

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06417

研究課題名(和文) ANXA2による癌抑制遺伝子BRCA2の転写抑制による発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Tumorigenesis by transcriptional suppression of Breast cancer 2, early onset (BRCA2) by ANXA2

研究代表者

吉川 泰永 (Yoshikawa, Yasunaga)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00552043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ乳腺腫瘍発症に癌抑制遺伝子BRCA2の変異や発現量の低下が関係していることを示してきた。この過程でANXA2がBRCA2転写抑制機構に関与している可能性を見出し、本研究ではこの解明を目的とした。ANXA2のノックアウトHeLa細胞はBRCA2が関わるDNA損傷に対する感受性が上昇した。しかし、BRCA2タンパク質発現量にはANXA2は関与しなかった。そこで、ANXA2自身がDNA損傷修復に貢献すると予想し、ANXA2の機能解析を行ったが、どの様にDNA損傷修復に貢献しているかは分からなかった。今後、さらに詳しい解析を行うことでANXA2のDNA損傷修復における機能が解明できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、ANXA2がどの様にDNA損傷修復に関与するかを解明する事はできなかったが、ANXA2をノックアウトするとBRCA2が関わるDNA損傷剤に対して高感受性になる事が分かった。この結果は、多機能タンパク質であるANXA2の新たな機能を見出す手がかりになると考えられる。また、ANXA2が抗癌治療のターゲットになる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have shown that mutations or decreased expression of the tumor suppressor gene BRCA2 is involved in the development of canine mammary gland tumors. While performing these studies, we found that ANXA2 may interact with novel BRCA2 silencer region and be involved in the BRCA2 transcriptional suppression mechanism. This study aimed to elucidate the possibility that BRCA2 was suppressed by ANXA2. The ANXA2 knockout HeLa cells showed increased sensitivity against the BRCA2-related DNA-damaging agents. However, reduced ANXA2 protein level was not influenced the BRCA2 protein expression. Therefore, we expected that ANXA2 itself contributes to DNA damage repair and performed functional analysis of ANXA2. However, we could not demonstrate how ANXA2 contributes to DNA damage repair in this study. Further analyses are required to reveal the function of ANXA2 in DNA damage repair.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ANXA2 BRCA2 転写 プロモーター活性 乳腺腫瘍 DNA損傷修復 発現抑制 発現調節

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

雌イヌにおいて乳腺腫瘍の発症率は著しく高く、避妊をしていない雌イヌの約50%が発症し、そのうちの半数以上が悪性腫瘍である。発症数が多いため、悪性の症例も多く臨床現場においても問題になっている。また、乳腺腫瘍を好発する品種も報告されており、ヒトと同様にイヌにおいても遺伝的な要因が存在すると考えられており、癌関連遺伝子産物の *p53*、*HER2*、*BRCA1*、*BRCA2* など様々な遺伝子の変異と腫瘍発症との関係が報告されている。申請者らのグループは、ヒトにおいて遺伝性乳癌発症の半数に関係する癌抑制遺伝子 *Breast cancer 2, early onset* (*BRCA2*) の変異がイヌにおいても乳腺腫瘍の発症に関係し、イヌにおいても乳腺腫瘍発症に重要な位置を占めることを報告してきた<sup>1-5</sup>。*BRCA2* は、ヒトならびにイヌにおいて DNA 相同組換え修復に貢献し、ゲノム安定性を維持している。この機能発現には *BRCA2* の発現量も重要であり、変異型 *BRCA2* をヘテロ接合体で保持している細胞では完全な機能を発揮できないハプロ不全の報告もされており、ヒトにおいては、*BRCA2* の発現量の低下は細胞の腫瘍化と関係していることが考えられている<sup>6</sup>。この報告と一致して、申請者らもイヌ乳腺腫瘍サンプルにおいて *BRCA2* の発現量が低下していることを明らかにし、イヌにおいてもヒトの腫瘍と同様な腫瘍化メカニズムが存在することを示唆した<sup>3</sup>。また、*BRCA2* の発現量は細胞周期依存的に制御されていることも報告されている<sup>7</sup>。すなわち、*BRCA2* が貢献する相同組換え修復が活発になる S 期を中心に G1 後期~G2 期に mRNA 量の発現量が増加する。もし、常に *BRCA2* の発現量が低下してしまうと、DNA 損傷の修復不全によりゲノム DNA に変異が蓄積し、細胞の腫瘍化の原因となると考えられる。以上のことから、*BRCA2* が関与する細胞の腫瘍化には *BRCA2* の変異だけでなく、その発現量の制御機構も関与する。実際に *BRCA2* をターゲットとする microRNA の発現量の増加と *BRCA2* の発現量低下がヒトの乳癌で証明されているが、*BRCA2* の発現量調節メカニズムの全容は未だ不明な点が多い<sup>8</sup>。

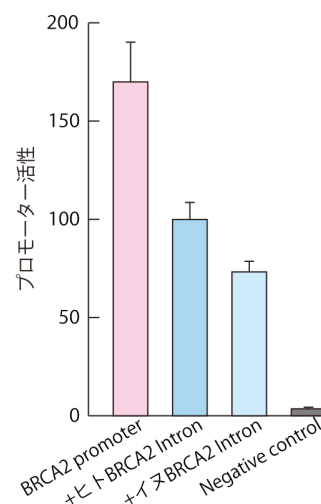


図1. *BRCA2* のイントロン1はサイレンサーとして機能する

申請者らはイヌ *BRCA2* を解析する過程において、イヌおよびヒト *BRCA2* のイントロン領域に *BRCA2* のプロモーター活性を低下させるサイレンサー配列が存在することを発見した（図1）。若手研究（B）の支援を受けつつ、解析を行ったところ、これまでに *BRCA2* のプロモーター活性を抑制する配列を 50 bp の領域に限定し、この配列と相互作用し、新規サイレンサー配列の機能を増強させる転写抑制因子として *ANXA2* を同定した（図2）。この遺伝子産物を高発現する癌細胞も報告されており、*BRCA2* の発現量低下による細胞の腫瘍化に関与している可能性も考えられる。しかしながら、この新規サイレンサー配列の解析は未だ途中で、細胞内においてこの *ANXA2* がどのように機能しているのか、および、腫瘍における *ANXA2* の高発現がどのように発癌と関わるのかが依然として不明なままである。

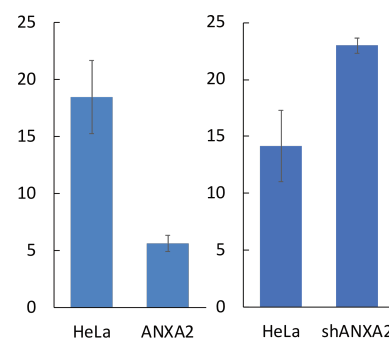


図2. *ANXA2* は *BRCA2* のプロモーター活性を抑制する

## 2. 研究の目的

本研究では、上述の二つの問いに答えるべく、以下に記載する研究を遂行する事で、新しく発見したサイレンサー配列と *ANXA2* により *BRCA2* の転写制御がどのように行われているのかを解明し、さらに乳腺腫瘍サンプルにおける *ANXA2* と *BRCA2* の発現量の疫学的な調査を行う。以上のことで *ANXA2*-*BRCA2* 軸による発癌メカニズムを機能的にも疫学的にも解明し、新しい発癌メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. DNA 損傷剤に対する感受性試験

コロニー形成試験により生存率を求めることにより DNA 損傷剤に対する感受性を求めた。

## 2. タンパク質の発現量

ウェスタンブロットにより各タンパク質の発現量を調べた。細胞質画分と核画分は、界面活性剤を添加した緩衝液を用いて分画した。

## 3. ANXA2 の局在解析

免疫染色により、ANXA2 の局在を調べた。この時、核を DAPI により対比染色した。蛍光強度を数値化するために ImageJ を用いた。

## 4. 相同組換え修復効率と非相同末端結合効率

相同組換え修復と非相同末端結合の効率は GFP をベースとした実験系を用いて、フローサイトメーターにより GFP 陽性細胞率を算出した<sup>9,10</sup>。

## 4. 研究成果

### 【ANXA2 の発現量を増減させた細胞における DNA 損傷剤に対する感受性試験】

ANXA2 をノックアウトした HeLa 細胞 (HC2-A2KO4 細胞) ならびにノックダウンした細胞 (A2-KD 細胞) を作製した。また、HC2-A2KO4 細胞は野生型の ANXA2 を強制発現させた細胞 (HC2-A2KO4-WT 細胞) も作製した。これらの細胞を用いて BRCA2 に異常があると高感受性になる各種 DNA 損傷剤 (ブレオマイシン、エトポシド、マイトマイシン C (MMC)) および、poly ADP ribose polymerase (PARP) 阻害剤である Olaparib に対する感受性を調べた。HC2-A2KO4 細胞ならびに A2-KD 細胞においては、各種 DNA 損傷剤や Olaparib に対して感受性が高くなった (図 3)。しかし、HC2-A2KO4-WT 細胞におけるこれらの薬剤に対する感受性は、もとの HeLa 細胞 (HC2 細胞) と同程度であった (図 3)。

次に外的に ANXA2 を強制発現させた HeLa 細胞 (HC2-A2pOZ 細胞) を作製し、MMC に対する感受性を調べた。HC2-A2pOZ 細胞は HeLa 細胞 (HC2 細胞) と同程度の MMC 感受性を示した (図 4)。

以上の結果から、ANXA2 は BRCA2 が貢献する DNA 損傷を誘導する薬剤に対する抵抗性を細胞に与えるが、過剰発現してもその抵抗性は増加しないことが示唆された。

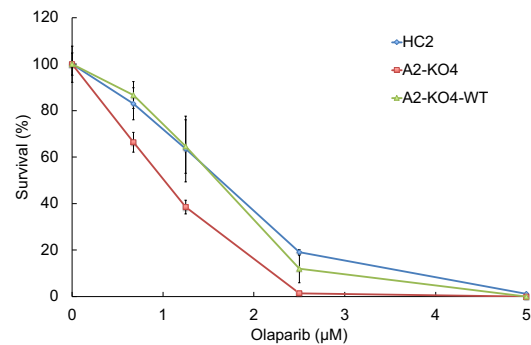


図 3. ANXA2 ノックアウト細胞は、DNA 損傷剤や Olaparib に対する感受性が上昇する。

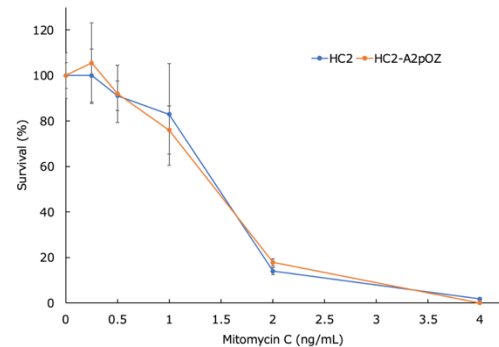


図 4. ANXA2 強制発現は、DNA 損傷剤や Olaparib に対する感受性に影響しない。

### 【ANXA2 KO 細胞の DNA 損傷修復関連タンパク質の発現量】

ANXA2 をノックアウトまたはノックダウンすると BRCA2 を要求する DNA 損傷を誘導する薬剤に対する感受性が増加したので、ANXA2 が BRCA2 の発現量を調節していると考えられた。そこで、BRCA2 を初めとした DNA 損傷修復に関与するタンパク質の発現量をウェスタンブロットにより確認した。この時、MMC 処理後の細胞における発現量も比較した。DNA 損傷修復関連タンパク質として RPA2、FANCD2、BRCA2 の発現量を調べたが、ANXA2 のノックアウトや相補によってそれらのタンパク質の発現量に差は認められなかった (図 5)。

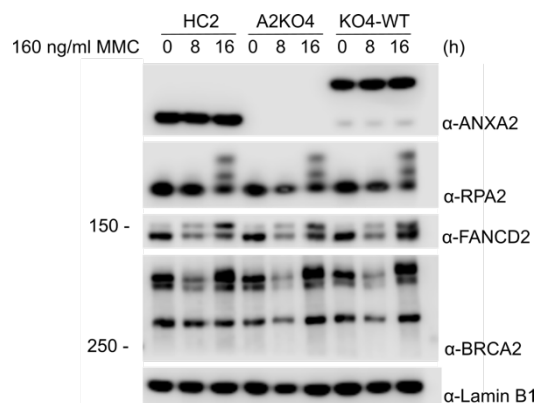


図 5. ANXA2 は、BRCA2 等の DNA 損傷修復に関わるタンパク質の発現量に影響しない。Lamin B-1 をローディングコントロールとして使用した。

## 【ANXA2 の DNA 損傷修復における機能解析】

ANXA2 は BRCA2 を要求する DNA 損傷修復に貢献するが、BRCA2 のタンパク質発現量には影響がなかった。そこで、ANXA2 が直接もしくは間接的に DNA 損傷修復に関わることが考えられた。そこで、以下の解析をすることで ANXA2 の DNA 損傷修復における機能を解明できないか挑戦した。

### 1. ANXA2 の核移行

ANXA2 の多くは細胞質に存在し、X 線照射後に核移行することが報告されていた<sup>11</sup>。また、DNA 損傷修復のシグナル伝達を行うキナーゼである ATR の下流で ANXA2 がリン酸化され、このリン酸化が核移行に重要である事も報告されていた<sup>12</sup>。そこで、X 線照射後および ATR 阻害剤である VE821 処理後の ANXA2 の局在をウェスタンブロッティングや ANXA2 の免疫染色により調べた (図 6, 7)。

X 線無処理後の細胞における ANXA2 の局在は、ウェスタンブロッティングと免疫染色共に細胞質内の ANXA2 よりも核内のタンパク質量が多く、また、X 線照射することで核内の ANXA2 の増加は観察されなかった。(図 6, 7)。この結果は細胞質に多くの ANXA2 が局在する既報と異なる結果であった。

常に ANXA2 は核に優位に存在していたので、ATR 阻害剤である VE821 によって ANXA2 の核移行が阻害できるかを調べた。VE821 存在下で ANXA2 の免疫染色を行ったが、VE821 処理の有無で ANXA2 の核移行能に有意な差はなかった (図 7)。

### 2. ANXA2 の相同組換え修復効率、非同末端結合効率への影響

ANXA2 は核に局在し、核内で機能していることが推察された。そこで、ANXA2 が BRCA2 の機能が関わる相同組換え修復や非同末端結合に及ぼす影響を調べた。HC2-A2-KO4 細胞と HC2-A2-KO4-WT 細胞とを比較したが、相同組換え修復効率や非同末端結合効率は、同程度であった。

## 【まとめ】

ANXA2 は BRCA2 のプロモーター活性を低下させ、そのノックダウン、ノックアウト細胞は DNA 損傷剤に対して感受性が上昇した。以上の事から BRCA2 の発現量を変化させて、各種 DNA 損傷剤に対する感受性が上昇したと考えた。しかしながら、ANXA2 をノックアウトしても BRCA2 のタンパク質量は変化しなかった。そこで、ANXA2 自身が相同組換え修復に貢献すると予想し、ANXA2 の機能解析を行ったが、既報とは異なる結果も得られ、どの様に DNA 損傷修復に貢献しているかは本研究からは分からなかった。今後、さらに詳しい解析を行うことで ANXA2 の DNA 損傷修復における機能が解明できると考えられる。

## 【参考文献】

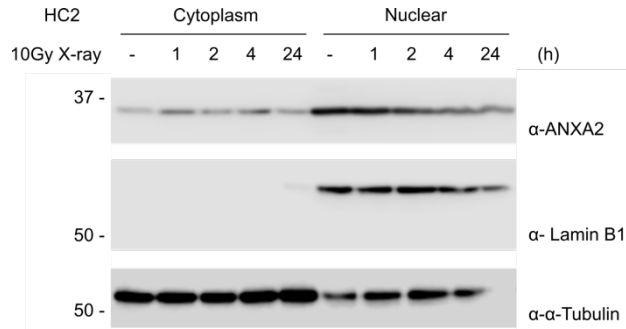


図 6. ANXA2 は、核画分に多く存在する。Lamin B1 と Tubulin は核と細胞質のマーカーである。

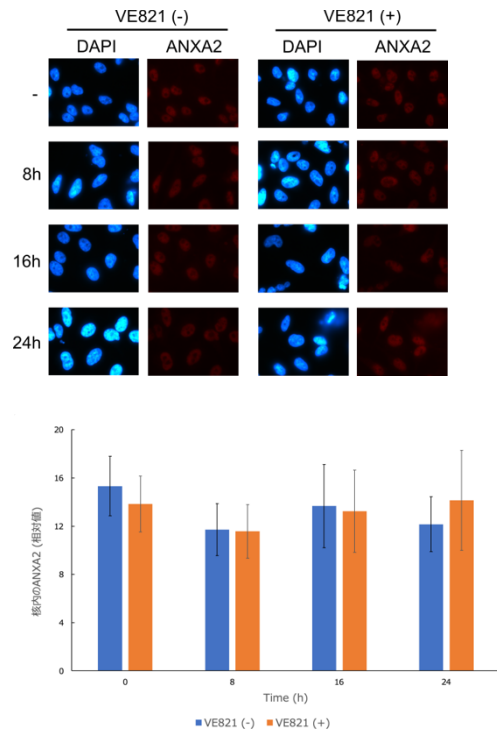


図 7. ANXA2 は、核画分に多く局在する。DAPI は核の対比染色である。下のグラフは描くにおける蛍光強度を定量した結果である。

1. Rivera, P. *et al.* Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69, 8770–8774 (2009).
2. Yoshikawa, Y. *et al.* Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. *Plos One* 7, e45833 (2012).
3. Yoshikawa, Y. *et al.* Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *Bmc Vet Res* 11, 159 (2015).
4. Yoshikawa, Y. *et al.* Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 67, 1013–1017 (2005).
5. Yoshikawa, Y. *et al.* Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. *Am J Vet Res* 69, 1323–1328 (2008).
6. Tan, S. L. W. *et al.* A Class of Environmental and Endogenous Toxins Induces BRCA2 Haploinsufficiency and Genome Instability. *Cell* 169, 1105–1118.e15 (2017).
7. Wang, S. C., Lin, S. H., Su, L. K. & Hung, M. C. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234, 247–251 (1997).
8. Song, L. *et al.* Up-regulation of miR-1245 by c-myc targets BRCA2 and impairs DNA repair. *J Mol Cell Biol* 4, 108–117 (2012).
9. Pierce, A. J., Johnson, R. D., Thompson, L. H. & Jasin, M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Gene Dev* 13, 2633–2638 (1999).
10. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. & Stark, J. M. Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *Plos Genet* 4, e1000110 (2008).
11. Waters, K. M. *et al.* Annexin A2 Modulates Radiation-Sensitive Transcriptional Programming and Cell Fate. *Radiation research* 179, 53–61 (2013).
12. Fujii, A. *et al.* DNA damage in human glomerular endothelial cells induces nodular glomerulosclerosis via an ATR and ANXA2 pathway. *Sci Rep-uk* 10, 22206 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshikawa Yasunaga, Kimura Shunta, Soga Akira, Sugiyama Makoto, Ueno Aki, Kondo Hiroki, Zhu Zida, Ochiai Kazuhiko, Nakayama Kazuhiko, Hakozaki Jun, Kusakisako Kodai, Haraguchi Asako, Kitano Taisuke, Orino Koichi, Fukumoto Shinya, Ikadai Hiromi	4. 巻 15
2. 論文標題 Plasmodium berghei Brca2 is required for normal development and differentiation in mice and mosquitoes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 244 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-022-05357-w	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 Zhu Zida, Kitano Taisuke, Morimatsu Masami, Ochiai Kazuhiko, Ishiguro-Oonuma Toshina, Oosumi Kosuke, Lin Xianghui, Orino Koichi, Yoshikawa Yasunaga	4. 巻 10
2. 論文標題 A Highly Conserved Region in BRCA2 Suppresses the RAD51-Interaction Activity of BRC Repeats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 145 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci10020145	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 Zhu Zida, Kitano Taisuke, Morimatsu Masami, Tanaka Arisa, Morioka Ryo, Lin Xianghui, Orino Koichi, Yoshikawa Yasunaga	4. 巻 23
2. 論文標題 BRCA2 C-Terminal RAD51-Binding Domain Confers Resistance to DNA-Damaging Agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4060 ~ 4060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074060	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 Yoshikawa Yasunaga, Kozuma Hajime, Morimatsu Masami, Sugawara Kaori, Orino Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced translation efficiency due to novel splicing variants in 5' untranslated region and identification of novel cis-regulatory elements in canine and human BRCA2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-020-00336-4	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 YOSHIKAWA Yasunaga, MORIMATSU Masami, OCHIAI Kazuhiko, ISHIGURO-OONUMA Toshina, MORIOKA Ryo, OKUDA Kento, ORINO Koichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Identification of the core motif of the BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain by comparing canine and human BRCA2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 759 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0006	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉川泰永、木村俊太、曾賀晃、杉山真言、朱子達、中山和彦、草木迫浩大、北野泰佑、折野宏一、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫Plasmodium bergheiにおける相同組換えタンパク質Brca2機能解析
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林香慧、北野泰佑、落合和彦、酒井洋樹、折野宏一、吉川泰永
2. 発表標題 ANXA2がイヌ血管肉腫細胞の遊走能に及ぼす影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村駿太、吉川泰永、曾賀晃、杉山真言、朱子達、中山和彦、草木迫浩大、北野泰祐、折野宏一、福本晋也、筏井宏実
2. 発表標題 Plasmodium berghei(ネズミマラリア原虫)における減数分裂関連タンパク質Brca2の機能解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朱子達、北野泰佑、森松正美、折野宏一、吉川泰永
2. 発表標題 BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain confers resistance to DNA-damaging agents
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上妻 創、吉川 泰永、森松 正美、落合 和彦、折野 宏一
2. 発表標題 癌抑制遺伝子Brca2のイントロン 1 における発現調節機構の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川泰永、森松正美、上妻創、折野宏一
2. 発表標題 癌抑制遺伝子BRCA2の翻訳効率に影響を与えるスプライシングバリエーション
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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	佐々木 宣哉  (Sasaki Nobuya)  (20302614)	北里大学・獣医学部・教授    (32607)	

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
---------	---------