

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500999

研究課題名（和文） ヒト細胞遺伝子改変法によるBRCA1ヘテロ欠失細胞の作成と解析

研究課題名（英文） Characterization of human BRCA1 heterozygous knockout cell lines created by somatic cell gene targeting

研究代表者

小西 裕之 (KONISHI HIROYUKI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20344335

研究成果の概要（和文）：

*BRCA1* ヘテロ異常が乳癌発生に果たす役割を検討するため、遺伝子ターゲティングにより非癌ヒト乳腺上皮細胞から *BRCA1* ヘテロ欠失クローンを作成し、表現型を解析した。その結果、同クローンに癌形質の獲得を示唆する徴候は認めなかったが、DNA 相同組換え修復不全、ゲノム傷害性薬剤感受性亢進、ゲノム不安定性を認めた。よって、*BRCA1* ヘテロ変異は直接形質転換を誘導し癌化を進行させることはないが、ハプロ不全を介して乳癌発生の素地を形成するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To assess the role for heterozygous *BRCA1* inactivation in breast carcinogenesis, we created *BRCA1* heterozygous knockout clones by targeting the *BRCA1* gene in noncancerous human breast epithelial cell lines. These clones demonstrated impaired DNA repair via homologous recombination, hypersensitivity to genotoxic agents, and genomic instability, but exhibited no properties of transformed cells. These data suggest that haploinsufficiency caused by *BRCA1* heterozygous mutation does not directly lead to cellular transformation or tumor development, but may be involved in the initiation of breast carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：BRCA1・ハプロ不全・ゲノム不安定性

## 1. 研究開始当初の背景

*BRCA1* は、遺伝性乳癌で最も高頻度に変異が検出される癌抑制遺伝子であり、そのヘテ

ロ変異（不活化変異）を生殖細胞系列に持つキャリア女性の約85%が乳癌を発症する。しかし、*BRCA1* はDNA修復など基本的な細胞機能に重要な役割を果たすことから、同遺伝子

のホモ変異を持つ細胞や個体は生存不可能と考えられている。実際、人工的に *BRCA1* の両アレルを破壊した遺伝子改変マウスは、細胞が汎発性にアポトーシスに陥り発生早期に胎生致死となる。

一方、*BRCA1* キャリア女性から発生する乳癌検体では、ほぼ 100%の割合で同遺伝子の野生型アレルが失われており、その遺伝子機能は完全に失われている。重要な細胞機能が破綻した状態で、*BRCA1* 変異乳癌細胞がどのように細胞死を免れ、無限増殖能を獲得し、癌細胞としての特性を維持するのかが不明である。マウスモデルを使用した研究からは、*p53* 遺伝子などの異常が細胞に併存すると *BRCA1* 欠失による細胞死が部分的に抑制されることが示唆されている。しかしこの場合でも、それらの付加的な遺伝子異常がなぜ *BRCA1* ホモ異常の成立前にゲノムに蓄積するのかは明らかでない。

ひとつの仮説としては、*BRCA1* ヘテロ変異がハプロ不全を呈しゲノム不安定性を誘導することによって、*p53* 遺伝子などの付加的な異常がキャリア女性の非癌乳腺上皮細胞に蓄積するというシナリオが考えられる。この仮説を検証するためには、*BRCA1* ヘテロ変異を持つ細胞や個体とその対照である野生型 *BRCA1* アレル 2 本を持つ細胞・個体との間で厳密な表現型比較を行い、ハプロ不全の有無を探る必要がある。しかしながら、*BRCA1* に関する遺伝子改変マウスは数多く作成され、*BRCA1* ヘテロ異常マウスも多数存在するものの、*BRCA1* キャリア女性と異なり、*BRCA1* ヘテロ異常マウスでは乳癌の自然発生を認めない。したがって、*BRCA1* のハプロ不全の有無の検討はマウス以外の生物種の細胞や個体において行う必要がある。特に、医学の進歩に直接つながる知見を得るためにはヒト細胞を用いることが望ましい。

## 2. 研究の目的

上記のような研究上の背景より、本研究では非癌ヒト乳腺上皮に由来する不死化細胞株の遺伝子ターゲティングを行い、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンを作成した。次に、作成した細胞クローンと対照細胞（親株など）からなるクローンペアに対して DNA 相同組換え修復能、ゲノム不安定性、染色体異数性などに関する解析を行い、*BRCA1* 遺伝子にハプロ不全が存在するか否かを検討した。また、同細胞クローンペアを腫瘍生物学的に解析し、*BRCA1* ハプロ不全がヒト乳腺上皮細胞の形質転換を誘導するか否かを検討した。最後に、*BRCA1* の転写制御因子としての機能に鑑み、細胞クローンペアのマイクロアレイ遺伝子発現解析を行い、*BRCA1* ヘテロ欠失によって

発現が変動する *BRCA1* 下流遺伝子の同定を目指した。これらの解析により、乳癌発生のごく初期段階で *BRCA1* ヘテロ欠失が同遺伝子のハプロ不全を介して癌化の素地形成に直接関与するの否かについて厳密で信頼性の高いアッセイ系を用いて検討し、手がかりを得ることを目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *BRCA1* ヘテロ欠失クローンの樹立

本研究の準備として、不死化ヒト乳腺上皮細胞株に由来する *BRCA1* ヘテロ欠失クローンとその対照細胞群（親株など）からなる細胞クローンペアを樹立した。まず、2 種類の非癌ヒト乳腺上皮細胞株（自然不死化細胞株 MCF-10A および *hTERT* 導入による不死化細胞株 *hTERT*-IMEC）に対して遺伝子ターゲティングを行い、これらの細胞株が持つ野生型 *BRCA1* アレル 2 本中 1 本を *BRCA1* の最も一般的な癌原性不活化型変異アレルのひとつである 185de1AG フレームシフト変異アレルに置換（ノックイン）した。これにより、MCF-10A と *hTERT*-IMEC からそれぞれ複数の *BRCA1* ヘテロ欠失クローンを樹立した。

続いて、樹立したクローンにおいて遺伝子ターゲティングによる *BRCA1* ヘテロ欠失のノックインが計画通り達成されていることを PCR などによって確認した。また、ノックインされた *BRCA1* 185de1AG アレルが野生型アレルとほぼ同程度に発現されることを逆転写 PCR 産物のキャピラリー泳動および塩基配列決定によって確認した。さらに、ターゲティング・ベクターがゲノムにランダムに組み込まれたクローンを MCF-10A および *hTERT*-IMEC からそれぞれ樹立し、対照細胞クローンとして以降の実験に供用した。

### (2) *BRCA1* ヘテロ欠失クローンにおける DNA 修復能およびゲノム安定性の解析

DNA 修復能の評価は、細胞に導入したベクター DNA に二重鎖切断を導入し、その修復の発生効率を定量する方法で行った。まず、それぞれ GFP 遺伝子の 5' および 3' 末端側部分配列（重複あり）からなる 2 つの DNA 断片を制限酵素 I-*SceI* 切断部位の前後に配置し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。このベクター-BABE-HR を細胞に導入した後、制限酵素 I-*SceI* を発現するプラスミドを同細胞に導入し、BABE-HR 内での DNA 切断と相同組換えによる全長型 GFP 遺伝子の再構築を誘導した。発現する GFP シグナルの強度により DNA 相同組換え修復の発生効率を定量した。

アドリアマイシンや PARP 阻害剤 (NU1025

および ABT-888) に対する細胞クローンの感受性は、MTT アッセイに基づく方法で評価した。まず 96 穴組織培養用プレートに細胞を播種した後、様々な濃度で薬剤を添加して一定期間細胞を培養し、生存細胞の個数を MTT アッセイで定量した。

ゲノム不安定性の解析は、細胞クローンペアのゲノムコピー数を SNP アレイおよび蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより計測し、結果をクローン間で比較することによって行った。SNP アレイはイルミナ社の Cancer SNP Panel を使用した。

### (3) *BRCA1* ヘテロ欠失クローンの腫瘍生物学的解析および遺伝子発現解析

各細胞クローンの増殖速度の計測、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、軟アガロース培地培養による足場非依存性細胞コロニー形成能の評価は、一般的な方法により行った。

マイクロアレイ解析用のアレイスライドは、Agilent Technologies 社のオリゴ DNA マイクロアレイシステムを使用し、得られたシグナルは Feature Extraction ソフトウェアによって定量した。まずそれぞれの細胞クローンから型通りに RNA を抽出し、蛍光色素 Cy3 でラベリングした後アレイスライドにハイブリダイゼーションした。取得したデータに基づき、細胞クローン群のクラスタリング解析やクローンペア間で発現量に乖離がある遺伝子の同定を行った。

## 4. 研究成果

*BRCA1* ヘテロ欠失により乳腺上皮細胞に DNA 修復能異常が誘導されるか否かを検討するため、まず細胞クローンに感染させたレトロウイルスベクター-BABE-HR 上に DNA 二重鎖切断を導入し、相同組換え修復の発生効率を定量した。その結果、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンの相同組換え能に有意な低下を認めた。DNA 相同組換え修復能が低下した細胞では一般にゲノム傷害性薬剤に対する感受性が上昇するので、次に、それぞれの細胞クローンのアドリアマイシンおよび PARP 阻害剤 (NU1025 と ABT-888) に対する感受性を計測した。その結果、PARP 阻害剤感受性には両細胞クローン群間で有意差を認めなかったが、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンのアドリアマイシン感受性に有意な上昇を認めた。続いて、両細胞クローン群を SNP アレイで解析したところ、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンのゲノム各所に散発的なコピー数低下が検出され、DNA 相同組換え修復能の低下により同クローンにゲノムのコピー数異常が誘導されている可

能性が示唆された。また、癌関連遺伝子座上に設定したプローブを用いて蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行ったところ、同様に *BRCA1* ヘテロ欠失クローンにおけるゲノム各所のコピー数異常が検出された。これらの実験結果から、*BRCA1* ヘテロ欠失に起因するハプロ不全により正常ヒト乳腺上皮細胞に DNA 相同組換え修復不全が誘導され、その結果、ゲノム不安定性および染色体コピー数の異常がもたらされることが示唆された。

続いて、DNA 相同組換え修復不全やゲノム不安定性により *BRCA1* ヘテロ欠失クローンに癌形質が誘導されるか否かを検討した。まず、*BRCA1* ヘテロ欠失クローン群と対照細胞群を EGF 含有培地および非含有培地で培養し、増殖速度を計測した。また、足場非依存性増殖能を検討するため、両細胞クローン群を軟アガロース半固形培地で培養した。その結果、予想と異なり、EGF 含有培地で *BRCA1* ヘテロ欠失クローン群の細胞増殖速度が対照細胞群に比べて有意に低下していた。これは、*BRCA1* ヘテロ欠失によりゲノム複製時の DNA 相同組換え修復不全が発生し、同クローン中の一部の細胞集団が増殖停止または細胞死をきたすことによると推察された。実際、フローサイトメトリーで両細胞クローン群の細胞周期分布を解析したところ、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンの G0/G1 期細胞の割合が対照細胞群に比べて有意に高かった。一方、軟アガロース培地では両群共にコロニー形成を認めなかったことから、*BRCA1* ヘテロ欠失クローン群に有意な形質転換の徴候は見られないものと結論した。以上により、*BRCA1* ヘテロ欠失は細胞に DNA 相同組換え修復不全とゲノム不安定性を誘導する結果、乳癌発生の初期段階で癌化の素地形成に関与することが示唆された。しかし、*BRCA1* ヘテロ欠失が直接形質転換を誘導することはなく、したがって *BRCA1* ヘテロ欠失だけでは癌化の進行に不十分であることが示唆された。

最後に、*BRCA1* には転写制御因子としての機能もあることから、*BRCA1* ヘテロ欠失クローン群と対照細胞群の遺伝子発現をマイクロアレイ解析によって比較した。得られたデータに基づいて細胞クローン群をクラスタリングしたところ、細胞クローンは *BRCA1* 変異の有無に従い 2 つのグループに区分された。また、個々の遺伝子の発現データから、*BRCA1* ヘテロ欠失クローンにおいて発現亢進をきたしている多数の遺伝子が見出された。

## 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 9 件)

- ① 小西裕之. KRAS 変異がんの治療法 --- 複数の分子標的薬剤を併用する ---. 実験医学 31: 538-539, 2013. 査読無 <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/nhpd/9784758100939/c3.html>
- ② Takahashi M, Ota A, Karnan S, Ekhtear H, Konishi Y, Damdindorj L, Konishi H, Yokochi T, Nitta M, Hosokawa Y. Arsenic trioxide prevents nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 by inhibiting a TRIF-dependent pathway. *Cancer Sci*, 104: 165-70, 2013. 査読有 DOI: 10.1111/cas.12053
- ③ Karnan S, Konishi Y, Ota A, Takahashi M, Damdindorj L, Hosokawa Y, Konishi H. Simple monitoring of gene targeting efficiency in human somatic cell lines using the PIGA gene. *PLoS ONE*, 7: e47389, 2012. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0047389
- ④ Konishi Y, Karnan S, Takahashi M, Ota A, Damdindorj L, Hosokawa Y, Konishi H. A system for the measurement of gene targeting efficiency in human cell lines using an antibiotic resistance-GFP fusion gene. *BioTechniques*, 53: 141-152, 2012. 査読有 DOI: 10.2144/0000113911
- ⑤ Damdindorj L, Karnan S, Ota A, Takahashi M, Konishi Y, Hossain E, Hosokawa Y, Konishi H. Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human  $\beta$ -actin promoter region. *Plasmid*, 68: 195-200, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.plasmid.2012.07.003
- ⑥ Garay JP, Karakas B, Abukhdeir AM, Cosgrove DP, Gustin JP, Higgins MJ, Konishi H, Konishi Y, Lauring J, Mohseni M, Wang GM, Jelovac D, Weeraratna A, Sherman Baust CA, Morin PJ, Toubaji A, Meeker A, De Marzo AM, Lewis G, Subhawong A, Argani P, Park BH. The growth response to androgen receptor signaling in ERalpha-negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res*, 14: R27, 2012. 査読有 DOI: 10.1186/bcr3112
- ⑦ Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17773-8, 2011. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1110969108
- ⑧ Higgins MJ, Beaver JA, Wong HY, Gustin JP, Lauring JD, Garay JP, Konishi H, Mohseni M, Wang GM, Cidado J, Jelovac D, Cosgrove DP, Tamaki A, Abukhdeir AM, Park BH. PIK3CA mutations and EGFR overexpression predict for lithium sensitivity in human breast epithelial cells. *Cancer Biol Ther*, 11: 358-67, 2011. 査読有 DOI: 10.4161/cbt.11.3.14227
- ⑨ Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, Takahashi T. Novel Metastasis-Related Gene CIM Functions in the Regulation of Multiple Cellular Stress-Response Pathways. *Cancer Res*, 70: 9949-58, 2010. 査読有 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1055
- ⑩ Lauring J, Cosgrove DP, Fontana S, Gustin JP, Konishi H, Abukhdeir AM, Garay JP, Mohseni M, Wang GM, Higgins M, Gorkin D, Reis M, Vogelstein B, Polyak K, Cowherd M, Buckhaults PJ, Park BH. Knock in of the AKT1 E17K mutation in human breast epithelial cells does not recapitulate oncogenic PIK3CA mutations. *Oncogene*, 29: 2337-45, 2010. 査読有 DOI: 10.1038/onc.2009.516

[学会発表] (計8件)

- ① Konishi H, A mutation in a single BRCA1 allele leads to genomic instability in human breast epithelial cells、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4

日、名古屋国際会議場（愛知県）

- ② 太田明伸、CCL8 濃度と CCL8 陽性細胞の増加はマウス肺の GVHD 病態と密接に関与する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ③ 小西裕之、BRCA1 ヘテロ変異によってヒト乳腺上皮細胞にゲノム不安定性が発生する、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館（京都府）
- ④ Sivasundaram Karnan、ヒト体細胞株における PIGA 遺伝子を利用した遺伝子ターゲティング効率定量系の作成、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館（京都府）
- ⑤ Konishi H、A new protocol of somatic cell gene targeting in human cell lines and its application to breast cancer research、第 15 回日韓がんワークショップ、2010 年 12 月 22 日、仁川シェラトンホテル（仁川、大韓民国）
- ⑥ 小西裕之、ヒト培養細胞遺伝子改変の新しい技術を用いた癌関連遺伝子の機能解析、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸国際展示場（兵庫県）
- ⑦ 小西裕之、ヒト培養細胞遺伝子改変の新しい技術を用いた癌関連遺伝子の機能解析、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場（大阪府）
- ⑧ 柳澤聖、細胞外ストレス応答を制御する新規肺がん転移関連遺伝子 CIM の機能解析、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場（大阪府）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

○報道関連（計 2 件）

- ① 平成 23 年 10 月 12 日、朝日新聞、朝刊、「遺伝性乳がん 治療法へ期待：発生メ

カニズム一部解明」、発表論文⑦（Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 17773-8, 2011）に関する紹介記事

- ② 平成 23 年 10 月 12 日、中日新聞、朝刊、「遺伝性乳がんの発生 変異遺伝子が直接関与」、発表論文⑦（Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 17773-8, 2011）に関する紹介記事

○アウトリーチ活動（計 1 件）

- ① 平成 23 年 11 月 25 日、インストラクター、大学研究室訪問による一日体験科学学習（私立豊川高等学校）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小西 裕之 (KONISHI HIROYUKI)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20344335

### (2) 研究分担者

細川 好孝 (HOSOKAWA YOSHITAKA)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60229193

シバスンダラン カルナン

(SIVASUNDARAM KARNAN)

愛知医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30557096

### (3) 連携研究者 なし