研究課題名 (英文) Identifcataion of new molecular targets by analysis of multiple DNA
 repair activity of familial breast cancer susceptibility gene
 研究代表者
 千葉 奈津子 (CHIBA NATSUKO)
 東北大学・加齢医学研究所・准教授
 研究者番号：50361192

研究成果の概要：家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* は、その生殖細胞系列変異により、乳癌、卵巣癌を引き起こす癌抑制遺伝子である。本研究では *BRCA1* の DNA 修復能に関する機能を詳細に解析し、*BRCA1* が DNA 二本鎖切断、紫外線照射後の転写共役修復、さらには細胞分裂に関与することを明らかにした。これらの研究成果は、家族性乳癌卵巣癌に加え、散発性の乳癌、卵巣癌の発症機構の解明、新たな治療薬となる分子標的の探索、さらには乳癌、卵巣癌の予防法解明にも寄与すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：がん、DNA 修復、乳がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は、欧米では女性 8～9 人に 1 人、日本では 40 人に 1 人が罹患すると推定され、乳癌の患者数および死亡数は年々増加傾向にある。家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* は、1994 年、三木らによりポジショナルクローニングによって単離された癌抑制遺伝子である。*BRCA1* の生殖細胞系列変異による乳癌発症リスクは約 80%。卵巣癌発症リスクは約 40% と推定され、散発性癌に比較して若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高く予後不良である。

(2) 散発性癌では *BRCA1* 遺伝子変異をほとんど認めず、当初は散発性癌における *BRCA1* の

発症機構における役割は少ないと考えられた。しかし、近年、散発性乳癌全体の 30～40%、散発性卵巣癌の 70% で *BRCA1* の mRNA やタンパク発現が減少し、その頻度は悪性度の高いものほど高く、また、それらの癌で *BRCA1* 遺伝子がメチル化されていることが報告され、散発性癌の発症機構、薬剤耐性機構にも *BRCA1* が重要であることが推察された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、*BRCA1* の DNA 修復能に関する詳細な解析により、家族性乳癌卵巣癌に加え、散発性の乳癌、卵巣癌の発症機構の解明、新たな治療薬となる分子標的の探索、さらには乳癌、卵巣癌の予防法解明にも寄与するこ

とを目標とした。

3. 研究の方法

(1)細胞内での DNA 損傷をリアルタイムで解析する方法を用いた実験。

東北大学加齢医学研究所、遺伝子機能研究分野、安井明教授との共同研究により、生細胞内の DNA 損傷に対する反応を、リアルタイムで解析できる分子イメージング技術を用いた実験系により、BRCA1 の DNA 損傷部位への集積と解離をリアルタイムで詳細に観察することにより、DNA 修復における BRCA1 の機能を検討した。

このシステムは、照射用レーザー(365nm, 405nm)と共焦点レーザー顕微鏡からなり、生細胞核に DNA 単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷などのさまざまな DNA 損傷を作製し、リアルタイムで解析することができる。抗体を用いて内因性のタンパク質の集積と解離を解析することに加え、変異体や抗体の得られないタンパク質の解析には、GFP(green fluorescence protein)などの蛍光タンパク質を融合したタンパクを細胞に発現させて解析することができる。

(2)BRCA1 の紫外線損傷に対する修復能における役割。

フィルターを用いて細胞の一部に局限して紫外線を照射して、免疫染色を行い、BRCA1 やその他の修復タンパク質の紫外線照射部位への集積を観察した。

(3)新規家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 関連分子の同定とその機能解析

HA と FLAG を付加した BRCA1 やそのヘテロダイマーのパートナーである BARD1 を強制発現する細胞株を作製し、大量培養後、DNA 障害後に相互作用するタンパクを HA 抗体や FLAG 抗体を用いて、精製し、LC-MS/MS にて同定し、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1) BRCA1 の DNA 二重鎖切断部位への集積のメカニズムの解明

BRCA1 が DNA 二重鎖切断などのさまざまな障害部位に集積することを明らかにした (図 1)。

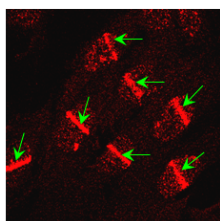


図 1. 細胞核の一部に線状にレーザーを照射し、免疫蛍光染色したところ、内因性の BRCA1 がレーザー照射部位に集積した。

さらに、リアルタイムでの BRCA1 のレーザー照射部への集積を観察するために、GFP を付加 BRCA1 を発現するベクターを作製し、その集積を観察した。図 2 のように、GFP 付加 BRCA1 はレーザー照射部位に集積した。

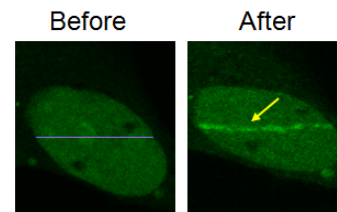
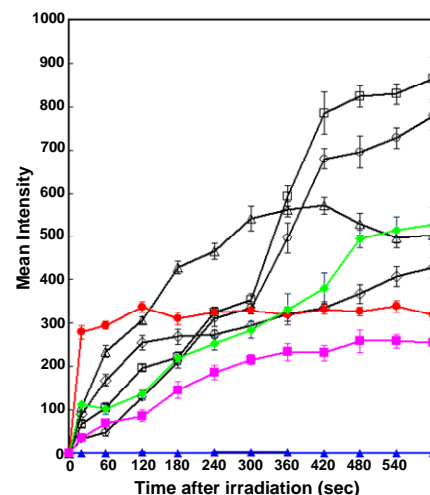


図 2. GFP 付加 BRCA1 のレーザー照射部位への集積をリアルタイムで観察した。

また、いくつかの BRCA1 の欠失変異体を作製し、その集積に必要な BRCA1 の領域を明らかにした。さらに、興味深いことに、その集積のパターンは、その領域によって異なっており、N 末端と C 末端はそれぞれ独立して集積することができ、N 末端は早く集積するのに対して、C 末端はゆっくりと集積し、そのメカニズムは異なっていることが示唆された (図 3)。



◆ GFP-BRCA1-full-length
■ GFP-BRCA1-Δ305-770
○ GFP-BRCA1-Δ775-1292
△ GFP-BRCA1-Δ1-302
◇ GFP-BRCA1-Δ1527-1863
● GFP-BRCA1-1-304
▲ GFP-BRCA1-303-1526
■ GFP-BRCA1-1528-1863

図3. BRCA1 の欠失変異体を作製し、DNA 傷害部位への集積を比較したところ、領域毎に異なる集積パターンを示した。

さらに、他の DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて、これらの BRCA1 の DNA 傷害部位への集積が、他の DNA 修復タンパクに依存しているかどうかを検討した。その結果、N 末端の集積は Ku80 タンパク質に依存し、さらに、免疫沈降法により、Ku80 と BRCA1 が相互作用することを示した。また、これまでその病的意義が知られていなかった BRCA1 の N 末端の点突然変異により、その集積と Ku80 と野相互作用が著しく減弱することを示し、BRCA1 の二本鎖 DNA 修復機構における、非相同末端再結合における関与のメカニズムを明らかにした。

(2) BRCA1 の紫外線損傷に対する修復能における役割。

フィルターを用いて細胞の一部に局限して紫外線を照射して、免疫染色を行い、BRCA1 の紫外線照射部位への集積を観察したところ、BRCA1 は紫外線照射部位に速やかに集積した。

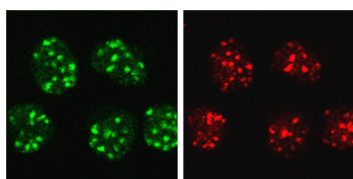


図4. BRCA1 は限局的な紫外線照射部位に集積する。左; 抗 CPD 抗体、右; 抗 BRCA1 抗体。

さらに、さまざまな DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて BRCA1 の集積を解析したところ、除去修復タンパクの欠損細胞において BRCA1 の集積が消失することが明らかとなり、さらに、免疫沈降法により、BRCA1 とその修復因子が相互作用し、かつ BRCA1 がその因子をユビキチン化することが明らかとなった。これまでこの修復タンパクと BRCA1 の相互作用などを示す報告はなく新しい知見となる。

さらに、転写阻害剤を用いた実験や siRNA を用いて、紫外線照射後の細胞増殖能を検討した実験などにより、BRCA1 が転写共役修復 (TCR) に関与することを明らかにした (論文投稿中)。

(3) 新規家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 関連分

子の同定とその機能解析

同定したいくつかのタンパクの中で、1 つのタンパクで興味深い分子が認められた。

この分子は BARD1 の BRCT ドメインに相互作用するものとして同定され、その直接結合も確認された。

その機能を解析したところ、その分子が分裂期の中心体と細胞質分裂に重要な収縮環に局在することを明らかになった。さらにこの分子を siRNA によって knockdown すると、中心体の異常と細胞周期の異常を引き起こした。

よって、この BRCA1 関連分子は細胞分裂制御に重要な働きを持つことが示唆された。今後、この分子機能のより詳細な解析により、BRCA1 の欠損細胞にみられる染色体異常性の生じるメカニズムが明らかになると考えられる。

今後これらの研究を継続することにより、家族性乳癌卵巣癌に加えて、散発性の乳癌、卵巣癌の発症機構の解明、診断や治療効果の予測のためのバイオマーカーや新たな治療薬となる分子標的の探索、さらには乳癌、卵巣癌の予防法解明にも寄与することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Wei L, Lan L, Hong Z, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Mol. Cell. Biol.* 28(24):7380-7393 (2008) (査読有)
- ② 千葉奈津子, 石岡千加史: 家族性乳癌の原因遺伝子 日本臨床 2007 年増刊 乳癌—基礎・臨床のアップデート 65(6):601-605 (2007) (査読無)
- ③ 千葉奈津子, 下平秀樹, 石岡千加史: 生殖細胞変異の遺伝子診断・家族性乳癌 *BRCA1, BRCA2* を中心に 実験医学 25(17)(増刊):2629-2634 (2007) (査読無)
- ④ Yoshioka T, Sakayori M, Kato S, Chiba N, Miyazaki S, Nemoto K, Shibata H, Shimodaira H, Ohtsuka K, Kakudo Y, Sakata Y, and Ishioka C. A dose escalation study of docetaxel and nedaplatin in patients with relapsed or refractory squamous cell carcinoma of the esophagus pretreated using cisplatin, 5-fluorouracil and

radiation. *Int J Clin Oncol.* 11(6):454-460, 2006 (査読有)

- ⑤酒寄真人, 千葉奈津子, 河原正典, 白石千子, 武田元博, 野水整, 野口眞三郎, 大内憲明, 竹之下誠一, 石岡千加史. 家族性乳癌の遺伝子検査に関わる問題点. 家族性腫瘍, 6(1):7-11(2006) (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ①千葉奈津子, 魏雷震, 蘭利, 佐竹正延, 安井明, 石岡千加史: 家族性乳癌原因遺伝子BRCA1の紫外線損傷への集積 第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月28日, 名古屋)
- ②Chiba N. and Wei L. Tumor suppressor BRCA1 response to DNA single-strand breaks induced by laser micro-irradiation. The 7th Internatopnal Symposium on Nano-Biomedical Engineering (ISNBME-7) Oct. 16-17 2008 Tainan, Taiwan
- ③Wei L, Lan L., Hong Z, Yasui A, Satake M, Ishioka C. and Chiba N. Rapid accumulation of BRCA1 at DNA double-strand breaks is dependent on Ku80. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008 Apr. 22-26 2008, Ohtsu Japan
- ④Chiba N. Recruitment of Tumor Suppressor, BRCA1 to DNA double strands induced by laser micro irradiation. 5th International Symposium of 2007 Tohoku University Global COEProgram Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Centre, Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region. Mar. 27-28 2008, Matsushima Japan
- ⑤Chiba N., Wei L, Lan L., Hong Z, Yasui A and Ishioka C. Domain-dependent accumulation of BRCA1 at the sites of DNA damage. AACR-NCI-EORTC International conference Molecular targets and Cancer Therapeutics Oct. 22-26, 2007 San Francisco U. S. A.
- ⑥魏雷震, 千葉奈津子, 蘭利, 佐竹正延, 安井明, 石岡千加史: 家族性乳癌原因遺伝子BRCA1のN末端のDNA二本鎖切断への集積 第66回日本癌学会学術総会 (2007年10月5日, 横浜)
- ⑦Chiba N, Yoshioka T, Takahashi S, Shibata H, Kato S, Shimodaira H, Otsuka K, Kakudo Y, Takahashi M, Yasuda K,

Sakamoto Y, and Ishioka C. Two cases of breast cancer responding to trastuzumab monotherapy. Asia Pacific Medical Education Initiative, 3rd Asia Pacific Workshop, Molecular targeted Therapy of Cancer Mar. 10-11. 2007, Shanghai China

- ⑧魏雷震, 千葉奈津子, 蘭利, 安井明, 石岡千加史: リアルタイム分析による家族性乳癌原因遺伝子BRCA1のDNA損傷への集積. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月28日, 横浜).

[図書] (計2件)

- ①第12章 癌、癌化: ウイルス発癌、第13章 癌化のシグナル伝達 細胞・培地活用ハンドブック 秋山徹, 河府和義編 羊土社 p126-145, 2007
- ②第26章 主な制癌剤 阻害剤活用ハンドブック 秋山徹, 河府和義編 羊土社 p420-439, 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 奈津子 (CHIBA NATSUKO)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号: 50361192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし