

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640086

研究課題名(和文) 難治性乳癌を克服するためのDNA修復因子の発現量制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of DNA repair factor to overcome intractable breast cancer

研究代表者

千葉 奈津子 (Chiba, Natsuko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50361192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1はその変異が遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因となるがん抑制遺伝子である。BRCA1変異による家族性乳がんやBRCA1の発現量が低い散発性がんは、白金製剤やPARP阻害剤に高感受性である。我々は、新規BRCA1結合分子BRCA1-interacting protein (BIP)がBRCA1と、BRCA1の結合分子であるBARD1の発現量を制御するメカニズムを明らかにした。また、がん細胞で、BIPとBRCA1の発現量に負の相関関係があることが明らかになり、BIPが、治療のバイオマーカーや分子標的としての有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：BRCA1 is an important breast and ovarian cancer susceptibility gene. Hereditary cancers with BRCA1 mutations and sporadic cancers with lower BRCA1 expression are sensitive to platinating agent and PARP inhibitor. We identified a novel BRCA1-interacting protein (BIP) and found that overexpression of BIP causes reduction of BRCA1 and BARD1, which is also BRCA1-interacting protein. Interestingly, the expression level of BRCA1 and BIP show a negative correlation in several cancer cell lines. These suggest that the expression level of BIP is a candidate of biomarkers or molecular targets of cancer chemotherapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRCA1

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんではエストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PgR)が内分泌療法、HER2が増殖因子受容体に対する抗体薬であるトラスツズマブの治療感受性を予測するバイオマーカーとして用いられる。しかし、殺細胞性薬剤には有効なバイオマーカーが存在せず、また、ER、PgR、HER2陰性の Triple negative 乳がんは治療抵抗性で難治性である。

近年の遺伝子発現プロファイルの解析で、乳がんは Luminal subtype、HER2 過剰発現 subtype、Basal-like subtype に大別され、トリプルネガティブ乳がんはこの Basal-like subtype であることが多い。

BRCA1 はその生殖細胞系列変異により、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすが、がん抑制遺伝子である。散発性がんでは、BRCA1 変異はほとんど認めないが、散発性乳がん、卵巣がんでその発現が減少することが報告されている。BRCA1 は DNA 二本鎖切断修復経路で機能し、BRCA1 変異による家族性乳がんや BRCA1 の発現量が低い散発性乳がんは、白金製剤などの DNA 架橋剤や、DNA 修復因子の阻害剤である PARP の阻害剤に高感受性で、BRCA1 の抗がん剤感受性への関与が明らかになっている。

BRCA1 の変異による遺伝性乳がんは、Basal-like subtype と酷似した遺伝子発現プロファイルを示し、ER、PgR、HER2 が陰性のトリプルネガティブ乳がんが多い。さらに、BRCA1 の発現が低下した散発性乳がんとトリプルネガティブ乳がんとの関連も示されている。よって、BRCA1 の機能が不全な乳がんに関する解析は、難治性のトリプルネガティブ乳がんの新たな治療法開発につながる可能性が高いと考えられた。

BRCA1 は BARD1 とヘテロダイマーを形成して DNA 修復経路で機能する。そこで我々は、BRCA1 の新規結合分子を同定するため、バイオインフォマティクス的手法で BARD1 の BRCA1 結合部位に相同性のあるアミノ酸配列をもつ分子を探索し、BRCA1-interacting protein(BIP)を同定した。BRCA1 との関連を解析したところ、BIP の強制発現により BRCA1 の発現量が著しく低下することが明らかになった。

多くのタンパク質が、ユビキチン活性化酵素(E1)、転移/結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)という3種の酵素を介してポリユビキチン化され、その後プロテアソームにより分解され、その発現量が調節される。ヒトでは E1 が2種類、E2 が数十種類、E3 が数百種類存在する。BRCA1 の発現量もプロテアソームを介したタンパク質分解系によって制御されるが、DNA 損傷応答に反応して BRCA1 の発現量を制御する E3 は未だ報告されてい

ない。BIP は E3 活性に重要な RING ドメインを持ち、E3 として機能することが既に報告されており、これまでの我々の解析により BIP が DNA 損傷に応答し、BRCA1 のユビキチンリガーゼとして機能することが示唆された。

また、BRCA1 欠損細胞が DNA 単鎖切断修復や塩基除去修復において重要な DNA 修復因子である PARP の阻害剤に高感受性であることが報告された。これは、PARP 阻害剤で DNA 単鎖切断修復や塩基除去修復が障害されると、結果的に DNA 二重鎖切断が生じるが、BRCA1 欠損細胞では DNA 二重鎖切断修復が障害されているため、細胞死に至ると考えられている。このように、変異や発現量低下によって、1つの経路に障害が生じているがん細胞で、その代替経路の阻害によって、細胞死がもたらされることを Synthetic lethality といい、がん治療の新たな標的分子の探索を可能にする概念として注目されている。

PARP 阻害剤は新規分子標的治療薬として期待されたが、大規模臨床試験で有効性は証明されなかった。これは、PARP 阻害剤に高感受性な症例の選択が出来ていなかったためと思われた。これまで散発性がんでの BRCA1 の発現量と抗がん剤感受性の報告の多くは mRNA のレベルで解析されている。しかし、BRCA1 は DNA 損傷後にタンパク質レベルで、その核内の発現量が上昇し、DNA 修復能を発揮する。そのため、BRCA1 の発現レベルが低くても、抗がん剤や放射線照射などによる DNA 損傷に応答して発現が上昇する場合があります。BRCA1 自身の分子マーカーとして有用性は限定的であると考えられる。一方、BIP の高発現細胞では BRCA1 の分解の亢進により、BRCA1 の DNA 損傷応答そのものが破綻していると考えられる。よって、これらの分子はより有効な治療のバイオマーカーになる可能性がある。また、BRCA1 の発現量を減少させるこれらの分子経路を活性化させることで、白金製剤や PARP 阻害剤に低感受性ながん細胞を高感受性にすることができ、これらの分子は新たな治療の分子標的となる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、我々は、バイオインフォマティクス的手法により BRCA1 の新規結合分子として同定した BIP の BRCA1 の発現量の制御機構を解明し、この機構に関与する分子の治療のバイオマーカーや分子標的としての有用性を検討し、難治性のトリプルネガティブ乳がんを克服する有効な個別化医療を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

BIP、BRCA1、BARD1 の発現ベクターを作製した。変異体は、site-directed mutagenesis にて作製した。発現量の変化の

解析は全細胞抽出液を用いて、Western Blot により解析した。免疫沈降は、HEK-293T 細胞にこれらのベクターを導入し、Protein G ビーズを用いて行った。BIP の細胞内局在は、抗 BIP 抗体による免疫染色で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) BRCA1 に加えて、BIP と BARD1 との関連について検討したところ、BIP の強制発現により、BRCA1 と BARD1 の両者の発現量が著しく減少した。また、BIP が BRCA1、BARD1 と相互作用することが明らかになった。

BIP の RING ドメインに変異を導入したユビキチンリガーゼ活性を欠く BIP の変異体を用いると、BIP の強制発現による BRCA1 の発現量の減少は、野生型と同様に引き起こされたが、BARD1 の発現量は変化が見られなくなった。また、プロテアソーム阻害剤処理により、BIP の強制発現による BRCA1 の発現量の減少は抑制されたが、BARD1 の発現量の減少は抑制されなかった。

よって BRCA1 は、BIP の強制発現により、BIP のユビキチンリガーゼ活性非依存性に制御される分子によってユビキチン化され、プロテアソームを介したタンパク質分解系を介してその発現量が減少することが示唆された。一方 BARD1 は、BIP のユビキチンリガーゼ活性依存性にその発現量が減少するが、プロテアソームとは別の経路を介してその発現量が減少すると考えられた。

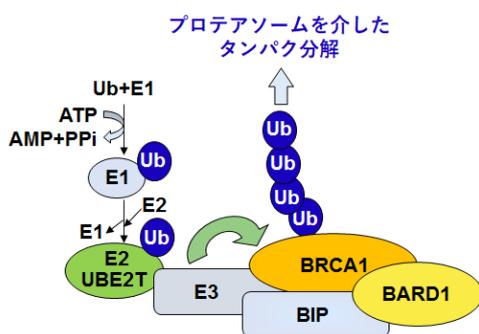


図1

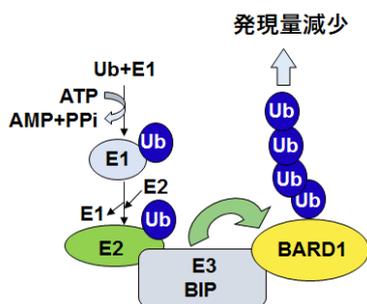


図2

(2) BIP の強制発現による BRCA1 の発現量の減少に重要な領域を同定したところ、BRCA1 の N 末端領域が重要であった。また、家族性乳がん由来の BRCA1 の N 末端の点突然変異で、BARD1 との結合能、ユビキチンリガーゼ活性を消失する BRCA1 の点突然変異体 (C61G) では、BIP の強制発現による BRCA1 の発現量の低下が引き起こされなかった。しかし、BARD1 との結合能は保たれるが、ユビキチンリガーゼ活性を消失する BRCA1 の点突然変異体 (I26A) では、BRCA1 の発現量が低下した。よって、BIP の強制発現による BRCA1 の発現量の低下には、BRCA1 の N 末端が重要で、BARD1 との結合に依存する可能性が示唆された。

また、BIP の強制発現による BARD1 の発現量の減少に重要な領域を解析した。その結果、BRCA1 との結合領域である BARD1 の N 末端を欠失しても BIP の強制発現によって、その発現量は減少した。よって、BIP の強制発現による BARD1 の減少には、BRCA1 が関与していないことが示唆された。

(3) いくつかのがん細胞株を用いて、内因性の BIP と BRCA1 の発現量について検討した。BIP には 4 つのアイソフォームがあるとされるが、内因性の BIP は、全長の BIP (Isoform 1) より、N 末端が欠失したアイソフォームである Isoform 3 の発現量が多かった。BIP の発現量の高い細胞株では、BRCA1 の発現量が低く、BIP の発現量の低い細胞株では、BRCA1 の発現量が高い傾向が見られ、内因性の BIP と BRCA1 の発現量に負の相関関係がある可能性が示唆された。

(4) 強制発現した BIP は、核膜、核膜周囲の小胞体、細胞膜に局在することが報告されている。一方、BRCA1 と BARD1 は、細胞内で核と細胞質に局在し、核により多く局在することが報告されている。そこで、内因性の BIP の局在について解析したところ、細胞膜に加えて、核内にも内因性の BIP の局在が認められた。よって、BIP が実際に核内で BRCA1 と BARD1 の発現量の減少に関与する可能性あると考えられた。

(5) E2 に関しては、UBE2T が乳がんではその発現が上昇し、細胞に強制発現すると BRCA1 をポリユビキチン化することが既に報告されている。UBE2T を E2 の候補として解析したところ、BIP との相互作用が認められた。よって BIP、UBE2T が協調して、BRCA1 の発現量を制御すると考えられた。

#### 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 5 件)

Fujita H, Yoshino Y, and Chiba N. Regulation of centrosome cycle. *Molecular & Cellular Oncology* 査読有 3(2), 2016, e1075643 DOI:10.1080/23723556.2015.1075643

千葉 奈津子, BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能とゲノム安定性の維持機構 生化学, 査読無, 87 巻, 2015, 741-743

千葉 奈津子, BRCA1 とその新規結合分子 OLA1 による中心体制御能と乳がん発症機構 実験医学, 査読無, 32 巻, 2014, 908-910

松澤 綾子, 千葉 奈津子, 家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御機構, 細胞工学, 査読無, 33 巻, 2014, 432-433

Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 査読有 53(1), 2014, 101-114, DOI:10.1016/j.molcel.2013.10.028

〔学会発表〕(計 10 件)

吉野 優樹, 千葉 奈津子 他, BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御機構の解析, 第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会, 2016 年 1 月 13 日, 松島一の坊 (宮城県・松島町)

Fujita H, Chiba N et al, OLA1 and BRCA1/BARD1 heterodimer cooperatively regulate centrosome replication and carcinogenesis. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

藤田 拓樹, 千葉 奈津子 他, BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻による発がん機構, 第 23 回 DNA 複製・組み換え・修復ワークショップ, 2015 年 10 月 21 日, 焼津グランドホテル (静岡県・焼津市)

松澤 綾子, 千葉 奈津子 他, 家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規関連分子の中心体制御能の解析, 第 32 回染色体ワークショップ 第 13 回核ダイナミクス研究会, 2014 年 12 月 16 日, 安芸グランドホテル (広島県・廿日市)

千葉 奈津子 他, 新規 BRCA1/BARD1 結合分子 OLA1 は中心体複製機構に関与する, 第 37 回分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜

市)

藤田 拓樹, 千葉 奈津子 他, BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻と発がん機構, 第 37 回分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

千葉 奈津子, BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の機能破綻と発がん機構, 遺伝性腫瘍 基礎と臨床の懸け橋 第 73 回日本がん学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Chiba N. Functional analysis of the tumor suppressor BRCA1. Symposium on Genome Integrity in Cancer and Aging under Academic Agreement with Center for Healthy Aging (CEHA) University of Copenhagen Denmark, 2014 年 3 月 10 日, 加齢医学研究所 (宮城県・仙台市)

千葉 奈津子, HBOC 基礎研究 BRCA1 の機能評価法の開発と新規 BRCA1 の結合分子 OLA1 の機能の破綻による発がんメカニズム, 第 2 回日本 HBOC コンソーシアム学術集会, 2014 年 1 月 18 日, 東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂 (東京都・文京区)

千葉 奈津子, 家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 の新規結合分子の同定とそのがん抑制能の解明, 乳がんにおける基礎・臨床の最前線, 第 72 回日本がん学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

吉野 優樹, 千葉 奈津子. 医薬ジャーナル社 インフォームドコンセントのための図説シリーズ 抗悪性腫瘍薬-分子標的治療薬-改訂版 V. 分子標的治療薬を含む標準的治療 4)乳がん 2015 p173-174

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/>

<http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/neurogenetics/>

<http://ganshien.umin.jp/research/main/hibanatsuko/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 奈津子 (CHIBA Natsuko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 50361192