

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15712

研究課題名(和文)BRCA1欠失細胞におけるエストロゲンレセプターによる癌化メカニズムの解明

研究課題名(英文)A study of mechanism underlying carcinogenesis promoted by estrogen receptor in BRCA1 deficient cells

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Doxycyclin誘導性にshRNAによってBRCA1発現が抑制され同時にER α が発現するMCF10A細胞を用いて、BRCA1機能不全細胞においてER α によってゲノム不安定性が生じるメカニズムについて解析した。その結果、ER α 発現・BRCA1抑制細胞では細胞の顕著な扁平化とともに、小核を有する細胞や多核細胞が増加し、分裂期のクロマチン架橋形成が亢進する傾向が認められたが、DNAの2次構造であるR-loopおよびグアニン4重鎖の蓄積に差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：MCF10A cells stably expressing ER α together with BRCA1-specific shRNA in a doxycycline-inducible manner were investigated to analyze mechanisms underlying ER α -induced genomic instability in BRCA1 deficient background. ER α expressing BRCA1-depleted cells exhibited flattened morphology, increased multiple nuclei with micronuclei, and tended to display increased mitotic chromosomal bridges, whereas they did not show significant difference in secondary DNA structures such as R-loop and G-quadruplex when compared to control cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：BRCA1 ER α 染色体不安定性 ヘテロクロマチン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

BRCA1 変異によって生じる癌の特徴は、女性特有の乳房と卵巣に発症するという臓器特異性であるが、なぜこのような臓器特異性が生じるかは明らかとなっていない。BRCA1 機能不全によって発症する Basal-like 型乳癌は一般にエストロゲンレセプター (ER) 陰性であるが、その発生母地は ER 陽性の乳腺上皮管腔前駆細胞由来であり、エストロゲン阻害薬であるタモキシフェンが BRCA1 発癌に対して予防効果を持つことから、エストロゲンシグナルが発癌に何らかの役割を果たすと考えられる。そのメカニズムは諸説あるが、いずれも癌発症への寄与は明らかでない。研究代表者らはこれまで、BRCA1 が E3 ユビキチンリガーゼであることを発見し、BRCA1 を中心に DNA 損傷応答に関する解析を行ってきた。平成 26 年度より DNA 損傷とヘテロクロマチン再構成という 2 つの観点から BRCA1 欠失と ER の作用によって生じる発癌の可能性について解析を行っている。しかし、*in vivo* において BRCA1 発癌が ER 依存的に生じるという直接的な証明はない。一方、BRCA1 あるいは BRCA2 を阻害すると転写の際に生じる G-quadruplex やそれに伴う R-loop を処理することができず、DNA 損傷が生じることが相次いで報告され、ER による DNA 損傷の一因である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

乳癌・卵巣癌抑制遺伝子 BRCA1 の変異で生じる癌の臓器特異性には、ER が関与すると考えられているが、*in vivo* の直接的な証明はなく、癌発症のメカニズムも明確ではない。本研究では Doxycycline (Dox) 誘導性に BRCA1 発現が抑制されると同時に ER が発現する乳腺細胞株を用いて、ER のエピジェネティック作用でゲノム不安定性が生じる BRCA1 欠損細胞ではこれを修復できず、DNA 損傷が増強するというメカニズムを解明することを目的とした。BRCA1 欠損細胞では ER による転写に伴って R-loop が異常集積した結果、DNA の複製および修復異常が生じ、染色体異常に繋がる。また、サテライトなどの H3K9me 領域にヘテロクロマチン形成異常が起きる。これらの変化の結果、細胞は異常増殖能を獲得することが予想される。臓器特異性の謎が解明され、BRCA1 変異癌が ER 依存的に生じることが証明されれば、家族性卵巣癌の予防手術の方法にも重大な影響をもたらすものと考えられる。

3. 研究の方法

1) 細胞および培養条件: Dox 誘導性に BRCA1 に対する shRNA が発現し、BRCA1 の発現が抑制される MCF10A 安定細胞株、Dox 誘導性に ER が発現する MCF10A 安定細胞株、

Dox 誘導性に BRCA1 に対する shRNA とともに ER が発現する MCF10A 安定細胞株 (ER /shBRCA1 細胞) MCF10A 親株を用いた。Dox 添加後 48 時間に各実験に供した。その際、BRCA1 および ER の発現はウェスタンブロットにて確認した。

2) R-loop の集積: R-loop には RNase H1 が集積するため、GFP タグをつけた RNaseH1 の DNA-RNA hybrid binding (HB) ドメインを発現させ、R-loop の集積をフローサイトメータにて検出した。

3) グアニン 4 重鎖 (G-quadruplex DNA: G4) の蛍光免疫染色: 細胞を methanol:acetic acid (3:1) 混合液および RNase A を加えた 0.5% Triton X-100/PBS にて処理した後、洗浄、ブロッキングし、1次抗体として BG4 マウスモノクローナル抗体 (Absolute antibody 社) および蛍光標識二次抗体で染色した。染色したサンプルは共焦点顕微鏡 (LSM 510, Carl Zeiss) にて撮影した後 Cellomics Image Analyzer (Thermo Fisher) で G4 foci の数を定量化した。

4) G-quadruplex DNA を解除する DNA ヘリカーゼである FANCD1 と BLM の DNA 損傷部位への集積状況を上記に準じて蛍光免疫染色にて解析した。

5) 姉妹染色分体交換 (Sister Chromatid exchange: SCE): DNA 複製障害に伴い、相同組換え修復が頻繁に生じると SCE が高率検出される。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、ギムザ染色し、検鏡し、1サンプルにつき 20 細胞以上について 1細胞あたりの SCE の数をカウントした。

6) 染色体異常の解析: 分裂期の核をスライドガラス上に展開し、G-banding にて染色体異常を解析した。

4. 研究成果

1) Dox 誘導性に BRCA1 に対する shRNA と ER が同時に発現する MCF10A 細胞を用いて、BRCA1 機能不全細胞において ER によってゲノム不安定性が生じるメカニズムを明らかにすべく、R-loop の集積をフローサイトメータおよび共焦点顕微鏡にて解析したが、明らかな結果を得るには至らなかった。そこで、BLM、WRN および FANCD1 など、BRCA1 と共役し、G4 を解除するヘリカーゼの機能不全によって G4 が蓄積する可能性を考慮し、これを解析するために BG4 抗体を用いて蛍光免疫染色し、セロミクスにて G4 を定量化する方法を確立した。この方法を用いて BLM 阻害剤および G4 安定化剤である telomestatin や pyridostatin による G4 の有意な増加を確認できたが、残念ながら ER /shBRCA1 細胞と各種コントロール細胞の間に G4 蓄積の差は認めなかった。

2) 頭書はマウスモデルの解析を行う予定であったが、BRCA1 11/+マウスをアメリカ NCI

の Mouse repository より入手を試みるも、入手出来なかったため、Cas9/CRISPR によるノックアウト細胞の作成に着手した。技術習得のため、近 2 倍体で相同組換え修復能が高く、ノックアウトが比較的容易な HCT116 細胞と LentiCRISPRv2 を用いたノックアウト技術を確立した。

3) ER を発現せず BRCA1 発現が正常な MCF10A 細胞、ER 発現のみ生じる細胞および BRCA1 のみ抑制されるコントロールの細胞に比較して、shBRCA1/ER 細胞では細胞の顕著な扁平化とともに、小核を有する細胞や多核細胞が増加していたことから、shBRCA1/ER 細胞において DNA の複製が障害され、結果として細胞分裂期にクロマチンの架橋形成が形成されて小核や多核が生じることが示唆された。そこで、さらに架橋形成を再度解析したところ、shBRCA1/ER 細胞では分裂期のクロマチン架橋形成が亢進する傾向が認められた。これらの結果から BRCA1 欠損下で ER が作用すると正常な DNA 複製ができない可能性が示唆された。

4) 姉妹染色分体交換の解析を試みるも HeLa 細胞、HCT116 細胞では解析法を確立したものの、細胞株によって検出しやすさに大きな違いがあり、MCF10A 細胞での条件設定は困難で解析に至らなかった。そこで、染色体異常について解析を行ったところ、ER を発現せず BRCA1 発現が正常な MCF10A 細胞、ER 発現のみ生じる細胞および BRCA1 のみ抑制されるコントロール細胞に比較して shBRCA1/ER 細胞では高率に染色体異常が生じる傾向にあることが判明した。

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 2 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

[学会発表](計 8 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)

[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. 日本臨牀, 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：60233136