

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19585

研究課題名(和文) 乳癌細胞を用いたバイオアッセイによるDNA相同組み換え能と遺伝子変異のカタログ化

研究課題名(英文) Establishment of a bio-assay for DNA homologous recombination ability using breast cancer cells to catalog responsible genetic alterations

研究代表者

光武 範史 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50404215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織から初代培養した乳癌細胞を用い、オラパリブ処理後にEdU、CENP-F、53BP1に対する蛍光免疫染色を行い、G2期のDNA二重鎖切断数についてオラパリブ処理前、処理後24時間での値をスコア化し、DNA相同組み換え修復能を測定する系を確立し、siRNAを用いたBRCA1ノックダウン細胞を用いて検証を行った。

この系を用い、相同組み換え修復能が低下していると思われた5症例に対して全ゲノム解析を行った。これまでに関連が示唆されている遺伝子に該当する変異は同定されなかったが、遺伝性のモデルに合致する変異はいくつか同定された。今後、これらの機能解析が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異解析では、病的意義が判明している既知の遺伝子変異を検出した場合のみDNA相同組み換え修復能欠損があるかどうか、ひいては特定の薬剤の適応となるかが分かるが、いまだ全ての変異が明らかにされていない。しかし、実際に乳癌組織より細胞を培養し、本研究で開発した手法を用いれば、DNA相同組み換え修復能を予想でき、薬剤を選択できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have established a system to measure the ability of DNA homologous recombination repair using primary breast cancer cells directly grown from breast cancer tissues. The system uses fluorescence immunostaining for EdU, CENP-F, and 53BP1 after olaparib treatment and scores by the number of DNA double-strand breaks in the G2 phase before and after 24 h treatment. This system was validated using siRNA-based BRCA1 knockdown cells.

Using the system, we selected five cases in which homologous recombination seemed to be impaired and performed whole genome sequencing. We did not identify any known mutations which have been suggested to be associated with hereditary breast cancers; however, we identified some alterations that fit the hereditary model. The functional analysis of these genes is necessary.

研究分野：内分泌腫瘍学

キーワード：乳癌 相同組換え修復

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断は極めて重大な DNA 損傷であり、ヒト細胞では非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ)、もしくは相同組み換え (homologous recombination: HR) によって修復される。HR は、その仕組み上、S 期の終わりか G2 期でしか働かない。BRCA1/BRCA2 遺伝子変異を持つ遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) は、DNA 二重鎖切断修復のうち、この HR が働かず、これが発癌の誘因であると考えられている。近年、この HBOC に対し、Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤であるオラパリブ等が、殺癌細胞効果を示すことが明らかになってきた。PARP は細胞内で高頻度に自然発生する一本鎖 DNA 切断損傷の修復を行うが、PARP 阻害剤を投与するとこの一本鎖 DNA 切断が蓄積する。それらは細胞周期が S 期に入ると複製フォークの崩壊と二重鎖切断を引き起こすが、正常細胞では HR でその修復を行う。ところが HR 機能不全がある癌細胞では修復が行われず、細胞死を引き起こす。つまりオラパリブは、BRCA が機能している正常細胞には影響を与えず、それがない癌細胞のみを標的とできる非常に有望な薬剤である。2017 年には、BRCA 遺伝子変異陽性の転移乳癌患者における化学療法とオラパリブの比較試験において、無増悪生存期間を有意に延長させ、化学療法群の 2 倍以上の客観的奏効率を示したことが発表された。また、一部の散発性乳癌、特に Triple-negative 乳癌 (TNBC) の約 1/3 にも BRCA 遺伝子変異が認められ、これらの癌にも PARP 阻害剤が有効であることが示唆されている。

乳癌の 5-10%程度が家族性とされ、そのうち約半数に BRCA1/BRCA2 の遺伝子変異が検出される。また上記の通り、TNBC の約 1/3 にも同変異が検出される。これらに対して、PARP 阻害剤による治療を効率良く行うためには、遺伝子検査が必要であるが、下記の問題点が考えられる。

- (1) BRCA 遺伝子検査を行うと、すでに報告されている病的変異 (機能欠損が確認されているもの) 以外にも、新規の変異が見つかるが、これらの機能は未知で、病因となっているか判断が難しい。
- (2) 散発性 TNBC 等では、血液や頬粘膜細胞等からゲノム DNA を調べても、変異は検出できない。
- (3) BRCA 遺伝子に変異がない場合でも、プロモーターのメチル化、スプライシング異常などで mRNA レベルやタンパク質レベルで遺伝子機能が欠損している場合があり、これらは DNA を用いた遺伝子検査では検出できない。
- (4) BRCA1/BRCA2 遺伝子に変異が見つかるのは HBOC の約半数、散発性 TNBC の約 1/3 であり、残りの症例では他の遺伝子異常が考えられる。多数の候補遺伝子が同定されてきているが、いまだ全てが解明されたわけではなく、未知の遺伝子が原因となっている可能性もある。

以上の問題点を解決するために、本研究では癌細胞のバイオアッセイを行い、直接 HR 修復能を測定する系を確立することとした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の目的を設定した。

- (1) HR 修復不全を検出するバイオアッセイ法の確立：正常乳腺細胞株において、siRNA を用いた BRCA1 ノックダウンを行い、HR による修復能を反映するアッセイ法を確立する。
- (2) 家族性が疑われる乳癌や TNBC 症例の乳癌組織より初代培養にて増殖させた乳癌細胞を用い、上記(1)で確立した手法を用い、HR 修復能を測定する。
- (3) HR 修復能が低下した症例について、遺伝子の網羅的解析を行い、既知の遺伝子変異がないか、また新規の責任候補遺伝子がないかを調べる。
- (4) HR 修復能と遺伝子変異の関連を収集し、データベース作成 (カタログ化) を行う。

3. 研究の方法

- (1) 種々の手法を開発・検討したが、最終的には以下の手法で HR 修復能を測定した。オラパリブ、BrdU にて細胞を処理し、経時的に標本を作成、CENP-F、53BP1 に対する蛍光免疫染色を行い、G2 期における DNA 二重鎖切断数を経時的にカウントする。これをスコア化して、HR 修復能の指標とした。
- (2) 試料より抽出したゲノム DNA を用い、イルミナ社のプラットフォームにて全ゲノムシーケンシングを行った。得られた配列データは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA)にてアライメントを行い、The Genome Analysis Toolkit (GATK)パッケージを用いて処理、変異コールまで行った。また、Structural Variants (SV)のコールに関しては、GATK によってリードのリアライメント処理を行った BAM ファイルと Manta を用いて行った。得られた VCF ファイルは、Annovar と AnnotSV を用いてアノテーションを行った。HBOC に関連すると報告されている 29 遺伝子については、その領域の変異を調べた。また、新規責任遺伝子の探索には、正常部で野生型かヘテロ接合、腫瘍部ではホモ接合となっている遺伝子座を抽出した。その際、腫瘍部には正常細胞の混入も有るため、腫瘍純度を加味した計算を行った。

4. 研究成果

- (1) *BRCA1* に対する siRNA をトランスフェクションし、ウエスタンブロットにてノックダウンを確認した (図 1)。オラパリブ処理後、経時的に G2 期の DNA 二重鎖切断数測定した。最終的に、オラパリブ未処理、処理直後、処理後 24 時間の値を使用すれば、ノックダウンの効果を反映することが明らかになった。HR 修復能が低下すると、オラパリブ処理を行わなくともバックグラウンドでの DNA 二重鎖切断数が増加する。また、オラパリブによって増加した DNA 二重鎖切断数が、24 時間後でも遷延して見られた (図 2, 3)。

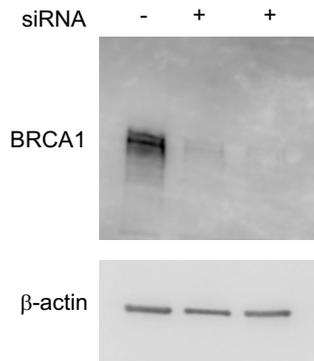


図1 siRNAによるBRCA1 K/D

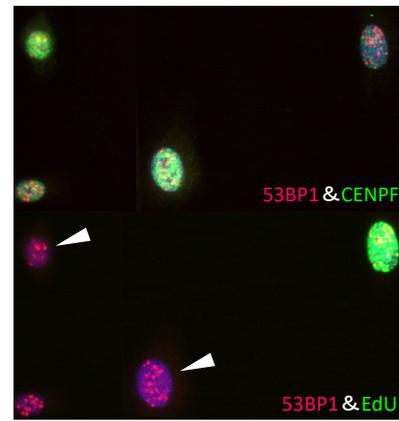


図2 G2期におけるDNA二重鎖切断像

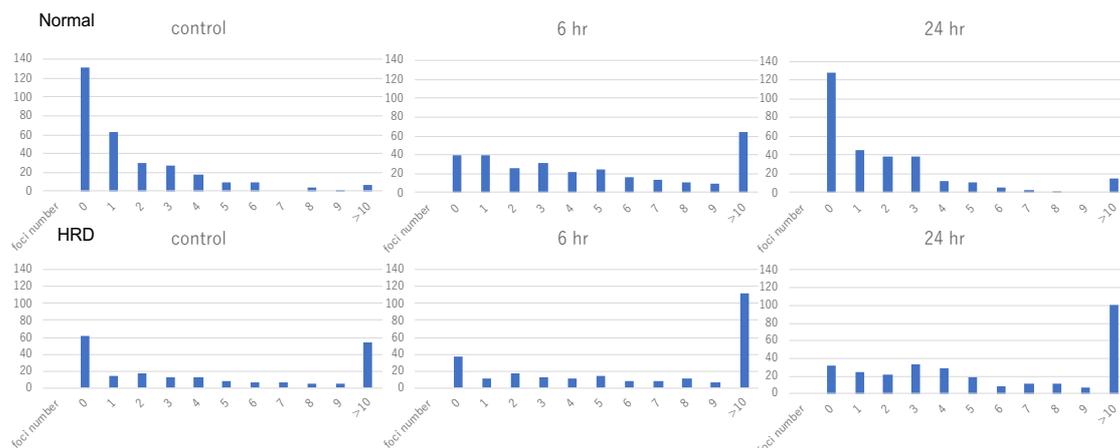


図3 G2期におけるDNA二重鎖切断数の代表的なキネティクス HRD: HR deficiency

- (2) 家族性集積が見られた 29 症例について初代培養を行い (図 4)、上記アッセイを施行、HR 修復能の低下が疑われ、そのスコアが高いものより 5 例を選択し、全ゲノム解析を行った。
- (3) 全ゲノム解析にてコールされた single nucleotide variant (SNV)、short InDel、SV (主に long Del、break point) を組み合わせた解析の結果、HBOC との関連が示唆されている *BRCA1*、*BRCA2*、*PALB2* 等

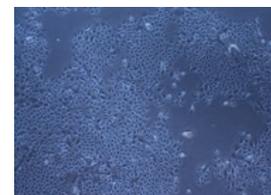


図4 代表的な乳癌細胞の培養像

を含む 29 遺伝子には、モデルと合致する遺伝子異常は発見できなかった。次に解析対象を全遺伝子に拡大し、正常部で野生型かヘテロ接合、腫瘍部ではホモ接合となっている遺伝子座を抽出した。いくつかの候補遺伝子が残ったが、登録されている遺伝子機能から容易に原因遺伝子と確定できるものはなかった。今後、培養細胞とゲノム編集等を用いた変異機能解析が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, ..., Tanaka M, Suganami T, Nakada S, Mitsutake N, Hara Y, Kato K, ..., Kaneko H, Matsumoto N, Matsuda F, Matsuo K, Takahashi Y, Mashimo T, Kojima S, Ogi T	4. 巻 6
2. 論文標題 Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd7197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd7197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saha LK, Wakasugi M, Akter S, Prasad R, Wilson SH, Shimizu N, Sasanuma H, Huang SN, Agama K, Pommier Y, Matsunaga T, Hirota K, Iwai S, Nakazawa Y, Ogi T, Takeda S	4. 巻 117
2. 論文標題 Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER-deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14412-14420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1920165117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato K, Oka Y, Muramatsu H, Vasilev FF, Otomo T, Oishi H, Kawano Y, Kidokoro H, Nakazawa Y, Ogi T, Takahashi Y, Saitoh S	4. 巻 57
2. 論文標題 Biallelic VPS35L pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jmedgenet-2019-106213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa Y, Hara Y, Oka Y, Komine O, van den Heuvel D, Guo C, Daigaku Y, Isono M, He Y, Shimada M, Kato K, Jia N, Hashimoto S, Kotani Y, Miyoshi Y, Tanaka M, Sobue A, Mitsutake N, Suganami T, Masuda A, Ohno K, Nakada S, Mashimo T, Yamanaka K, Luijsterburg MS, Ogi T	4. 巻 180
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1244. e24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Calmels Nadege, Botta Elena, Jia Nan, Fawcett Heather, Nardo Tiziana, Nakazawa Yuka, Lanzafame Manuela, Moriwaki Shinichi, Sugita Katsuo, Kubota Masaya, Obringer Cathy, Spitz Marie-Aude, Stefanini Miria, Laugel Vincent, Orioli Donata, Ogi Tomoo, Lehmann Alan Robert	4. 巻 55
2. 論文標題 Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 329 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2017-104877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中 彩, 鈴木 啓司, 松瀬 美智子, 森田 道, 大坪 竜太, 松本 恵, 久芳 さやか, 及川 将弘, 矢野 洋, 江口 晋, 光武 範 吏, 永安 武
2. 発表標題 乳がんにおけるDNA修復能の測定法の確立
3. 学会等名 第29回 日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中沢由華, 原雄一郎, 岡泰由, 小峯起, Diana, van, den, Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範吏, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn, S., Luijsterburg, 荻朋男
2. 発表標題 転写共役ヌクレオチド除去修復機構に重要なRNAポリメラーゼコピキチン化部位の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原雄一郎, 中沢由華, 岡泰由, 小峯起, Diana, van, den, Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範吏, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn, S., Luijsterburg, 荻朋男
2. 発表標題 ChIP-seqを利用したDNA損傷およびヌクレオチド除去修復のモニタリング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中沢由華
2. 発表標題 ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の分子病態
3. 学会等名 第3回名大医薬系3部局交流シンポジウム～岐阜薬科大学・岐阜大学G-CHAIN・ラクオリア創薬合同シンポジウム～
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazawa Y
2. 発表標題 Alterations in RNA polymerase II ubiquitination cause Cockayne syndrome-like premature aging phenotype in mice due to TC-NER defect
3. 学会等名 International Symposium on XP and other Nucleotide Excision Repair Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中沢 由華 (NAKAZAWA Yuka) (00533902)	名古屋大学・環境医学研究所・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------