

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580399

研究課題名(和文) 乳癌原因遺伝子BRCA2の変異を基点としたゲノム不安定化による腫瘍発症機構の解析

研究課題名(英文) Tumorigenic effects of BRCA2 mutation and genomic instability in dogs

研究代表者

森松 正美 (MORIMATSU, Masami)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：70241370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺腫瘍はヒトと同様にイヌでも発症頻度が高い重要な疾患である。遺伝性乳癌の原因として知られる癌抑制遺伝子BRCA2の変異はゲノム不安定化を通じて腫瘍発症率を高めることがヒトで確立されており、イヌでも腫瘍発症の原因となることを示唆する報告があるものの不明な点が多い。本研究では、イヌBRCA2の変異を解析する方法を確立し、BRCリピートのミスセンス変異を発見してその意義を探るとともに、ガン抑制遺伝子であるREIC/Dkk-3のイヌでの機能解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Mammary tumors are the most common tumor type in both human and canine females. In women, carriers of mutations in BRCA2, a tumor suppressor gene product, have a higher risk of breast cancer. Canine BRCA2 has also been suggested to have a relationship with mammary tumors. However, clearly deleterious BRCA2 mutations have not been identified in any canine mammary tumors, and effects of BRCA2 mutations on tumorigenicity and genomic instability in dogs are unknown. In this study, 1. a PCR analysis method for canine BRCA2 was established, 2. effects of the missense mutations in canine BRCA2 on BRC repeats were elucidated, 3. tumour suppressor function of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumors was analyzed.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：生体情報 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

BRCA2は遺伝性乳癌の原因遺伝子 (breast cancer susceptibility gene)として乳癌家系で同定された。代表者らは、BRCA2の遺伝子産物が、放射線等によって受けたDNAの損傷を修復する機能を有することを発見し、組換え酵素Rad51を結合してDNA損傷部位にこれを運び修復する必須の分子であることが判明した。この発見をきっかけとして、それまで癌に関連する遺伝子は、Oncogene(癌遺伝子)、Tumor suppressor gene(癌抑制遺伝子)の2つに大別されてきたものに、新たなカテゴリーとしてGenome-stability gene(ゲノム安定化遺伝子)を加えて考えられるようになった。しかし、ゲノム不安定化の結果、どのような機構で細胞が癌化するかについては不明な点が多い。

乳腺腫瘍は、雌イヌにおいて全腫瘍の約半数を占め、発症頻度の著しく高い重要な疾患である。イヌの乳腺腫瘍では腫瘍細胞染色体の異数性というゲノムの不安定化の特徴が報告されていることをヒントに、申請者らはイヌの乳腺腫瘍にBRCA2が関与すると予想して研究を展開してきた。そして、これまでに腫瘍症例からBRCA2分子の機能を障害する変異の発見等について報告してきた。また、最近の腫瘍症例を対象とした連鎖解析の結果よりイヌBRCA2が乳腺腫瘍の発症に関与することが報告された。しかし、BRCA2の変異がイヌの乳腺腫瘍においてもゲノム不安定化をもたらすのか、もたらすとしてそれが腫瘍の発症にどのように影響するか等は、まったく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1.イヌの乳腺腫瘍の発症機構について、遺伝性乳癌原因遺伝子BRCA2の変異を基点とするゲノム不安定化に焦点をあてて、腫瘍細胞において特定の遺伝子に変化が認められるかどうかを調べること、2.変異が予想される癌遺伝子やいくつかの癌抑制遺伝子、ゲノム安定化遺伝子の機能解析を通じてイヌの乳腺腫瘍発症機構の解明をめざすこと、とした。

3. 研究の方法

(1) 癌抑制遺伝子BRCA2のPCR法による変異解析法の確立

健常イヌのゲノムDNAおよびcDNAを用いて、BRCA2の全エキソンおよび翻訳領域を複数の領域に分割してPCRを行った。さらに、そのPCR産物の配列を解析することでBRCA2の変異解析法を確立した。次に翻訳領域のコンセンサス配列を決定するために、健常イヌ3検体分のcDNAを解析し、既にデータベースに登録されている7種類の配列と比較した。発見した多型のうち出現頻度が高いものについては、健常イヌ22検体を追加して頻度を確認し、コンセンサス配列を決定した。さらに50検体分の乳腺腫瘍組織で、エキソン3、11、14~26を解析した。

(2) イヌ乳腺腫瘍で発見した癌関連遺伝子産物BRCA2における変異BRC3の機能解析

46検体のイヌの乳腺腫瘍組織からゲノムDNAを抽出し、エキソン11の塩基配列を決定した。BRC repeat 3 (BRC3)に存在するT1425P、K1435Rに注目して変異体を作製し、プルダウン法及び哺乳類ツーハイブリッド法でRAD51との結合を解析した。

(3) 放射線治療抵抗性がんに対するRAD51の制御を基軸とした機能分子による新規治療戦略の開発

ヒトとイヌのBRC4配列比較より見出されたV1532I置換に加え、RAD51との親和性をより高める既報のアミノ酸置換を行った。BRC(V1532I/Y-S2-F)を作製し、RAD51との親和性の変化およびDNA損傷修復に必須なRAD51自己会合体の形成阻害能を検討した。また、イヌ由来のがん細胞株におけるRAD51発現の差異についても検討した。

(4) がん抑制遺伝子REIC/Dkk-3イヌホモログの構造と乳腺腫瘍に対するアポトーシス誘導能の解析

ヒトとマウスでREIC/Dkk-3遺伝子の発現量が多いイヌ小脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりイヌREIC/Dkk-3翻訳領域を増幅・配列決定した。次にイヌ正常24組織におけるREIC/Dkk-3 mRNA発現量をRT-PCR法により解析した。また、正常および乳腺腫瘍組織でのREIC/Dkk-3タンパク質発現量をウエスタンブロットングにより比較した。さらにヒト

REIC/Dkk-3発現アデノウイルスベクター (Ad-hREIC/Dkk-3)を用い、イヌ乳腺腫瘍細胞株でアポトーシス誘導実験を行った。

4. 研究成果

(1) 癌抑制遺伝子BRCA2のPCR法による変異解析法の確立

PCR法によるBRCA2の変異解析法を確立し、コンセンサス配列も決定した。腫瘍組織における変異解析の結果、ミスセンス変異を13種類、サイレント変異を5種類発見したが、検体数の少なさのため、これらの変位と乳腺腫瘍発症との因果関係は不明であった。しかし、今回確立した変異解析法およびコンセンサス配列は今後のイヌBRCA2研究の発展に貢献できると考えられた。

(2) イヌ乳腺腫瘍で発見した癌関連遺伝子産物BRCA2における変異BRC3の機能解析

塩基配列解析の結果10種類のミスセンス変異を発見した。そのうち2種類のミスセンス変異 (T1425P, K1435R) はBRC repeat 3 (BRC3) に存在した。in vitro並びに培養細胞を用いた実験系において変異型BRC3とRAD51との結合性および変異型BRC3のRAD51オリゴマー形成に与える影響を調べた。いずれの変異もBRC3の機能に影響を与えたが、特にT1425P変異体はほぼ完全に機能を失っていたので、乳腺腫瘍発症と関わっていると考えられた。以上のことから、イヌにおいてもBRCA2の変異が乳腺腫瘍発症と関係していることが強く示唆された。

(3) 放射線治療抵抗性がんに対するRAD51の制御を基軸とした機能分子による新規治療戦略の開発

V1532I/Y-S2-Fは対照としたヒト由来野生型BRCと比較してRAD51との結合が約180倍に増強した。さらにRAD51自己会合体の形成についても強力に阻害した。また、イヌ由来がん細胞株でのRAD51タンパク質発現量は細胞株によって差異があり、今後、各細胞の放射線感受性を精査して本機能分子が放射線治療感受性に及ぼす影響を検討する必要がある。

(4) がん抑制遺伝子REIC/Dkk-3イヌホモログの構造と乳腺腫瘍に対するアポトーシス誘導能の解析

クローニングしたイヌREIC/Dkk-3ホモログは、既に登録されているイヌREIC/Dkk-3予測配列 (XM_534060.3) より213塩基、71アミノ酸長く、ヒトでがん細胞にアポトーシスを誘導するN末端の78アミノ酸領域を高度に保存していた。また、正常24組織におけるmRNA発現解析より、イヌREIC/Dkk-3はヒトとマウス同様全身性に発現していることが明らかとなった。REIC/Dkk-3タンパク質は正常乳腺組織では発現が見られたが、乳腺腫瘍組織および乳腺腫瘍由来細胞株では発現が減少していた。さらにAd-hREIC/Dkk-3により、イヌの乳腺腫瘍細胞株においてもcaspase-3活性化経路によるアポトーシス誘導が観察された。

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 3件)

Ochiai, K., Watanabe, M., Azakami, D., Michishita, M., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Methenukul, P., Chahomchuen, T., Aoki, H., Kumon, H., Morimatsu, M., Omi, T. 2013, Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours. *Vet. J.*, 197(3): 769-775. (査読有)
doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.024

Yoshikawa, Y., Ochiai, K., Morimatsu, M., Suzuki, Y., Wada, S., Taoda, T., Iwai, S., Chikazawa, S., Orino, K., Watanabe, K. 2012, 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(10): e45833. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0045833

Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Okuda, K., Taoda, T., Chikazawa, S., Shimamura, A., Omi, T., Bonkobara, M., Orino, K., Watanabe, K. 2012, Establishment

of a PCR analysis method for canine BRCA2.
BMC Res. Notes, 5(1):173. (査読有)
doi: 10.1186/1756-0500-5-173

〔学会発表〕(計 7件)

落合和彦、渡部昌実、宇田川智野、森松正美、大沼俊名、近江俊徳 がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3イヌホモログの構造と乳腺腫瘍に対するアポトーシス誘導能の解析、第156回日本獣医学会学術集会、2013年09月20日～22日、岐阜大学(岐阜市)

落合和彦、塩入弓絵、染田沙織、大澤有加、宇田川智野、森松正美、吉川泰永、盆子原誠、土田修一、近江俊徳 イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子BRCA2のBRC repeat 3に存在するSNPsの頻度および機能に及ぼす影響の検討、第155回日本獣医学会学術集会、2013年03月28日～30日、東京大学(東京都)

落合和彦、森松正美、吉川泰永、宇田川智野、多田尚美、近江俊徳 放射線治療抵抗性がんに対するRAD51の制御を基軸とした改変型BRCによる新規治療戦略の開発に向けた基礎研究、第154回日本獣医学会学術集会、2012年09月14日～16日、岩手大学(盛岡市)

吉川泰永、森松正美、落合和彦、和田成一、埜田高広、近澤征史朗、岩井聡美、折野宏一、渡辺清隆 イヌ乳腺腫瘍で発見した癌関連遺伝子産物BRCA2における変異BRC repeat 3の機能解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年09月14日～16日、岩手大学(盛岡市)

吉川泰永、森松正美、落合和彦、折野宏一、和田成一、埜田高広、近澤征史朗、岩井聡美、渡辺清隆 イヌおよびヒトBRCA2のBRC repeat 3領域におけるミスセンス変異の比較、日本分子生物学会(第34回年会)、2011年12月15日、パシフィコ横浜(横浜市)

落合和彦、吉川泰永、近江俊徳、森松正美 イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子産物BRCA2のBRC repeat 4のアミノ酸がDNA相同組換え修復に必須なRAD51ホモ会合体形成に与える影響、日本獣医学会(第152回学術集会)、2011年9月20日、大阪府立大学(堺市)

吉川泰永、森松正美、鈴木優、西村百合香、落合和彦、折野宏一、埜田高広、近澤征史朗、岩井聡美、島村麻子、新井敏郎、渡辺清隆 癌抑制遺伝子BRCA2のPCR法による変異解析法の確立、日本獣医学会(第152回学術集会)、2011年9月20日、大阪府立大学(堺市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
・該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者
森松正美 (MORIMATSU, Masami)
北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授
研究者番号：70241370

(2)研究分担者
落合和彦 (OCHIAI, Kazuhiko)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：30550488

(3)連携研究者
・該当無し

()
研究者番号：