

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290042

研究課題名(和文) 乳癌治療に向けた分子基盤としてのBRCA1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of BRCA1 as the molecular basis of breast cancer therapy

研究代表者

太田 智彦(OHTA, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60233136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBARD1がDNA損傷後にATM依存的かつRNF168非依存的にK9ジメチル化ヒストンH3と結合することを明らかにした。この結合はBARD1のBRCTドメインとHP1のchromoshadowドメインの直接結合を介していた。この結合部位が変異した細胞では相同組換え修復に必須なBRCA1、BARD1、CtIP、FANCI、RAD51のDNA 2本鎖切断部位(DSB)への集積および姉妹染色分体交換が抑制され、非相同末端再結合のエフェクター分子であるRIF1の集積が増強した。以上より、BARD1-HP1結合はDSBの相同組換え修復に重要な役割を果たしていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that BARD1 interacts with Lys9-dimethylated histone H3 (H3K9me2) after DNA damage in an ATM-dependent but RNF168-independent manner. This interaction is mediated by HP1-gamma. A conserved HP1-binding motif in the BARD1 BRCT domain directly interacts with the chromoshadow domain of HP1 in vitro; mutations in this motif disrupt the retention of BRCA1/BARD1 at DNA double-strand break (DSB) sites. The inhibition of BARD1-HP1 interaction also inhibits accumulation of CtIP, FANCI and RAD51 at DSB sites, suppressed damage-induced sister chromatid exchange, and allow ectopic accumulation of RIF1, an effector of non-homologous end joining, at the damaged loci in S-phase. The results indicate that the BARD1-HP1 interaction is critical to mediate homologous recombination repair of DSB.

研究分野：応用分子腫瘍学

キーワード：乳癌 治療 BRCA1 BARD1 DNA損傷

### 1. 研究開始当初の背景

BRCA1 の機能不全は、家族性および散発性乳癌の原因となる。いずれも乳癌のなかで最も予後の悪いサブタイプである basal-like 乳癌を発症し、現在の治療法では十分な効果は得られておらず、新しい治療戦略が必要とされている。BRCA1 の機能不全は治療標的としても注目されており、2005 年に BRCA1 欠損細胞に PARP 阻害剤が合成致死性をもたらすことが報告された (Nature, 434:917-, 2005)。その根拠として、PARP 阻害剤によってもたらされる DNA 一本鎖損傷 (single-strand break: SSB) の修復不全と BRCA1 欠損による DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) の修復不全による合成致死が提唱されていたが、PARP は DSB の修復にも関わっていることから、このような単純なモデルでは説明がつかない可能性が指摘されていた。これに対して最近、BRCA1 の DSB 局所への集積メカニズムについて重要な知見が報告された。相同組換え修復において BRCA1 が損傷局所で働くには早期 (20 秒~) の局所へのリクルートとその後の安定維持 (10 分~数時間) の 2 つの event に関わる複合体が存在するが、この早期のリクルートには BRCA1 と二量体を形成する BARD1 の BRCT ドメインと poly(ADP)ribose (PAR) との結合が必要であることが示された (Cancer Cell, 23:693-, 2013) (図 1 上段)。すなわち、PARP 阻害剤は SSB の修復を阻害するのみでなく、DSB 修復における BRCA1 の機能の一部を阻害することになる。一方、DNA 損傷後後期の BRCA1 の局所への維持には ATM 依存的に生じるユビキチン鎖に結合する RAP80-ABRA1 複合体が必須であるが (Science, 316:1194-, 1198-, 1202-, 2007)、これに加え研究代表者らは最近、BARD1 とヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) の結合も必須であることを発見した (図 1 下段) (未発表、後述)。これに関連して BRCA1 のユビキチンリガーゼ (E3) 活性欠損によってヒストン H2A のユビキチン化が阻害され、サテライト領域 DNA (H3K9 メチル化領域) の脱ヘテロクロマチン化が生じて癌が発症することが報告されており (Nature, 477:179-, 2011)、BRCA1 の機能として DNA 修復とともにヘテロクロマチン形成における役割が注目されてきている。

### 2. 研究の目的

BRCA1 の機能不全は予後不良乳癌の原因となるが、一方、DNA 損傷性化学療法剤の治療標的として重要である。BRCA1 欠損と PARP 阻害剤の合成致死性モデルが提唱されて久しいが、最近の分子メカニズムの解析結果からは当初のモデルは必ずしも正しくなく、治療戦略上 BRCA1 機能のより深い理解が必要とされる。本研究では BRCA1 の 2 つの機能、すなわち DNA 相同組換え修復とヘテロクロマチン形成における機能に照準を絞り、さらにこれらの機能のクロストークの解析を進め、機能を

阻害する薬剤とその機能を補完する分子メカニズムの異常による合成致死性あるいは相補機能を阻害する 2 つの薬剤の相乗効果について検討する。DNA 損傷応答とヘテロクロマチンに関連する基礎生命科学分野とともに乳癌治療に関連する臨床分野に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

細胞株の樹立。Doxycyclin 誘導性に BARD1 に対する shRNA と変異型 BARD1 を同時に発現し内因性の野生型 BARD1 が変異型に置換する HeLa および U2-OS 細胞を樹立した。Doxycyclin 誘導性にヘテロクロマチンプロテイン-1 (HP1) の 3 つのサブタイプ (HP1<sup>1</sup>、HP1<sup>2</sup>、HP1<sup>3</sup>) に対する shRNA が発現し、サブタイプ全てがノックダウンされる HeLa および U2-OS 細胞を樹立した。Doxycyclin 誘導性に HERC2 がノックダウンされる HeLa、U2-OS、HCT116 細胞を樹立した。CRISPR/Cas9 を用いて HERC2 のユビキチンリガーゼ活性部位を欠損したノックアウト HCT116-HERC2<sup>E3/E3</sup> 細胞を樹立した。

*in vivo* におけるタンパク質間の結合を免疫沈降、ウェスタンブロットにて解析した。クロマチンタンパクについてはクロマチン分画を benzonase にて可溶化して解析した。タンパク質の DNA 二本鎖切断損傷 (DSB) 部位への集積を BrdU 投与後のレーザーマイクロ照射あるいは放射線照射の後、蛍光免疫染色法にて解析した。

*in vitro* におけるタンパク質間の結合を GST-pulldown および surface plasmon resonance 法にて解析した。

相同組換え修復能を姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchange: SCE) にて解析した。具体的には細胞を 48 時間 BrdU 標識した後、1 時間 colcemid 処理し、核を展開、紫外線照射した後、ギムザ染色にて解析した。

薬剤感受性を Clonogenic survival アッセイにて解析した。

### 4. 研究成果

BRCA1/BARD1 複合体の DSB 局所への集積に BARD1 の BRCT ドメインと HP1 との結合を介した Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) への結合が必要あることが明らかとなった。さらに、この経路を介して集積する BRCA1 は CtIP および FANCD1 を DSB に誘導し、相同組換え修復に必須な役割を果たすのに対して、従来より知られる RNF8/RNF168 経路を介して集積する BRCA1 は相同組換え修復をむしろ抑制することがわかった。

BARD1 の BRCT ドメインに存在する PxVxL モチーフが HP1 と結合することをその変異体 (L570E/V571E および L570A/V571A) を用いて *in vitro* および *in vivo* にて確認した。Doxycyclin 誘導性に内因性の BARD1 がこの変異体に置換される HeLa および U2OS 細胞を樹

立したところ、これらの細胞ではBRCA1のDSBへの集積が著しく阻害された。この際、BRCA1のBRCTドメインに結合し、DNA 5'末端の削り込みに必須な CtIP および FANCD1のDSB局所への集積も顕著に阻害されることからBARD1/HP1結合は相同組換え修復に必要なBRCA1の集積に必要であることが示唆された。これを裏付けるように変異型BARD1発現細胞では相同組換え修復の指標であるRAD51核内foci形成およびSCE形成は有意に低下し、PARP阻害剤olaparibに対する感受性が亢進していた。これらの表現型はDoxycyclin誘導性にHP1のサブタイプ全てがノックダウンされるHeLaおよびU2-OS細胞でも同様に観察された。一方、RNF168をノックダウンするとBARD1とHP1およびH3K9me2の結合が著名に増強することから、このBARD1/HP1経路はRNF8/RNF168経路の下流にはないことが判明した。さらにBARD1変異(L570E/V571EおよびL570A/V571A)細胞およびHP1ノックダウン細胞においてRNF8/RNF168/BRCA1経路の下流で働くRAP80および結合型ユビキチンのDSBへの集積は全く阻害されず、非相同末端再結合のエフェクター分子であるRIF1核内fociはむしろ増強した。さらに、RNF168抑制HeLa細胞においてはRAP80と結合型ユビキチンの集積は阻害されるのに対してCtIPとRAD51の集積は阻害されなかった。

BRCA1およびBARD1の抑制によって相同組換え修復不全が生じ、PARP阻害剤に対する感受性が亢進するのに対して、HERC2ノックダウン細胞はSCEが亢進することから相同組換え修復が過剰になっている可能性が示唆された。そこで、BRCA1あるいはBARD1不全に、さらにHERC2不全を加えた場合に相同組換え修復能が改善し、PARP阻害剤に対する抵抗性が生じるか否かの解析を試みた。Doxycyclin誘導性にHERC2に対するshRNAを発現するHeLa細胞に、CS-RfA-ETPuro-shBRCA1あるいはshBARD1をトランスフェクションし、blastocidinとpuromycinでセレクションし、Doxycyclin添加によってHERC2とBRCA1あるいはHERC2とBARD1を同時に抑制しうる細胞を樹立した。これらの細胞を用いて放射線照射後のRAD51のfoci形成を解析したところ、BRCA1あるいはBARD1を単独でノックダウンした細胞がコントロールに比較してfoci形成が抑制されているのに比較してBRCA1あるいはBARD1とHERC2を同時にノックダウンした細胞はRAD51foci形成が増加しており、相同組換えが回復する傾向にあることが確かめられた。しかし、これらの細胞はノックダウンを継続すると細胞死が誘導されることからSCEおよびPARP阻害剤感受性の解析は困難であった。CRISPR/Cas9で作成したHERC2変異HCT116細胞を用いてBRCA1, BARD1, BRCA2のノックダウンを試みたが、Dox誘導性shHERC2細胞と同様の結果であった。一方、我々が作成したHERC2のC末端に対する抗体

を用いて原発性乳がんにおける免疫染色の条件設定を行い、良好な染色条件が得られた。

## 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11件)

Wu W, Togashi Y, Johmura Y, Miyoshi Y, Nobuoka S, Nakanishi M, Ohta T. HP1 regulates the localization of FANCD1 at sites of DNA double-strand breaks. *Cancer Sci*. 査読有, 107(10):1406-1415, 2016, DOI:10.1111/cas.13008

Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Nishikawa H, Ohta T. Functional link between BRCA1 and BAP1 through histone H2A, heterochromatin and DNA damage response. *Curr Cancer Drug Targets*. 査読有, 16(2):101-109, 2016, DOI:10.2174/1568009615666151030102427

扇屋 りん, 太田 智彦. 癌の発症と治療におけるユビキチン系の役割. *医学のあゆみ*. 査読有, 256(8):868-873, 2016

Okada M, Ohtake F, Nishikawa H, Wu W, Saeki Y, Takana K, Ohta T. Liganded ER stimulates the E3 ubiquitin ligase activity of UBE3C to facilitate cell proliferation. *Mol Endocrinol*. 査読有, 29(11):1646-1657, 2015, DOI:10.1210/me.2015-1125

Fukuda T, Wu W, Okada M, Maeda I, Kojima Y, Hayami R, Miyoshi Y, Tsugawa K, Ohta T. Class I histone deacetylase inhibitors inhibit the retention of BRCA1 and 53BP1 at the site of DNA damage. *Cancer Sci*. 査読有, 106(8):1050-1056, 2015, DOI:10.1111/cas.12717

Nagasawa S, Maeda I, Fukuda T, Wu W, Hayami R, Kojima Y, Tsugawa K, Ohta T. MED12 exon 2 mutations in phyllodes tumors of the breast. *Cancer Med*. 査読有, 4(7):1117-1121, 2015, DOI:10.1002/cam4.462

Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Takeuchi J, Wu W, Ohta T. The BARD1/HP1 interaction: another clue about heterochromatin involvement in homologous recombination. *Molecular & Cellular Oncology*. 査読有, 2(2):e1-e8, 2015, DOI:10.1080/23723556.2015.1030535

Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Kleivit RE, Ohta T. Interaction of BARD1 and HP1 Is Required for BRCA1 Retention at Sites

of DNA Damage. *Cancer Res.* 査読有, 75(7):1311-1321, 2015, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-2796  
Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* 査読有, 16(2):192-201, 2015, DOI:10.15252/embr.201439152  
Nagasawa S, Sedukhina AS, Nakagawa Y, Maeda I, Kubota M, Ohnuma S, Tsugawa K, Ohta T, Roche-Molina M, Bernal JA, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Sato K. LSD1 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Basal-Like Breast Cancer, and Sensitivity to PARP Inhibition. *PLoS One.* 査読有, 10(2):e0118002, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0118002  
Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K. NF- $\kappa$ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. *Oncotarget.* 査読有, 6(6): 3825-3839, 2015, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686825>

[学会発表](計 17 件)

頼 勇強, 呉 文文, 梁 偉新, 太田 智彦. 「Fbxo22 欠失癌細胞における PARP 阻害剤抵抗性獲得」第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)  
太田 智彦. 「乳癌における DNA 損傷修復不全と PARP 阻害剤感受性」第 25 回日本乳癌学会学術総会, 2017 年 7 月 14 日, 福岡県福岡市 (マリンメッセ福岡)  
永澤 慧, 佐藤 工, 前田 一郎, 太田 智彦, 津川 浩一郎. 「TN 乳癌 (Basal 型) における LSD1 蛋白の過剰発現の予後予測因子および PARP 阻害剤の効果予測因子の検討」第 25 回日本乳癌学会学術総会, 2017 年 7 月 14 日, 福岡県福岡市 (マリンメッセ福岡)  
Tomohiko Ohta. 「A novel role of HERC2 in maintaining chromosomal stability.」6th US-Japan DNA Repair Meeting, 2017 年 5 月 20 日, U.S.A, CA(Clark-Kerr Campus, Berkeley)  
太田 智彦. 「BRCA 変異陽性乳がんにおける Precision Medicine 基礎から臨床へ」第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 7 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)  
黒田 貴子, 岡田 麻衣子, 敦賀 智子, 太田 智彦, 津川 浩一郎. 「ドキ

シサイクリン誘導性 BRCA1 欠損 ER 陽性細胞を用いた染色体不安定化機構の解析」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 2016 年 6 月 16 日, 東京ビックサイト(東京都・江東区)  
永澤 慧, 前田 一郎, 太田 智彦, 津川 浩一郎. 「TripleNegative 型乳癌 (Basal 型) において LSD1 蛋白の過剰発現は予後不良因子である」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 2016 年 6 月 16 日, 東京ビックサイト(東京都・江東区)  
敦賀 智子, 岡田 麻衣子, 黒田 貴子, 宇井 彩子, 太田 智彦. 「DNA 損傷修復機構に關与するユビキチン E3 リガーゼの検討」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 2016 年 6 月 16 日, 東京ビックサイト(東京都・江東区)  
太田 智彦. 「HERC2 and its interactors in regulation of DNA damage response and cell cycle.」第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)  
太田 智彦, 前田 一郎, 津川 浩一郎. 「トランスレーショナルリサーチを進める上での問題点」第 23 回日本乳癌学会学術総会, 2015 年 7 月 3 日, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)  
Tomohiko Ohta. 「BRCA1 retention at DNA double-strand breaks in homology-directed repair pathways」International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases, 2014 年 11 月 7 日, 群馬大学 (群馬県前橋市)  
Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa, Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda, Wenwen Wu. 「HP1 amma mediates BARD1 retention on Lys9-dimethylated histone H3 at sites of DNA damage」Fusion Conference DNA Replication as a Source of DNA Damage, 2014 年 10 月 2 日, カサブランカ (モロッコ)  
太田 智彦. 「Therapeutic strategy targeting the mechanism of BRCA1 retention at DNA damage sites via a histone modification.」第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)  
Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa, Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda, Wenwen Wu. 「ATM-dependent but RNF168-independent BRCA1/BARD1 retention at sites of DNA damage」Benzon Symposium No 60 - Nuclear Regulation by Ubiquitin, 2014 年 8 月 18 日, コペンハーゲン (デンマーク)  
太田 智彦. 「BRCA1 の DNA 損傷応答とヒストン修飾」第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2014 年 8 月 9 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊

中市)

太田 智彦.「BRCA1 の新規 DNA 損傷応答メカニズムを標的とした治療戦略」第 22 回日本乳癌学会学術総会, 2014 年 7 月 10 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

太田 智彦.「BRCA1 の新規クロマチン結合機構を標的としたがん治療戦略」第 15 回ホルモンと癌研究会, 2014 年 7 月 4 日, 良陵会館(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 4 件)

太田 智彦. 乳癌と臨床, BRCA1/2 の基礎と PARP 阻害剤. 2018, 9

頼 勇強, 太田 智彦. メディカルレビュー社, CANCER BOARD of the BREAST 臨床医のための乳腺基礎医学「乳癌における DNA 損傷と修復不全」. 2018, 20-24.

櫻井 晃洋, 赤木 究, 和泉 美希子, 太田 智彦, 三木 義男. 金原出版, 遺伝子診断・遺伝カウンセリング. 遺伝性乳癌卵巣癌症候群(HBOC)診療の手引き 2017 年版, 2017, 29-72.

太田 智彦. 日本臨床, 乳癌学 - 最新の診断と治療 - . 乳癌の分子生物学と発症機序「DNA 修復不全と乳癌」. 2017, 6.

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 智彦(OHTA, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 3 3 1 3 6

(2)研究分担者

朴 成和(BOKU, Narikazu)

国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号: 5 0 5 0 5 9 4 8