

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780313

研究課題名(和文)放射線治療抵抗性がんに対するRAD51を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new strategy targeting for the RAD51 overexpression mammary tumor

研究代表者

落合 和彦(Ochiai, Kazuhiko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：30550488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、ヒトおよびイヌのRAD51とBRCA2相互作用能力の違いについて詳細に検討し、RAD51高発現に起因するDNA相同組換え修復効率亢進がん細胞に対する放射線感受性復帰を促す新規治療分子創薬構築を目指した。その過程でヒトとイヌのRAD51の性質に差異をもたらすアミノ酸を特定できた。また、イヌにおけるBRCA2多型の犬種における分布を精査し、乳腺腫瘍罹患率との相関を考察した。

研究成果の概要(英文)：Canine BRCA2 and RAD51 genes locus has been associated with mammary tumors in female dogs. The BRCA2 protein is involved in homologous recombination repair via its interaction with RAD51 recombinase, an interaction mediated by 8 BRC repeats. Previous structural analyses of cancer-associated mutations affecting the BRC repeats have shown that the weakening of RAD51's affinity for even 1 repeat is sufficient to increase breast cancer susceptibility. In this study, we focused on 2 previously reported canine BRCA2 mutations (T1425P and K1435R) in BRC repeat 3 (BRC3), derived from mammary tumor samples. These mutations affected the interaction of canine BRC3 with RAD51, and were considered deleterious. Two BRC3 mutations (K1440R and K1440E), reported in human breast cancer patients, occur at amino acids corresponding to those of the K1435R mutation in dogs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：イヌ 乳腺腫瘍 BRCA2 RAD51 多型 乳がん

1. 研究開始当初の背景

放射線照射等により DNA に 2 重鎖切断が生じた際、切断部位は 3'末端突出型の 1 本鎖 DNA を形成する。一方、DNA 相同組換え修復 (以下、HR) 酵素 RAD51 は定常時の環状ホモ合状態から BRCA2 タンパク質内に存在する約 30 アミノ酸からなる 8 個繰返し配列である BRC repeat 構造 (以下、BRC) との複合体を形成する。RAD51-BRC 複合体は 1 本鎖 DNA 部位に移動し DNA-RAD51 フィラメント様構造を形成する。その後、DNA-RAD51 フィラメントは相同 DNA 鎖を用いた HR を行う (図 1)。本機構の破綻はゲノムの不安定化を引き起こし、細胞のがん化の引き金になると言われている。がん細胞の DNA を破壊しアポトーシス等の細胞死を誘導する放射線治療は、がん治療戦略の主要な選択肢として用いられるが、臨床現場においては RAD51 の高発現による放射線治療抵抗性がんの存在が報告されている。これは、過剰発現した RAD51 により HR 機構が亢進し、放射線による DNA 損傷誘導を無効化するためと考えられている。また、がん再発のイニシエータとなる「がん幹細胞」においても放射線抵抗性が増大し治療を困難にしているとの報告もある。このような場合においては、過剰発現した RAD51 による HR 効率を制御することが治療戦略において重要であると考えられる。

申請者らはこれまでに腫瘍性疾患が多いイヌの BRCA2 及び RAD51 遺伝子をクローニングし、その構造と機能について研究してきた。その中で、RAD51-BRC 複合体の形成能力に影響を与える可能性があるアミノ酸 (Val1532) をヒトとイヌの BRC 配列比較により世界に先駆けて特定した。このアミノ酸を Ile に置換 (V1532I) すると、BRC と RAD51 の結合力が増強した。また、この V1532I 置換型 BRC 分子を株化細胞内で強制発現させることにより HR 効率の指標である DNA 損傷時における核内の RAD51 の集合体形成を強く阻害することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本申請課題においては、腫瘍性疾患が多いイヌより分離した種々のがん組織由来株化細胞を用い、RAD51 の発現量と放射線治療抵抗性の相関を探るとともに、機能分子 BRC repeat を用いた、RAD51 を基軸とする DNA 相同組換え修復効率の制御を標的とした新規治療戦略の開発に向け以下を目的とした。

(1) RAD51 の発現量がもたらす HR 効率への影響の解析

イヌ由来各種がん細胞株における RAD51 発現量を定量し、高発現株と低発現株において放射線照射により誘導される細胞死の数を定量する。また、HR 効率についても定量的解析を試みる。

(2) 機能性 BRC 分子による RAD51 を介した HR 効率の制御

RAD51 との結合力に差がある BRC 分子を強制発現したがん細胞株に放射線を照射し、アポトーシス誘導能及び HR 効率を定量的に解析し、放射線感受性にもたらす影響について検討する。

3. 研究の方法

イヌ由来のがん組織から樹立された種々の株化細胞を用い、

(1) RAD51 の発現量と放射線照射によるアポトーシス誘導効率との相関を解析した。

イヌ由来各種がん細胞株における RAD51 発現量と放射線感受性の相関解析

現在所有しているイヌ由来の各種がん細胞株における RAD51 発現量を検索した。またヒトとイヌの RAD51 分子と ssDNA および dsDNA の親和性についても検討した。

(2) RAD51 による DNA 相同組換え修復効率に影響を与えるアミノ酸の同定

ヒトとイヌ型にアミノ酸を置換した各種 RAD51 タンパク質を精製し、ssDNA および dsDNA の親和性について検討した。

(3) BRC repeat 分子のアミノ酸配列を改変し、放射線治療感受性をより強力に増加させる分子を検索した。

申請者がこれまでに同定した V1532I 置換 [Ochiai et al., 2011 *FEBS Lett.*] に加え、各種文献で言及されている RAD51 結合力増強に繋がるアミノ酸置換 [Rajendra and Venkitaraman, 2010. *Nuc. Acid Res.*, Nomme et al. 2010. *J. Med. Chem.*] を施した改変型 BRC 分子を構築し、RAD51 との結合力を、申請者を主著とする論文で使用されている実験方法である Mammalian Two-Hybrid Assay により定量した。また、タンパク質立体構造解析シミュレーションソフト UCSF-Chimera [Pettersen et al. 2004. *J. Comput. Chem.*] を用いた *in silico* 解析を用いて RAD51 との結合力を高めるアミノ酸を検索する [5]。BRC 分子の構造改変については site direct PCR mutagenesis 法を用い、各種アミノ酸改変型 BRC 分子を構築した。

4. 研究成果

初年度平成 24 年度においては、イヌの乳腺腫瘍細胞株における RAD51 の発現状況および放射線感受性の相関を解析に着手した。RAD51 の発現は細胞周期等により増減するため、各種細胞の細胞周期を G0~G1 期に同期化する必要があった。しかし、技術的な改善により各細胞株が持つ RAD51 タンパク質発現量を、細胞周期を同期化した状態で正確に定量することが可能となった。また、RAD51 高発現放射線治療抵抗細胞株に対す

る DNA 相同組換え修復効率制御機能分子である改変型 BRC 分子の開発に関して、イヌ BRC3 領域の多型解析から K1435E 改変による RAD51 親和性増加因子を発見し、詳細な解析を行い査読付き国際学術雑誌 (Yoshikawa et al., 2012, *PLoS ONE* 7(10):e45833) に発表した。これにより、RAD51 による相同組換え修復を制御できる可能性がある機能分子の開発が加速化し、分子創薬の基盤が構築された。

2 年目の平成 25 年度は先の *PLoS ONE* で明らかとなったヒト RAD51 とイヌ RAD51 における BRCA2 との相互作用様式の相違について研究を展開した。具体的にはヒトとイヌの RAD51 で異なるアミノ酸に着目し、BRCA2 との相互作用強度を定量化し、どのアミノ酸が RAD51-BRCA2 複合体形成に重要なかを精査した。その過程でこれまでに注目されていなかった RAD51 構成アミノ酸が RAD51 ホモオリゴマー形成に重要であることを部分的に解明するに至った。この結果は比較生物学的見地から導き出された画期的成果であり、本研究を今後推進することによって RAD51 が持つ生物種を超えた普遍的な機能の一端を解明する一助となると考えられる。

最終年度の平成 26 年度においては、イヌ BRC repeat 3 (BRC3) に存在する多型配列が他の BRC repeats と共存した場合に RAD51 との相互作用にどのように影響するかについても検討した。BRC3 自体の RAD51 に対する結合力は強くないが BRC3 の多型が、隣接する BRC4 と RAD51 との相互作用に大きな影響を与えることを見出し査読付き英文雑誌に投稿し掲載が決定した (Ochiai et al., 2015, *Biomed Res.*, 36(2):155-158)。また、ヒトとイヌの RAD51 で異なるアミノ酸が RAD51 ホモオリゴマー形成能、BRC との相互作用および DNA 鎖交換効率におよぼす影響についての検討を試みた。コムギ由来無細胞系タンパク質発現により得られた各種 RAD51 と ssDNA および dsDNA の複合体形成能の測定を行うために、市販 RAD51 と ssDNA 親和性を RAD51 濃度を变化させて検証したところ、RAD51 濃度依存的に ssDNA-RAD51 複合体量が増加した。この基礎実験により、今後各種精製 RAD51 タンパク質の DNA 親和性を検討することが可能となった。今後は、各種 RAD51 の DNA 鎖交換能力、すなわち DNA 相同組換え修復効率についても検討したい。

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 17 件)

1. Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Kato, Y., Watanabe, M., Bonkobara, M., Morimatsu,

M., and Omi, T. (2015) Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomed. Res.*, 36(2):155-158. 査読 (有) doi: 10.2220/biomedres.36.155.

2. Ishiguro-Oonuma, T., Ochiai, K., Hashizume, K., and Morimatsu, M. (2015) A role of IFN- γ in regulating Nfkb expression in epidermal keratinocytes *Biomed. Res.*, 36(2):103-107. 査読 (有) doi: 10.2220/biomedres.36.103.

3. Fujio, K., Watanabe, M., Ueki, H., Li, SA., Kinoshita, R., Ochiai, K., Futami, J., Watanabe, T., Nasu, Y., and Kumon, H. (2015) A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase (PAP)-fused cytokines for prostate cancer treatment. *Oncol. Rep.*, 33(4):1585-1592. 査読 (有) doi: 10.3892/or.2015.3770

4. Udagawa, C., Tada, N., Asano, J., Ishioka, K., Ochiai, K., Bonkobara, M., Tsuchida, S., and Toshinori, Omi. (2014) The genetic association study between polymorphisms in uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 and metabolic data in dogs. *BMC Res. Notes*, 71:904. doi: 1186/1756-0500-7-904

5. Tanaka, T., Kasai, H., Yamashita, A., Okuyama-Dobashi, K., Yasumoto, J., Maekawa, S., Enomoto, N., Okamoto, T., Matsuura, Y., Morimatsu, M., Manabe, N., Ochiai, K., Yamashita, K., and Moriishi, K. (2014) Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88(22):13352-13366. 査読 (有) doi: 10.1128/JVI.02280-14

6. Ochiai, K., Hayama, S., Nakiri, S., Nakanishi, S., Ishii, N., Uno, T., Kato, T., Konno, F., Kawamoto, Y., Tsuchida, S., and Omi, T. (2014) Low blood cell counts in wild Japanese monkeys after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. *Sci. Rep.*, 4:5793. 査読 (有) doi:10.1038/srep05793

7. Guo, J., Yang, D., Okamura, H., Teramachi J., Ochiai, K., Qiu, L., and Haneji, T. (2014) Calcium hydroxide suppresses the virulence of lipopolysaccharide from *Porphyromonas endodontalis* to bone cells.

J. Dent. Res., 93(5):508-513. 査読 (有)
doi: 10.1177/0022034514526886.

8. Horiuchi, N., Aihara, N., Mizutani, H., Kousaka, S., Nagafuchi, T., Ochiai, M., **Ochiai, K.**, Kobayashi, Y., Furuoka, H., Asai, T., and Oishi, K. (2014)
Becker muscular dystrophy-like myopathy regarded as so-called “fatty muscular dystrophy” in a pig: a case report and its diagnostic method.

J. Vet. Med. Sci., 76(2): 243-248. 査読 (有)
doi.org/10.1292/jvms.13-0336

9. Watanabe, M., Sakaguchi, M., Kinoshita, R., Kaku, H., Ariyoshi, Y., Ueki, H., Tanimoto, R., Ebara, S., **Ochiai, K.**, Futami, J., Li, SA., Huang, P., Nasu, Y., Huh, NH., and Kumon, H. (2014)

A novel gene expression system strongly enhances the anticancer effects of a REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector.

Oncol. Rep., 31(3): 1089-1095. 査読 (有)
doi: 10.3892/or.2013.2958

10. Ishikawa, M., Yoshida, K., Okamura, H., **Ochiai, K.**, Takamura, H., Fujiwara, N., and Ozaki, K. (2013)

Oral Porphyromonas gingivalis translocates to liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway.

BBA-Mol. Basis. Dis., 1832(12) 2035-2043. 査読 (有)
doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.012

11. **Ochiai, K.**, Watanabe, M., Azakami, D., Michishita, M., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Metheenukul, P., Chahomchuen, T., Aoki, H., Kumon, H., Morimatsu, M., and Omi, T. (2013)

Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours.

Vet. J., 197(3) 769-775. 査読 (有)
doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.024

12. Hayama, S., Nakiri, S., Nakanishi, S., Ishii, N., Uno, T., Kato, T., Konno, F., Kawamoto, Y., Tsuchida, S., **Ochiai, K.**, and Omi, T. (2013)

Concentration of Radiocesium in the Wild Japanese Monkey (*Macaca fuscata*) over the First 15 Months after the Fukushima Daiichi Nuclear Disaster.

PLoS ONE, 8(7): e68530. 査読 (有)
doi:10.1371/journal.pone.0068530

13. Nakamura, M., Awaad, A., Hayashi, K., **Ochiai, K.**, and Ishimura, K. (2012)

Thiol-organosilica Particles Internally Functionalized with Propidium Iodide as a Multicolor Fluorescence and X-Ray Computed Tomography Probe and Application for Non-Invasive Functional Gastrointestinal Tract Imaging.

Chem. Mater., 24(19): 3772-3779. 査読 (有)
doi.org/10.1021/cm3023677

14. Yoshikawa, Y., **Ochiai, K.**, Morimatsu, M., Suzuki, Y., Wada, S., Taoda, T., Iwai, S., Chikazawa, S., Orino, K., and Watanabe, K. (2012)

Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3.

PLoS ONE, 7(10): e45833. 査読 (有)
doi:10.1371/journal.pone.0045833

15. Yoshida, K., Okamura, H., **Ochiai, K.**, Hoshino Y., Haneji, T., Yoshioka, M., Hinode, D., and Yoshida, H. (2012)

PKR plays a positive role in osteoblast differentiation by regulating GSK-3 β activity through a β -catenin-independent pathway.

Mol. Cell. Endocrinol., 361(2012):99-105. 査読 (有)
doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.019

16. Ueki, H., Watanabe, M., Kaku, H., Huang, P., Li, SA., **Ochiai, K.**, Hirata, T., Noguchi, H., Yamada, H., Takei, K., Nasu, Y., Kashiwakura, Y., and Kumon, H. (2012)
A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells.

Int. J. Oncol., 41(1):135-140. 査読 (有)
doi: 10.3892/ijo.2012.1417

17. Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., **Ochiai, K.**, Okuda, K., Taoda, T., Chikazawa, S., Shimamura, A., Omi, T., Bonkobara, M., Orino, K., and Watanabe, K. (2012)

Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2.

BMC Res. Notes, 51:173. 査読 (有)
doi:10.1186/1756-0500-5-173

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 加藤由比子、**落合和彦**、宇田川智野、皆上大吾、近江俊徳

アンドロゲン受容体分子成熟に関わるイヌ SGTA 遺伝子ホモログの構造と機能解析
第 45 回日本比較臨床医学会学術大会講演要旨 : p7 2015 年 3 月 1 日 東京都 府中市

2. **落合和彦**、関野大輝、宇田川智野、皆上大吾、大沼俊名、吉川泰永、森松正美、近江俊徳

DNA 相同組換えタンパク質 RAD51 の動物種特異的アミノ酸配列が機能に及ぼす影響の解析

第157回日本獣医学会学術集会講演要旨:p517 2014年9月11日 北海道 札幌市

3. 宇田川智野、片桐紗貴子、橘早紀、蒔田莉菜、古関純也、江添沙耶、谷口ひろみ、**落合和彦**、盆子原誠、土田修一、近江俊徳
ネコ AB 式血液型における抗原出現頻度と DNA タイピング

日本 DNA 多型学会第 22 回学術集会抄録集: p85 2013年11月21日~22日 宮城県 仙台市

4. **落合和彦**、宇田川智野、皆上大吾、近江俊徳

新規がん治療候補遺伝子 REIC/Dkk-3 イヌホモログの構造とアポトーシス誘導能の解析
第 44 回日本比較臨床医学会学術大会講演要旨:p3 2013年11月9日 愛知県 岡崎市

5. 蒔田莉菜、古関純也、宇田川智野、鄭英和、**落合和彦**、皆上大吾、盆子原誠、土田修一、近江俊徳

ネコの AB 式血液型における各抗原の出現頻度について

第 44 回日本比較臨床医学会学術大会講演要旨:p2 2013年11月9日 愛知県 岡崎市

6. **落合和彦**、渡部昌実、宇田川智野、皆上大吾、森松正美、大沼俊名、近江俊徳
がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 イヌホモログの構造と乳腺腫瘍に対するアポトーシス誘導能の解析

第 156 回日本獣医学会学術集会講演要旨: p344 2013年9月20日~22日 岐阜県 岐阜市

7. 羽山伸一、**落合和彦**、名切幸枝、中西せつ子、石井奈穂美、加藤卓也、今野文治、近江俊徳、土田修一、川本芳

福島市に生息する野生ニホンザルの筋肉中放射性セシウム濃度と造血機能との関係

第 19 回日本野生動物医学会大会要旨集: p58 2013年8月30日~9月1日 京都府 京都市

8. 近江俊徳、多田尚美、宇田川智野、**落合和彦**、坂本敦司、青木博史、土田修一、鄭英和
イヌにおける ABO 式血液型遺伝子の解析

第 97 次日本法医学会全国学術集会講演要旨: p.97 2013年6月26日~28日 北海道 札幌市

9. **落合和彦**、塩入弓絵、染田沙織、大澤有加、宇田川智野、森松正美、吉川泰永、盆子原誠、土田修一、近江俊徳

イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子 BRCA2 の BRC repeat 3 に存在する SNPs の頻度および機能

に及ぼす影響の検討

第 155 回日本獣医学会学術集会講演要旨: p251 2013年3月28日~30日 東京都 文京区

10. 多田尚美、宇田川智野、**落合和彦**、石岡克己、鄭英和、土田修一、近江俊徳(2013)
イヌ UCP4 および UCP5: 遺伝子構造と正常組織における発現分布

第 155 回日本獣医学会学術集会講演要旨: p251 2013年3月28日~30日 東京都 文京区

11. 宇田川智野、多田尚美、青木博史、盆子原誠、土田修一、**落合和彦**、石岡克己、鄭英和、近江俊徳(2013)

イヌ UCP2 および UCP3: SNP ディスカバリーと 2 犬種の SNP ジェノタイピング

第 155 回日本獣医学会学術集会講演要旨: p251 2013年3月28日~30日 東京都 文京区

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計1件)

名称: 乳酸菌により二本鎖 RNA を生成するキット及びその利用

発明者: 大槻高史、穴戸昌彦、公文裕巳、柏倉祐司、落合和彦

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類:

番号: 特許第 5660537 号

出願年月日: 平成 21 年 9 月 9 日

取得年月日: 平成 26 年 12 月 12 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 和彦 (OCHIAI KAZUHIKO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号: 30550488