

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22700888

研究課題名（和文） 癌細胞の変異BRCA1遺伝子修正による乳癌発生機序の解明

研究課題名（英文） Understanding the molecular mechanisms of breast cancer by targeting mutant BRCA1 in hereditary breast cancer cells

研究代表者

シバスダラン カルナン (SIVASUNDARAM KARNAN)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30557096

研究成果の概要（和文）：

本研究では、癌抑制遺伝子 *BRCA1* の変異によるヒト遺伝性乳癌発生の分子基盤を理解するため、当該研究に寄与しうる実験系の作出を目指した。まず、*BRCA1* ホモ変異を有する2種類のヒト遺伝性乳癌由来細胞株に対して遺伝子ターゲティング法による *BRCA1* 変異の修正を試みた。また、野生型 *BRCA1* 遺伝子を有する不死化ヒト気道上皮細胞株 MCF-10A に対して同遺伝子ミスセンス変異2種類の導入（ノックイン）を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we sought to generate experimental platforms that help to understand the mechanism of how a mutation of *BRCA1* tumor suppressor gene leads to the onset of human hereditary breast cancer. To this end, we used the technology of human somatic cell gene targeting in an attempt to perform the targeted correction of *BRCA1* mutations in 2 cell lines derived from human hereditary breast cancers harboring homozygous *BRCA1* mutations, as well as the targeted knock-in of 2 missense mutations into an immortalized human breast epithelial cell line MCF-10A which carries wild-type *BRCA1*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん制御遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌抑制遺伝子 *BRCA1* は、多くの遺伝性乳癌・卵巣癌において2本のアレルの両方に癌原性不活化変異をきたし、正常な機能を喪失している。*BRCA1* タンパク質の果たす生物学

的機能は、DNA 障害の修復、細胞周期チェックポイント、染色体安定性、クロマチン構造の保持、X 染色体不活性化、エストロゲンレセプターの発現制御など多岐にわたることが知られている。その一方、これらの機能のうちどれが真に癌抑制に重要であるかは未

だ確定的ではなく、また完成した癌がその癌形質を維持するために依然として *BRCA1* 変異に依存しているのか否かも明らかでない。

このような疑問点について解明の端緒を開き、多彩な *BRCA1* 遺伝子の機能を正確に理解するためには、アーチファクトを極力排除し、確定的な結論を導くことのできる実験系を作成する必要がある。

2. 研究の目的

(1) 上述のような状況を考慮し、本研究では *BRCA1* ホモ変異を持つ遺伝性乳癌由来のヒト細胞株に対して遺伝子ターゲティングを行い、一方の *BRCA1* アレルを野生型に修正することにより機能性 *BRCA1* タンパク質を還元することを計画した。また、野生型 *BRCA1* 遺伝子を持つ不死化ヒト乳腺上皮細胞株に対して *BRCA1* の機能を全面的に、または部分的に不活化する 2 つのミスセンス変異を導入（ノックイン）することも計画した。これらの計画の実施により樹立される遺伝子改変細胞クローンと対照細胞（親株など）とは、改変される *BRCA1* アレルだけを遺伝学的な相違点とし、他は理論上まったく同一である。したがってこの細胞クローンと対照細胞とのペアは、今後 *BRCA1* 遺伝子機能の解明に向けて様々な生物学的解析を行う際に有用な研究資材として使用できる。たとえば、同細胞クローンペアに DNA 障害刺激を加え、DNA 修復や細胞周期チェックポイントの分子機構が正常に機能するか否かを検討することや、DNA 修復能の破綻の結果ゲノムの数的・構造的異常が蓄積するか否かを検討することができる。

(2) また、同細胞クローンペアの増殖因子・足場非依存性増殖能や免疫不全マウスの皮下に細胞を接種した際の造腫瘍能・遠隔臓器への転移能の検討を行うこともできる。このような癌形質の指標を測定することにより、*BRCA1* 変異の結果完全に形質転換を遂げた乳癌細胞が、癌形質の維持のためになお *BRCA1* 変異に依存しているか否かの手がかりを得ることができる。

また、*BRCA1* の転写制御因子としての機能に鑑み、樹立した細胞クローンペアの遺伝子発現解析を行うことも有用と考えられる。発現変動をきたす遺伝子を同定することにより、*BRCA1* 下流の転写制御ネットワークを明らかにすることができる。

3. 研究の方法

(1) *BRCA1* 遺伝子修正の対象には、異なる

BRCA1 変異を有する 2 つの遺伝性乳癌由来細胞株 HCC1937 と SUM1315M02 を採用した。HCC1937 は *BRCA1* 不活化細胞株として最も高頻度で使用される細胞株であり、*BRCA1* 両アレルのエクソン 20 に一塩基対挿入によるフレームシフト変異 5382insC を有する。また SUM1315M02 は、*BRCA1* 両アレルのエクソン 2 に二塩基対欠失によるフレームシフト変異 185delAG を有する。5382insC と 185delAG は、*BRCA1* 遺伝子全体に広く分布する不活化変異スペクトラムの中でも特に高頻度に見られる変異である。

(2) また、*BRCA1* 変異ノックインの対象には、自然不死化した非癌ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A を採用した。現在までに、*BRCA1* の他の不活化変異のノックインや *KRAS* や *PIK3CA* など他の遺伝子の改変に MCF-10A が用いられてきたため、本研究の遺伝子ターゲティングにも同細胞株を採用することとした。導入する遺伝子変異は 2 種類とし、ひとつは、遺伝性乳癌患者で高頻度に検出されるため腫瘍原性の明らかな *BRCA1* 遺伝子エクソン 5 上の一塩基置換を選択した。他方は、*BRCA1* タンパク質の BARD1 タンパク質との結合能は保持しつつユビキチンリガーゼ機能をほぼ廃絶させるエクソン 2 上の二塩基置換を選択した。

(3) *BRCA1* 遺伝子変異修正および遺伝子変異ノックイン用のターゲティングベクターは、それぞれアデノ随伴ウイルスの骨格を用いて作成した。薬剤選択用マーカー遺伝子にはネオマイシン耐性遺伝子を使用した。両側のホモロジーアームとしてそれぞれ約 1 kb のゲノム配列を PCR によって増幅し、プラスミドに連結した後、塩基配列確認を行った。構築したベクター作成用プラスミドはヘルパータンパク質発現ベクター、RepCap タンパク質発現ベクターとともに HEK293 細胞に一過性導入し、産生したアデノ随伴ウイルスベクターを型通りに回収して遺伝子ターゲティングに使用した。

(4) 遺伝子ターゲティングは、ターゲティングベクターをそれぞれの実験に応じて HCC1937 や SUM1315M02、MCF-10A に感染させることによって行った。感染細胞を多数の 96 穴細胞培養用プレートに播種し、G418 による薬剤選択を行った。過去の報告に従い、形成された単一細胞由来クローン群を多重プールし、抽出した DNA 検体に対する PCR スクリーニングによって遺伝子改変クロンの探索を行った。

4. 研究成果

(1) まず、*BRCA1* ホモ変異を持つ遺伝性乳癌由来ヒト細胞株に対して遺伝子ターゲティングを行い、同変異アレルの一方を修正し、野生型 *BRCA1* タンパク質を復元することを目指した。アデノ随伴ウイルスの骨格を持つ *BRCA1* 遺伝子修正用ターゲティングベクターを HCC1937 と SUM1315M02 細胞に感染させ、G418 選択の後、遺伝子修正クローンを同定するため PCR スクリーニングを行った。しかし遺伝子修正クローンの単離が容易でなかったため、実験行程を見直し、プロモータートランプ法の導入、調整培地の使用、ベクターと宿主細胞の比率の調整、薬剤選択時の G418 濃度および薬剤開始のタイミングの調節など、様々な実験条件を検討しつつ遺伝子ターゲティングを繰返し試行した。しかし、最終的にこの方法では目的とする *BRCA1* 遺伝子改変クローンを単離することはできないと判断した。HCC1937 細胞においては、スクリーニング PCR 陽性の細胞集団数個は確保され、塩基配列の確認によっても DNA 相同組換えによる遺伝子修正が起きていることは確認された。しかし、そこから目的の単一細胞クローンを得る過程で遺伝子改変細胞を失うことが続き、機能性 *BRCA1* 遺伝子の復元が何らかの理由で細胞の増殖または生存に不利に働く可能性が示唆された。一方、SUM1315M02 細胞ではスクリーニング PCR の段階で明瞭な陽性の結果を得ることはできなかった。このことは SUM1315M02 が HCC1937 以上に機能性 *BRCA1* 遺伝子によって不利益を被る可能性を示唆すると考えられるが、一方でターゲティングベクターの構築など技術的な面に問題があった可能性も否定できない結果となった。

(2) 次に、2 本の野生型 *BRCA1* アレルを持つ非癌ヒト乳腺上皮細胞株を対象とし、*BRCA1* アレルの一方にミスセンス変異を導入（ノックイン）する試みを行なった。エクソン 5 とエクソン 2 のミスセンス変異を導入するため、前述の実験と同様、アデノ随伴ウイルスに基づく 2 種類の遺伝子変異ノックイン用ターゲティングベクターを構築し、不死化ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A に感染させた。細胞の G418 選択後、単一細胞由来クローンのスクリーニングを PCR に基づくアッセイによって行った。これらの試行のうち、エクソン 5 の一塩基置換に関しては、複数回の試行にもかかわらず *BRCA1* 変異ノックインクローンを得ることができなかった。原因は明らかでないが、*BRCA1* 遺伝子は 5'末端近傍のエクソン 1、2 を除きほとんどのエクソンが密度の濃い多数の繰返し配列の中に散在しているため、ひとつの仮説として、ホモロジーアーム中で繰返し配列の占める割合が高くなることが正

確な相同組換えを阻害し、遺伝子ターゲティングを困難にしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Luring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17773-8, 2011. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1110969108
- ② Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, Suh YL, Kim SH, Kim JY, Kim SJ, Kim WS, Seto M, Ko YH. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-300, 2011. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2010-07-297861
- ③ Kagami Y, Karnan S, Nakagawa A, Oshiro K, Kato H, Koike K, Morishima Y, Seto M. Establishment of an adult T-cell leukemia cell line (HU-ATTAK) dependent for proliferation on human umbilical cord vein endothelial cells. *The Open Leukemia Journal*, 4: 1-8, 2011. 査読有 DOI: 10.2174/1876816401104010001
- ④ Kato H, Kagami Y, Nakagawa M, Karnan S, Yatabe Y, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. FIL-4/CD40L co-stimulation induces long-term proliferation for CD10-positive germinal center B cell-like diffuse large B-cell lymphomas. *The Open Leukemia Journal*, 3: 60-68, 2010. 査読有 DOI: 10.2174/1876816401003010060

[学会発表] (計 5 件)

- ① Konishi H, A mutation in a single BRCA1 allele leads to genomic instability in human breast epithelial cells、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ② 小西裕之、BRCA1 ヘテロ変異によってヒト乳腺上皮細胞にゲノム不安定性が発生する、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館（京都府）
- ③ シバスンダラン・カルナン、ヒト体細胞株における PIGA 遺伝子を利用した遺伝子ターゲティング効率定量系の作成、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、国立京都国際会館（京都府）
- ④ 小西裕之、ヒト培養細胞遺伝子改変の新技術を用いた癌関連遺伝子の機能解析、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場（大阪府）
- ⑤ 小西裕之、ヒト培養細胞遺伝子改変の新しい技術を用いた癌関連遺伝子の機能解析、第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日、神戸国際展示場（兵庫県）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

○報道関連（計2件）

- ① 平成23年10月12日、朝日新聞、朝刊、「遺伝性乳がん 治療法へ期待：発生メカニズム一部解明」、共著発表論文①（*Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17773-8, 2011）に関する紹介記事
 - ② 平成23年10月12日、中日新聞、朝刊、「遺伝性乳がんの発生 変異遺伝子が直接関与」、共著発表論文①（*Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17773-8, 2011）に関する紹介記事
- アウトリーチ活動（計1件）
- ① 平成23年11月25日、インストラクター、大学研究室訪問による一日体験科学学習（私立豊川高等学校）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

シバスンダラン カルナン

(SIVASUNDARAM KARNAN)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30557096

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし