

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02334

研究課題名(和文)腫瘍におけるBRCA2の変異と結合分子群の機能解明を目的とした新規モデルの作出

研究課題名(英文) Generation of a novel model to elucidate the function of BRCA2 mutations and binding molecules in tumors

研究代表者

森松 正美 (Morimatsu, Masami)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：70241370

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)：イヌの癌抑制タンパク質BRCA2が腫瘍の発症に及ぼす影響を解明するため、BRCA2の発現調節、RAD51等の結合分子群や性ホルモン受容体関連分子に焦点をあてて研究した。イヌBRCA2のスプライシングバリエントを組織や細胞株で発見し、ヒトにおいても細胞株で類似のバリエントが認められた。遺伝子変異については、BRCA2とその相互作用分子の変異が機能に及ぼす影響等を解明した。イヌとヒトのBRCA2のC末端RAD51結合ドメインを比較し、コアモチーフを同定した。BRCA2のC末端にRAD51結合ドメインがX線照射やマイトマイシンC処理への抵抗性を増加させること等を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イヌの獣医療において、乳腺腫瘍は雌イヌで全腫瘍の約半数を占めて発症頻度が高く、その約半数が悪性となる。本研究では、BRCA2スプライシングバリエントを調べ、イントロン1においてヒトとイヌで保存された配列にサイレンサーとして機能する領域があることを見出した。BRCA2のC末端RAD51結合ドメインの変異(S3323N)が機能的に中立であることや、BRCA2と相互作用するp53の変異による四量体形成不全がDNA損傷時の細胞周期や細胞死に影響すること等を示した。これらの知見は、イヌ乳腺腫瘍の獣医学等に有益な情報を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the effects of the canine tumor suppressor protein BRCA2 on tumorigenesis, we focused on the regulation of BRCA2 expression, a group of binding molecules such as RAD51, and sex hormone receptor-related molecules. Splicing variants of canine BRCA2 were found in tissues and cell lines, and similar variants were found in human cell lines. We have elucidated the effects of mutations in BRCA2 and its interacting molecules on the function of the gene. We compared the C-terminal RAD51-binding domain of canine and human BRCA2 and identified a core motif, and found that the C-terminal RAD51-binding domain of BRCA2 increased resistance to X-irradiation and mitomycin C treatment.

研究分野：Veterinary science

キーワード：BRCA2 Rad51 乳腺腫瘍 前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

癌抑制タンパク質 BRCA2 は、遺伝性乳癌の原因遺伝子産物 (breast cancer susceptibility protein) としてヒトの癌家系で同定され、その変異は乳癌、卵巣癌や前立腺癌などの発症リスクを上昇させる。

イヌの獣医療において、乳腺腫瘍は雌イヌで全腫瘍の約半数を占めて発症頻度が高く、その約半数が悪性となる。雄イヌの前立腺腫瘍はほとんどが悪性で、発見から数ヶ月以内に死亡する例が多い。生涯飼育を基本とする伴侶動物の獣医学において、腫瘍性疾患はますます重要となっている。申請者らはイヌの乳腺腫瘍や前立腺腫瘍に BRCA2 と RAD51 が関与すると予想して研究を展開してきた。そして、BRCA2 分子の核移行や RAD51 結合能を変化させる変異の症例での発見等を世界に先駆けて報告してきた。また、他の研究者が連鎖解析を行ってイヌ BRCA2 が乳腺腫瘍の発症に関与することを報告したが、「申請者らの報告を含めてこれまでに 20 種類以上が同定されたイヌ BRCA2 の変異が、腫瘍発症のリスクにどんな影響を及ぼすのか、その背景となるメカニズムは何か」については、適当な材料や手法が不十分なために不明な点が多い。

申請者らはイヌの乳腺腫瘍や前立腺腫瘍に BRCA2 の変異が関与すると予想して研究してきたが、イヌで家系ごとの発症履歴をたどるには困難が伴い、また、収集できるサンプル数はヒトと比べて少ないため、これまで発見した変異が実際に腫瘍発症リスクを上昇させるか否かには不明な点が多い。特定の変異が細胞の腫瘍化に与える影響を明確にするには、変異の有無で比較するのが理想である。

雌イヌの卵巣摘出術には乳腺腫瘍発症リスクの減少効果が認められ、雄犬の睾丸摘出術には前立腺腫瘍発症リスクの増加効果が認められることなどから、これらの腫瘍で性ホルモンが重要な機能を有することは明らかである。しかし、その機能の詳細には不明な点が多い。BRCA2 は約 3,300 アミノ酸から構成される大型分子で、RAD51 以外にも結合分子が報告されている。これらの結合分子を含め、遺伝子変異が機能に及ぼす影響の基礎知見を蓄積する必要がある。

2. 研究の目的

イヌの乳腺腫瘍および前立腺腫瘍について、癌抑制タンパク質 BRCA2 の変異が腫瘍の発症に及ぼす影響を解明する。また、BRCA2 結合分子群、すなわち RAD51 等に焦点をあてて、これら分子の相互作用部位の変異の影響等も解析して腫瘍発症におけるこれらの分子の役割を明らかにする。さらに、ヒトで性ホルモンによる発現調節が示唆されている分子群についてイヌでの発現調節や BRCA2 との相互作用を解析する。これらにより、イヌで新規の腫瘍の診断法や治療法の開発を目指した基礎研究の基盤を構築する。

3. 研究の方法

新規のイヌ由来 BRCA2 変異細胞や動物の研究モデルを作製し、BRCA2 変異が腫瘍の発症に及ぼす影響を評価した。実際にイヌの症例で見つかった BRCA2 の変異に加え、BRCA2 結合分子群、すなわち RAD51 や p53 等の変異の影響も解析した。

BRCA2 の特定の変異が細胞に与える影響を解明するため、いくつかの株化細胞で BRCA2 の全長配列を読解した。BRCA2 変異イヌ細胞の性状解析は、培養細胞に放射線照射等で DNA 損傷を誘導し、DNA 損傷感受性を細胞間で比較すること等により行なった。対象とした分子の機能ドメインの解析は、欠失あるいは配列置換等によって変異を導入するか、あるいは既存の細胞株で変異を同定した材料を使用して実施した。

4. 研究成果

- (1) BRCA2 に相互作用することがヒトで報告されているがん抑制遺伝子産物 p53 について、イヌの乳腺腫瘍細胞株 CBT-m2 で Leu332Gln 変異が存在することを発見した。p53 は、遺伝毒性誘導ストレスに応答して機能が活性化し、DNA 損傷細胞の細胞周期停止やアポトーシス誘導を引き起こし、細胞のがん化を防ぐと考えられている。私たちが発見したイヌ p53 の変異は、ヒトで p53 の活性型である四量体の形成に関与すると報告されていることに着目し、CBT-m2 細胞の性状を解析したところ、野生型の p53 を有する CBT-m 細胞株に比べて細胞増殖能が上昇していた。p53 四量体化による転写活性化のレポーター解析実験系を確立したところ、変異型では活性の低下が見られた。更に架橋試薬で処理した後に電気泳動解析を行ったところ、四量体形成能が低下していることがタンパク質化学的にも確認された。また、立体構造の in silico 解析でも、この変異アミノ酸が p53

分子間の会合部位に位置すると考えられた。これらの結果から、CBT-m 細胞株は、イヌ由来の p53 の機能解析に有用であることが示され、更には BRCA2 の機能解析にも応用可能である可能性が示唆された。

- (2) イヌ BRCA2 の RAD51 結合配列をコードするエキソン 11 について、イヌの腫瘍組織を収集して変異の解析を行った。これにより、疾患遺伝子としてイヌ BRCA2 を評価するための、新たな変異データが蓄積された。
- (3) RAD51 の変異がイヌの乳腺腫瘍で他の研究者により報告されたが、この変異の RAD51 分子における意義は不明だったため、変異体を作製して機能解析を行った。既報の A209S 及び T225S 変異はともに RAD51 ホモ会合体結合面付近に位置することが *in silico* 解析により分かった。そのうち T225S 変異は同一分子内での構造変化を予測させる結果となった。ツーハイブリッド法およびプルダウン法の結果、A209S、T225S 変異ともにホモ会合体形成能低下が観察された。PALB2 との相互作用については A209S でより強い低下が観察された。これらより、乳腺腫瘍罹患イヌから同定された RAD51 変異 A209S および T225S は RAD51 分子機能に影響をおよぼすことが予測された。
- (4) BRCA2 では C 末端に RAD51 結合領域(CTRBD)が同定されているが、この領域のイヌでの機能には不明な点が多い。この領域より下流のアミノ酸配列が存在すると RAD51 との結合性が減弱したため、この下流配列は結合を抑制することが示唆された。イヌとヒト BRCA2 の CTRBD の RAD51 への結合性を比較した結果、イヌの CTRBD は RAD51 への結合性が低く、両方で保存されていないアミノ酸配列が RAD51 との結合に影響すると考えられた。
- (5) イヌ BRCA2 の 5' 非翻訳領域に存在するスプライシングバリエントを発見し、ヒトにおいても類似のバリエントが認められた。これらスプライシングバリエントの機能を調べるために培養細胞に発現ベクターで導入したところ、ほとんどのバリエントが翻訳効率を低下させることが判明した。さらに転写への影響を調べたところ、イントロン 1 においてヒトとイヌで保存された配列にサイレンサーとして機能する領域があることを見出した。
- (6) イヌとヒトの BRCA2 の C 末端 RAD51 結合ドメインを比較し、25 アミノ酸からなるこのドメインのコアモチーフが同定された。このモチーフに変異(S3323N)が報告されていたが、野生型タンパク質と同様の RAD51 結合活性を示して機能的に中立であることが示唆された。
- (7) イヌの前立腺癌の発生率は低いものの、アンドロゲン療法に抵抗性を示して臨床的予後は不良である点でヒトのアンドロゲン非依存性前立腺癌に似ている。イヌのアンドロゲン受容体(AR)は、その N-末端にポリグルタミン(polyQ)配列を有する。イヌの AR の N 末端における polyQ は、AR のシグナル強度に影響を与え、イヌの前立腺癌のリスクに寄与している可能性を示した。
- (8) BRCA2 と結合することが報告されているがん抑制分子 p53 は、DNA 損傷にตอบสนองして四量体を形成し、p21 転写を制御して細胞周期の停止を促しており、その間に DNA 損傷修復が行われて細胞の恒常性が維持される。p53 の四量体形成ドメインに変異(p53wt/L332Q)を持つイヌ乳腺腫瘍細胞株 CTB-m2 を樹立し、DNA 損傷発生時の細胞性状を対照株(CTB-m:p53wt/wt)と比較した。Dox 暴露および放射線照射により CTB-m では細胞周期の停止が見られたが、CTB-m2 では停止せず、細胞生存率は CTB-m2 と比べて CTB-m で高かった。ドキソルピシン(Dox)刺激に加え、放射線照射によっても CTB-m のみで p21 の発現が観察された。RAD51 等の相同組換え(HR)関連分子は、DNA 損傷刺激で細胞周期が停止しない CTB-m2 で発現が多い傾向が見られた。よって、p53 四量体形成不全細胞は、DNA 損傷時に細胞周期の停止が起こらず S 期に移行し、HR は亢進するが修復しきれずに細胞死が起こると考えられた。
- (9) BRCA2 は、C 末端に RAD51 結合ドメイン(CTRBD)を持ち、RAD51 オリゴマーを含むヌクレオフィラメントと相互作用する。培養細胞で CTRBD を発現させると X 線照射とマイトマイシン C 処理への抵抗性が増加することを見出した。CTRBD が相同組換え効率の向上を介してこの増加を導くと考えられ、このペプチドは、X 線照射や化学療法剤から細胞を保護するために有用だと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhu Zida, Kitano Taisuke, Morimatsu Masami, Ochiai Kazuhiko, Ishiguro-Oonuma Toshina, Oosumi Kosuke, Lin Xianghui, Orino Koichi, Yoshikawa Yasunaga	4. 巻 10
2. 論文標題 A Highly Conserved Region in BRCA2 Suppresses the RAD51-Interaction Activity of BRC Repeats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 145 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci10020145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimakawa Kei, Ochiai Kazuhiko, Hirose Sachi, Tanabe Eri, Michishita Masaki, Sakaue Motoharu, Yoshikawa Yasunaga, Morimatsu Masami, Tajima Tsuyoshi, Watanabe Masami, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Canine Mammary Tumor Cell Lines Derived from Metastatic Foci Show Increased RAD51 Expression but Diminished Radioresistance via p21 Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 703 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci9120703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhu Zida, Kitano Taisuke, Morimatsu Masami, Tanaka Arisa, Morioka Ryo, Lin Xianghui, Orino Koichi, Yoshikawa Yasunaga	4. 巻 23
2. 論文標題 BRCA2 C-Terminal RAD51-Binding Domain Confers Resistance to DNA-Damaging Agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4060 ~ 4060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Marika, Ochiai Kazuhiko, Michishita Masaki, Morimatsu Masami, Sakai Hiroki, Kinoshita Nayuta, Sakaue Motoharu, Onozawa Eri, Azakami Daigo, Yamamoto Masami, Ishioka Katsumi, Sadahira Takuya, Watanabe Masami, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 47
2. 論文標題 In vitro anticancer effects of alpelisib against PIK3CA?mutated canine hemangiosarcoma cell lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 84 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Kazuhiko, Sutijarit Samak, Uemura Mitsuki, Morimatsu Masami, Michishita Masaki, Onozawa Eri, Maeda Marika, Sasaki Takanori, Watanabe Masami, Tanaka Yoshikazu, Omi Toshinori	4. 巻 19
2. 論文標題 The number of glutamines in the N terminal of the canine androgen receptor affects signalling intensities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 399-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Yasunaga, Kozuma Hajime, Morimatsu Masami, Sugawara Kaori, Orino Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced translation efficiency due to novel splicing variants in 5' untranslated region and identification of novel cis-regulatory elements in canine and human BRCA2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-020-00336-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YOSHIKAWA Yasunaga, MORIMATSU Masami, OCHIAI Kazuhiko, ISHIGURO-OONUMA Toshina, MORIOKA Ryo, OKUDA Kento, ORINO Koichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Identification of the core motif of the BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain by comparing canine and human BRCA2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 759-766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Mitsuki, Ochiai Kazuhiko, Morimatsu Masami, Michishita Masaki, Onozawa Eri, Azakami Daigo, Uno Yumiko, Yoshikawa Yasunaga, Sasaki Takanori, Watanabe Masami, Omi Toshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Kazuhiko, Azakami Daigo, Morimatsu Masami, Hiram Hinako, Kawakami Shota, Nakagawa Takayuki, Michishita Masaki, Egusa Ai, Sasaki Takanori, Watanabe Masami, Omi Toshinori	4. 巻 40
2. 論文標題 Endogenous Leu332Gln mutation in p53 disrupts the tetramerization ability in a canine mammary gland tumor cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 488-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 廣瀬紗千, 落合和彦, 岩崎(前田)まりか, 道下正貴, 森松正美, 田中良和
2. 発表標題 p53四量体形成ドメイン変異イヌ乳腺腫瘍由来細胞株の性状解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朱子達, 北野泰佑, 森松正美, 折野宏一, 吉川泰永
2. 発表標題 BRCA2 C-terminal RAD51-binding domain confers resistance to DNA-damaging agents
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村光希, 落合和彦, 道下正貴, 吉川泰永, 前田まりか, 森松正美, 近江俊徳, 田中良和
2. 発表標題 イヌとヒトで異なるRAD51分子構造がDNA相同組換え修復効率におよぼす影響の検討
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上妻 創, 吉川 泰永, 森松 正美, 落合 和彦, 折野 宏一
2. 発表標題 癌抑制遺伝子Brca2のイントロン1における発現調節機構の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村光希, 落合和彦, 森松正美, 柏木伸旭, 宇埜友美子, 道下正貴, 皆上大吾, 小野沢栄里, 近江俊徳
2. 発表標題 イヌRAD51変異が複合体形成におよぼす影響の検討
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川泰永, 森松正美, 落合和彦, 田中杏里咲, 折野宏一
2. 発表標題 BRCA2のC末端RAD51結合領域におけるRAD51との結合に影響を与えるアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中沢綾香, 石黒(大沼)俊名, 落合和彦, 森松正美, 木崎景一郎
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p53に変異を有するイヌ乳腺腫瘍細胞に対する血管新生阻害薬の抗腫瘍効果の解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田有希, 富岡幸子, 竹内崇師, 八木田晴香, 尾崎絹代, 山本沙代, 森松正美, 笛吹達史, 小野悦郎
2. 発表標題 MUC16発現腫瘍に対する可溶性Siglec-9の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合和彦, 平間日奈子, 森松正美, 川上翔太, 道下正貴, 中川貴之, 皆上大吾, 稲垣健志, 坂本敦司, 近江俊徳
2. 発表標題 イヌ乳腺腫瘍細胞株で生じたp53遺伝子変異の検出と機能解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川泰永, 大隅恒佑, 森松正美, 折野宏一
2. 発表標題 腫瘍抑制遺伝子BRCA2のエキソン11 における新規腫瘍関連変異の検索
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中沢綾香, 石黒(大沼)俊名, 落合和彦, 森松正美, 木崎景一郎
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p53に変異を有するイヌ乳腺腫瘍由来細胞の性状解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	落合 和彦 (Ochiai, Kazuhiko) (30550488)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	
研究 分担者	安居院 高志 (Agui, Takashi) (00212457)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------