

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14394

研究課題名(和文) エストロゲン依存的細胞増殖過程におけるBRCA2の役割

研究課題名(英文) Role of BRCA2 in the process of estrogen-dependent cell proliferation

研究代表者

三木 義男 (MIKI, Yoshio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：10281594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、乳がん細胞にエストロゲン(E2)を添加した時、BRCA2が局在を変化させることを見出した。そこで、これまで全く知られていなかった乳がん発生過程におけるE2とBRCA2の機能的相互作用を見出し解析する。BRCA2の発現制御は、USF、Elf1及びNF- κ B転写因子のBRCA2プロモーターへの結合に関連する。本研究では、部位特異的変異誘発法を用いたSp1、NF- κ B、およびUSF結合部位の変異をプロモータールシフェラーゼベクターに導入し、乳がん細胞におけるE2誘発BRCA2プロモーター活性を解析し、E2-ER複合体活性に応答する2つのSp1部位を同定した。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the BRCA2 gene are characterized by the predisposition to familial breast and ovarian cancer. BRCA2 cell cycle-dependent expression is associated with binding of the USF, Elf1, and NF- κ B transcription factors to the BRCA2 promoter. Recent studies have reported that BRCA2 expression is indirectly elevated in response to estrogen-estrogen receptor (ER) activity, such as binding to transcription factor Sp1 binding sites. In this study, mutations in each of the Sp1, NF- κ B, and USF binding sites using site-directed mutagenesis were introduced into the promoter luciferase vector, and estradiol-induced BRCA2 promoter activity and BRCA2 protein level in MCF7 cells was examined. We confirmed two Sp1 sites (-50 to -55 and -69 to -75) responded to estradiol-ER complex activity. These studies aim to elucidate the mechanism underlying breast cancer development by estrogen.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳がん BRCA2 エストロゲン エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) エストロゲンは、核内のエストロゲン受容体に結合して活性化させるステロイドホルモンである。エストロゲン作用が、乳がん発症機構への関与は次のように考えられている。エストロゲンがエストロゲン受容体をもつ乳腺細胞に対して、増殖促進因子として働き、細胞増殖を促進し、分裂頻度が高くなる。その結果、DNAの修復時間が短くなり、DNA複製時にエラーを生じる機会が増える。

エストロゲンの代謝産物がアデニンやグアニン塩基と結合してDNA骨格の結合が不安定化して、脱塩基を生じて変異を起こす。そこで、当初はDNA修復能を有するBRCA2が、エストロゲン作用による乳がん発症に関与することが推測された。

(2) エストロゲン作用による乳がん発症機構とBRCA2機能との関連性は全く明らかにされていないと言っても過言ではない。我々は、エストロゲン添加時に細胞内におけるBRCA2の局在が変化する新しい現象を見出した。そこで、この作用が乳がんに対してどのように影響するのかを明らかにして、ホルモン感受性乳がんの発症機構におけるBRCA2の役割の解明を目指す。

2. 研究の目的

乳がんの60~70%は、エストロゲンが、その発症や進展に重要な役割を担っている。一方、遺伝性乳がん原因遺伝子BRCA2は、全乳がん症例の2~5%に関与するがん抑制遺伝子であり、これまでに多くの機能解析の成果が報告されている。しかし、驚くべきことに、これまでエストロゲン生理作用とBRCA2機能との関連性は、全く明らかにされておらず、両者の機能的関連には「重要性なし」と推測されてきた。申請者らは、乳がん細胞にエストロゲンを添加した時、本来核内に発現するBRCA2が細胞内全体にその局在を変化させることを見出した。そこで、本研究では、乳がん細胞に対するエストロゲンの曝露がBRCA2の局在に及ぼす影響を詳細に解析し、そのメカニズムとBRCA2の局在変化が細胞に与える影響を明らかにして、これまで全く知られていなかった乳がん発症過程におけるエストロゲンとBRCA2の機能的相互作用を見出し、解析する。

3. 研究の方法

BRCA2遺伝子は遺伝性乳がんの原因遺伝子であり、ゲノムの安定性維持に深く関与する。BRCA2遺伝子の発現は、DNA損傷、細胞周期におけるS期、女性ホルモンのエストロゲンの取り込みに応じて増加し、4つの転写因子(USF1/2、NF-κB、E1f1、E2-ERα: エストラジオール(E2)とエストロゲン受容体(ERα)との複合体)の関与が報告されている。特に、E2添加時には、エストラジオール応答性(E2-ERα)および細胞周期依存性(USF1/2)

の少なくとも2つのタイプの転写因子が、BRCA2の発現に関わることが考えられる。そこで、異なる転写因子が、BRCA2の発現を制御するその生理的意義を明らかにするために、エストラジオール添加時におけるE2-ERαとUSF1/2によるBRCA2の発現機構を解析する。E2-ERαとUSF1/2は、BRCA2プロモーター領域(-943~+126)のsp1モチーフとE-boxモチーフに結合することが報告されている。sp1モチーフは、BRCA2のプロモーター領域に8個存在し、E-boxモチーフは1個存在する。

(1) プロモーター解析用のベクターの構築、およびLuciferase活性の測定には、LightSwitch™ Luciferase Assay System (ACTIVE MOTIF)を用いて、E-boxモチーフを含む領域(-49~+129)と-943から+126領域を含むクローンを作製し、MCF7細胞内でプロモーター活性を測定する(図1)。

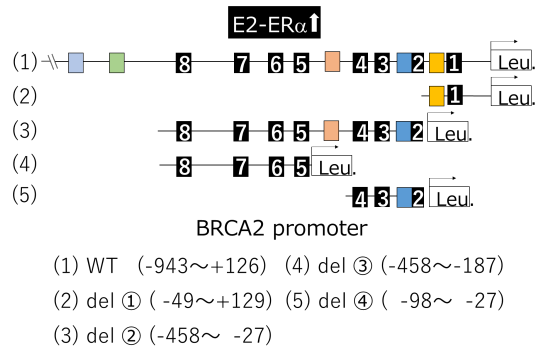


図1. BRCA2 プロモーターの設計

(2) BRCA2プロモーター-USF1結合領域およびSP1モチーフに変異を導入したクローンを作製し、E2依存的プロモーター活性を有する領域を探索・同定する(図2)。

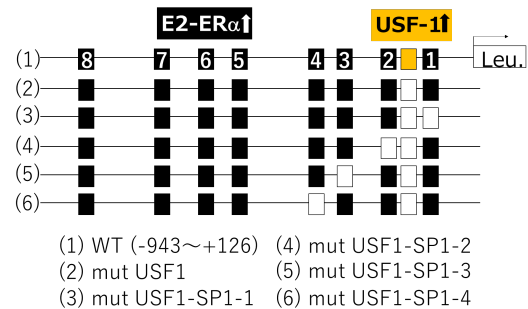


図2. USF1結合領域とSP1への変異導入プロモーターの作製

(3) EstradiolによるDNA二本鎖切断への影響を検討する。具体的には、Estradiol (E2)、4OH-E2、Etoposide (DNAに二本鎖切断を誘導する)をMCF-7細胞に添加後、DNA二本鎖切断マーカーのγ-H2AX (H2AXのリン酸化)抗体で免疫染色を行い、コンフォーカル顕微鏡(Leica TCS SP8)でZ軸の切断面画像を取得し、DNA二本鎖切断の誘導を解析する。

4. 研究成果

(1) E2-ERα 依存的に発現する BRCA2 のプロモーター領域の解析

BRCA2 がエストロゲン依存的に発現制御されるメカニズムは、E2-ERα が SP1 部位に結合することが知られているが、その詳細な機構は十分明らかにされていない。E2-ERα が結合すると考えられている BRCA2 のプロモーター領域の SP1 部位を上図に示した。LightSwitch Luciferase Assay 系を用いた測定を行い、del (-49 から+129 領域) のプロモーター活性は、細胞周期のM期に比べてS期で有意に増加したことから、BRCA2 は、USF1 によって細胞周期のS期に発現誘導を制御されることを確認した(図3)。この時、エストラジオール添加有無によるプロモーター活性に差は認められなかった。

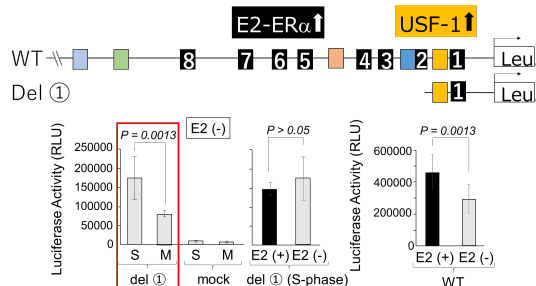


図3. 周期依存的に BRCA2 の発現を調節する USF1 の解析

一方、E2 添加の有無による Luciferase 活性は、WT(-943-+126)プロモーターでは有位に増加し、del (-49 から+129 領域) のプロモーター活性と比較して顕著に増加した。しかし、del ① では E2 添加の有無による Luciferase 活性に有意差は認められなかった(図4)。

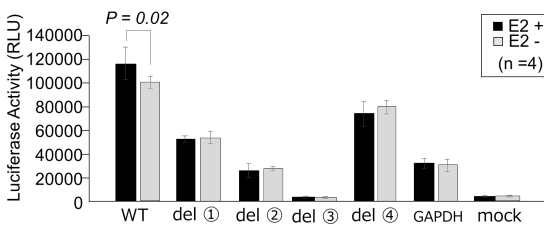


図4. 4 種類のプロモーター領域について WT と比較

(2) E2 依存的プロモーター活性を有する領域を探索・同定

BRCA2 プロモーター-USF1 結合領域および SP1 モチーフに変異を導入したクローンを作製し、E2 依存的プロモーター活性を測定することにより、E2 依存的プロモーター活性を有する領域を探索した。その結果、SP1-1 と SP1-2 に変異を導入した BRCA2 プロモーターの Luciferase 活性は、E2 の添加の有無による差はなく、その他のプロモーター活性は、E2 添加時に有意に増加したことから(図5)、E2-ERα は、SP1-1 と SP1-2 に作用して BRCA2 の発現を制御している可能性を明らかにした。

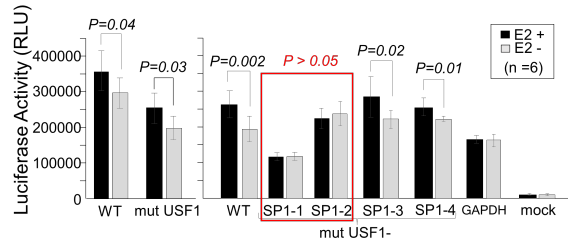


図5. USF1 結合領域と SP1 への変異導入による E2 依存的プロモーター活性

(3) Estradiol による DNA2 本鎖切断への影響

Estradiol (E2)、4OHE-2、Etoposide を MCF-7 細胞に添加後、DNA 二本鎖切断マーカー -H2AX (H2AX のリン酸化) 抗体で免疫染色を行い、コンフォーカル顕微鏡 (Leica TCS SP8) で Z 軸の切断面画像を取得した。DNA 二本鎖切断の定量は、MetaMorph で解析した。E2 添加による DNA の二本鎖切断は、顕著に認められなかった(図6)。

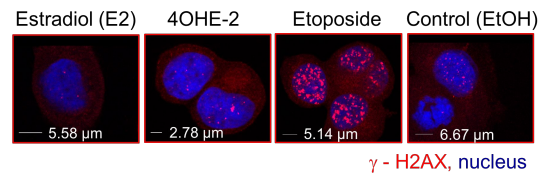


図6. E2 添加による DNA 二本鎖切断損傷

(4) 結語

- ・USF1 は、BRCA2 を細胞周期の S 期に発現誘導させることを確認した。
- ・DNA 二重鎖切断は、E2 誘導において有意に認められなかったことから、E2 誘導による BRCA2 の発現は、DNA 損傷に対する相同組換え修復への対応でない可能性が示唆された。
- ・E2 誘導における BRCA2 発現機構を調べるため、E2-ERα の推定結合部位 (SP1) に対して、欠失や変異導入を施してルシフェラーゼ活性を測定した結果、SP1 の 1 と 2 を除くと E2 応答性がなくなった。E2-ERα は、SP1-1 と SP1-2 に作用する可能性が示唆された。

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6件)

Takaoka M, Ito S, Miki Y, Nakanishi A. FKBP51 regulates cell motility and invasion via RhoA signaling. *Cancer Sci.* 2017 Mar; 108(3):380-389. doi: 10.1111/cas.13153. (査読あり)

Malik S, Saito H, Takaoka M, Miki Y, Nakanishi A. BRCA2 mediates centrosome cohesion via an interaction with cytoplasmic dynein. *Cell Cycle.* 2016 Aug 17;15(16):2145-2156. (査読あり)

Wang J, Ding Q, Fujimori H, Motegi A, Miki Y, Masutani M. Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. *Oncotarget*. 2016 Feb 16; 7(7):7701-14.

doi: 10.18632/oncotarget.6715. (査読あり)

Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S, Yamauchi H, Ohsumi S, Baba S, Shimizu T. Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer*. 2015 Sep; 22(5):462-8.

doi: 10.1007/s12282-013-0503-1. (査読あり)

三木 義男、HBOC 症候群の分子診断と治療、癌と化学療法(解説/特集) (査読なし)、44 巻 2 号 Page102-106(2017.02)

三木 義男、BRCA 遺伝子の発見から新たな臨床遺伝学へ、産科と婦人科(解説/特集) (査読なし)、82 巻 6 号 Page599-604(2015.06)

〔学会発表〕(計 4 件)

三木 義男；合成致死性とがん治療：PARP 阻害剤から学ぶ DNA 損傷修復機能を標的とした新規がん治療戦略．第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2016 年 6 月 4 日、愛媛県(松山市)

三木 義男、中西 啓；HBOC 発症の分子機構と新規治療戦略．第 24 回日本乳癌学会総会、2016 年 6 月 17 日、東京都(江東区)

三木 義男；HBOC 診療最前線 BRCA 遺伝子の基礎から臨床へ．第 27 回日本内分泌外科学会総会、2015 年 5 月 29 日(ワークショップ・基調講演)、福島県(福島市)

三木 義男、中西 啓；[家族性腫瘍の分子生物学] BRCA2 の欠失はパクリタキセルによる微小管の重合を安定化させる．第 21 回家族性腫瘍学会学術集会、2015 年 6 月 5 日(プレナリーセッション)、埼玉県(さいたま市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

URL:<http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三木 義男 (MIKI, Yoshio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：10281594

(2)研究分担者

中西 啓 (NAKANISHI Akira)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・
准教授

研究者番号：50321790