

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10083

研究課題名(和文) 非遺伝性散発性乳癌の発症、悪性進展におけるTREX2複合体因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of TREX2 complex in the development and malignant progression of sporadic breast cancers

研究代表者

桑原 一彦 (Kawahara, Kazuhiko)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：10263469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：TREX2複合体構成分子GANPの欠損によりマウス乳癌が自然発症することを明らかにした。ヒト乳癌発症にGANPの機能不全が関与するのかを明らかにする目的で、ganp遺伝子多型(SNPs)を複数同定し、これらが連鎖平衡の関係にあることを示した。乳癌患者と非がん対照者との症例対照研究で、ganp SNPsは乳癌発症に予防的に関わり、またこれらのSNPsを有する群は正常アレルの群と比較して予後良好で、ヒト乳癌発症と悪性進展に関わる可能性がある。ヒト乳癌検体でganp mRNAを解析したところHATドメインを欠失するスプライシング異常を認め、乳癌発症にはGANPのHAT活性が関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the deficiency of GANP, a member of TREX2 complex, resulted in the spontaneous development of mammary gland tumors in mice. To examine if GANP insufficiency is associated with human breast cancer development, we identified several SNPs of ganp and demonstrated one of the SNPs at the ganp locus was significantly associated with reduced breast cancer risk and longer disease-free survival in breast cancer patients. These results suggest that GANP is critical for the occurrence and progression of sporadic breast cancer. In addition, spliced variants in ganp mRNA lacking HAT enzymatic activity was observed in human breast cancer cases, suggesting that the development of sporadic breast cancers is involved in HAT activity of GANP.

研究分野：腫瘍生物学、実験病理学

キーワード：乳癌 転写共役型DNA傷害

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の約 15 人に 1 人が罹患するが、約 95%を占める非遺伝性散発性乳癌は多因子疾患のためその発症機構は不明な点が多い。我々は散発性乳癌の臨床検体を用いた解析で、TREX2 複合体の構成分子 GANP の発現が独立予後因子であること、さらに二種類の GANP 欠損マウスで乳癌を自然発症することを明らかにし、発症した乳癌ではエストロゲン受容体と HER2 陽性率がヒト乳癌と類似していることを発見した。この発症には TREX2 複合体の発現抑制による「転写共役型 DNA 傷害」の誘導が重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

- (1) 乳癌発症に相関するヒト *ganp* 遺伝子多型 (SNPs) の有無の検証 : *ganp* 遺伝子座は染色体 21 番上のダウン症候群関連領域に存在している。ダウン症候群は 21 番トリソミーが見られ、疫学解析から乳癌発症が極めて低いことが知られている。*ganp* 欠損マウスと臨床検体の後ろ向き研究の結果から、GANP 分子の発現異常が乳癌発症に関わっている可能性が高い。非遺伝性散発性乳癌は多因子疾患であり、これまでの研究結果から *ganp* が疾患感受性遺伝子の可能性が考えられる。そこで、*ganp* SNPs を同定し、ケース・コントロール研究によりこの可能性を検討する。
- (2) 乳癌臨床検体における *ganp* 遺伝子のスプライシング異常の検証 : 乳癌発症と GANP 発現が相関することから、乳癌細胞で *ganp* 遺伝子変異がある可能性を最初に考えた。ヒト乳癌細胞株 8 種類から mRNA を抽出して *ganp* 翻訳領域 6kb の全塩基配列を解析した。すべての細胞株でアミノ酸置換を伴う変異は認めなかったが、2 種類の細胞株のカルボキシル末端側で複数のタイプのスプライシング異常を認めた。スプライシング異常が乳癌患者検体においてもみられるのかを検討する。
- (3) GANP による標的分子 BRCA2 の制御の検証 : 乳癌細胞株において GANP 分子の発現を siRNA により低下させると BRCA2 の

発現が抑制されることがこれまでに判明している。GANP は mRNA 核外輸送に関わるため、*ganp* ノックダウン細胞において *brca2* mRNA の核外輸送障害の可能性も考えたが、細胞質分画と核分画由来の RNA を用いた定量的 PCR において、両分画とも転写産物が激減していた。このことは mRNA 核外輸送障害というよりは、転写そのものを抑制している可能性が考えられる。GANP の HAT 活性がこれに関与するのか、あるいは GANP が *brca2* mRNA の安定化に関与するのか、を明らかにする。

(4) TREX2 複合体分子 PCID2 と DSS1 の乳癌発症や悪性進展への関与の検証 : GANP 以外の TREX2 複合体分子 PCID2 と DSS1 の乳癌発症や悪性進展への関与の検証に関して、これまでに *wap-cre* マウスと *pcid2-floxed* マウスの交配により、乳腺特異的 *pcid2* 欠損マウスを作製してきた。*ganp* 欠損同様 *pcid2* 欠損でも乳腺上皮の障害による乳管構築異常を認め、この乳管構築異常に遺伝子変異が加わることで乳癌発症に至る可能性がある。乳腺特異的 *ganp* 欠損マウスにおいては、乳腺上皮における GANP 分子の欠損から約一年で乳癌が発症したため、乳腺特異的 *pcid2* 欠損マウスでも腫瘍発症に同程度の時間がかかることが予想された。

3. 研究の方法

- (1) ヒト *ganp* 遺伝子多型の同定
愛知県がんセンター疫学・予防部では、乳がん症例約 700 例と年齢を適合させた非がん対照者約 1400 例の症例対照研究を行ってきた。これらの症例に *ganp* の SNPs が含まれているかを調べ、含まれていない場合は SNPs を同定する。これらの情報を用いて症例対象研究を行い、乳癌疾患感受性に関わる SNPs を明らかにする。
- (2) 乳癌臨床検体における *ganp* 遺伝子のスプライシング異常
ヒト乳癌細胞で 8 種類のうち、2 種類の細胞株で *ganp* mRNA のカルボキシル末端側で複数のタイプのスプライシング異常を認めた。これらはいずれも GANP のカルボキシル末端側に存在する HAT 活性に影響

を及ぼす。このスプライシングの異常が実際にヒト乳癌検体において見られるのか、手術摘出検体 50 例から抽出した mRNA を用いてシーケンス解析する。

(3) GANP による標的分子の制御

ganp ノックダウン細胞における *brca2* mRNA stability の解析を行うが、GANP が *brca2* mRNA の安定化に関与しない場合は、GANP の HAT 活性が *brca2* 遺伝子の転写に影響を与える可能性がある。CRISP-Cas システムを用いたゲノム編集により HAT 領域を欠失させ乳癌細胞株を作製し、コントロール細胞と比較して BRCA2 の発現変化が見られるかを解析する。GANP 発現低下がもたらす BRCA2 発現低下の臨床的意義を明らかにするために、熊本大学乳腺内分泌外科学分野で保存されている RNA を用いて *brca2* の発現を定量的 PCR によって解析する。BRCA2 の発現は複数の経路で調節されていることが予想されるが、以前に解析した GANP タンパクの免疫染色による発現データと照合し、非遺伝性散発性乳癌における BRCA2 発現の意義を明らかにする。

(4) TREX2 複合体分子 PCID2 と DSS1 の乳癌発症や悪性進展への関与

wap-cre マウスと *pcid2-floxed* を交配して得られた乳腺特異的 *pcid2* 欠損マウスの観察により、乳癌発症の有無を解析する。DSS1 に関しては、これまでに DSS1 高発現乳癌では DSS1 低発現乳癌と比較して無再発生存期間が短いことが明らかとなっている。この理由として、DSS1 過剰発現細胞では化学療法抵抗性が増加することが考えられ、実際抗がん剤による DNA 傷害を受けにくいことが示されている。DSS1 は BRCA2 の安定化因子であり、DSS1 の発現低下により BRCA2 の分解が促進され、DNA 傷害が誘導される可能性も考えられる。また最近、BRCA2 が PCID2 の R-ループ形成を抑制することで腫瘍発症に関わる可能性が示された (Bhatia *et al.*, Nature, 2014)。PCID2 や DSS1 を過剰発現させた乳癌細胞株、あるいは両者をノックダウンした乳癌細胞株を作成し、DNA 傷害における BRCA2 の関与を解析する。

さらに *in vitro* の解析も進め、PCID2 や DSS1 を過剰発現させた乳癌細胞株、あるいは両者をノックダウンした乳癌細胞株を用いて、DNA 傷害における BRCA2 の関与を解析する。

4. 研究成果

これまでに非遺伝性散発性乳癌発症に関わる候補分子として GANP を同定した。1) 乳癌発症に GANP が関与しているかをヒト *ganp* 遺伝子多型 (SNPs) により解析、2) 乳癌臨床検体におけるヒト *ganp* 遺伝子のスプライシング異常の解析、3) GANP の標的分子の同定とその制御、の三点から解析した。1) に関して、愛知県がんセンター研究所疫学・予防部との共同研究により、乳癌症例約 700 例と非がん対照者約 1400 例においてヒト *ganp* ゲノム遺伝子上に 13 カ所の SNPs が存在すること、これらはお互いに連鎖平衡の関係にあることが明らかとなった。さらに *ganp* SNPs は非遺伝性乳癌発症リスクと強く相関することが明らかになった (オッズ比 0.4)。この相関は乳癌のフェノタイプとは関係なく、また様々な発症リスクとも相関がみられなかった。興味深いことに発症リスクのみならず乳癌患者予後との相関がみられることも判明した (論文投稿中)。現在これらの SNPs が乳癌発症リスクにどのように影響しているかを解析している。2) に関して、臨床検体においてもヒト *ganp* 遺伝子の異常スプライシングが存在するかを検討した。これまでの解析でヒト乳癌細胞株 8 種類のうち 2 種類でスプライシング異常を認め、この異常はカルボキシル末端側 (HAT 領域) に集中していた。さらに約 50 例のヒト乳癌臨床検体から抽出した mRNA を用いてシーケンス解析を行ったところ、約 20% でスプライシング異常が起こっており、ほとんどが HAT ドメインに影響することを確認した。実際に *ganp* 遺伝子で HAT ドメインを欠失されたりコンピナントは HAT 活性が消失していた。すでに遺伝子欠損マウスを用いた解析で GANP 欠損が乳癌発症に関わることを示しているが、この原因として GANP

の HAT 活性が重要である可能性が示唆された。3) に関して、乳癌細胞株において GANP の発現を siRNA により低下させ、様々な乳癌発症に関連する分子の発現に影響するかを調べた。その結果、BRCA2 の発現は再現よく低下することが判明した。この低下は転写レベルで起こっていることが示された。本研究期間では GANP の HAT ドメインを欠失させた細胞株の樹立には成功しなかったため、この点は今後の重要なポイントとなる。

PCID2 欠損が乳癌発症に関わるかどうかは、現時点で否定的である。これまでに約 30 匹の *wap-cre-pcid2^{fl/fl}* マウスの観察では乳癌発症はみられていない。ヒト乳癌臨床検体を用いた解析で、PCID2 も DSS1 も高発現群が低発現群に比べて無再発生存期間が短縮することが明らかとなり、この点は GANP の結果と反対である。最近 BRCA2 と TREX2 複合体との関連が報告されたが、BRCA2 の発現レベルと無再発生存期間とは有意な相関がないことがわかった。現時点で PCID2 と DSS1 の発現が乳癌発症に影響を与えているというデータはなく、悪性進展にこれらの分子が関わる可能性が示されたため、今後化学療法感受性の観点からさらなる解析を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Kuwahara, K., Kudo, K., Yashima-Abo, A., Katayama, K., Kojima, K., Tone, K., Ito, E., Nakazawa, A., Iwafuchi, H. & Kurose, A. Classic Hodgkin lymphoma with osseous involvement mimicking Langerhans cell histiocytosis in a child. *Hum. Pathol.* (印刷中) 査読有り

Wang, Q.[#], Zhang, L.[#], Kuwahara, K.[#], Li, L., Liu, Z., Li, T., Zhu, H., Liu, J., Xu, Y., Xie, J., Morioka, H., Sakaguchi, N., Qin, C. & Liu, G. ([#]equal contribution) Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans

elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect. Dis.* 2:361-376 (2016). 査読有り

Kuwahara, K., Yamamoto-Ibusuki, M., Zhang, Z., Phimsen, S., Gondo, N., Yamashita, H., Takeo, T., Nakagata, N., Yamashita, D., Fukushima, Y., Yamamoto, Y., Iwata, H., Saya, H., Kondo, E., Matsuo, K., Takeya, M., Iwase, H. & Sakaguchi, N. GANP protein encoded on human chromosome 21/mouse chromosome 10 is associated with resistance to mammary tumor development. *Cancer Sci.* 107:469-477 (2016). 査読有り

Kitabatake, M., Soma, M., Zhang, T., Kuwahara, K., Fukushima, Y., Nojima, T., Kitamura, D. & Sakaguchi, N. JNK regulatory molecule G5PR induces IgG autoantibody-producing plasmablasts from peritoneal B1a cells. *J. Immunol.* 194:1480-1488 (2015). 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

筆頭発表のみ記載する

Kuwahara, K. & Kondo, E. Depletion of TREX2 components, which is related to R-loop accumulation, sensitizes chemotherapy to breast cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

Kuwahara, K. & Kondo, E. Forced reduction of TREX2 complex highly sensitizes chemotherapy to breast cancer cells. 第 21 回日本がん分子標的治療学会、2017 年 6 月 15 日、九州大学百年講堂 (福岡)

Kuwahara, K., Gondo, N., Rezano, A., Zhang, Z., Kuzushima, K., Iwata, H., Toyama, T. & Kondo, E. Forced reduction of DSS1, a member of TREX2 complex, highly sensitizes chemotherapy to breast cancer cells in a BRCA2-independent manner. AACR Annual Meeting 2017、2017 年 4 月 3 日、Walter E. Washington Convention Center

(Washington, D.C., USA)

Kuwahara, K., Ito, H., Kotani, H., Tsunoda, N., Kuzushima, K., Iwata, H., Nagino, M., Tanaka, H. & Matsuo, K. Identification of *ganp* SNPs affecting both the development and malignant progression in human sporadic breast cancers. 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)

桑原一彦、乳癌細胞において TREX2 複合体構成分子は薬剤感受性誘導の標的となる、第 20 回日本がん分子標的治療学会、2016 年 5 月 31 日、別府国際コンベンションセンター(大分)

Kuwahara, K., Ito, H., Kuzushima, K., Iwata, H., Tanaka, H. & Matsuo, K. Molecular epidemiological studies of germinal center-associated nuclear protein (*ganp*) in the development of human sporadic breast cancers. AACR Annual Meeting 2016、2016 年 4 月 18 日、Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

Kuwahara, K., Ito, H., Iwase, H., Kuzushima, K., Iwata, H., Tanaka, H. & Matsuo, K. Molecular epidemiological studies of *ganp* in the development of sporadic breast cancers. 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 一彦 (KUWAHARA KAZUHIKO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：10263469