

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450400

研究課題名(和文) 組換え酵素Rad51と癌抑制タンパク質BRCA2の結合の種間比較に基づく分子創薬

研究課題名(英文) Comparative analysis of the interaction of Rad51 recombinase and tumor suppressor BRCA2 aimed at drug development

研究代表者

森松 正美 (Morimatsu, Masami)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：70241370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの乳腺腫瘍の発症機構について、遺伝性乳癌原因遺伝子BRCA2とその結合分子であるDNA組換え酵素Rad51に焦点をあてて、イヌを含めた各種動物における新規癌治療法開発の基礎研究基盤を構築することを試みた。イヌBRCA2について腫瘍における発現低下やRad51結合に影響する変異の保有率や腫瘍罹患率との関係を示した。さらに、BRCA2の相互作用分子であるアンドロゲン受容体(AR)の新しい制御機構を示した。

研究成果の概要(英文)：Towards a better understanding of the molecular mechanisms of mammary tumor development in dogs, this study was focused on breast cancer tumor suppressor protein BRCA2 and its interacting recombinase Rad51 for an attempt to provide the basis of pure research leading to novel drug development and therapy for various mammals including dogs. Polymorphisms of canine BRCA2 affecting interaction with Rad51 and reduced expression levels of BRCA2 in canine mammary tumors were found. Moreover, novel regulation mechanisms were shown for androgen receptor (AR) that is an BRCA2 interacting molecule.

研究分野：動物疾病制御学

キーワード：DNA損傷修復 乳腺腫瘍 放射線感受性 BRCA2 Rad51

## 1. 研究開始当初の背景

BRCA2は遺伝性乳癌の原因遺伝子(breast cancer susceptibility gene)として乳癌家系で同定された。代表者らは、BRCA2の遺伝子産物が、放射線等によって受けたDNAの損傷を修復する機能を有することを発見し、組換え酵素Rad51を結合してDNA損傷部位にこれを運び修復する必須の分子であることが判明した。この発見をきっかけとして、それまで癌に関連する遺伝子は、Oncogene(癌遺伝子)、Tumor suppressor gene(癌抑制遺伝子)の2つに大別されてきたものに、新たなカテゴリーとしてGenome-stability gene(ゲノム安定化遺伝子)を加えて考えられるようになった。

乳腺腫瘍は、雌イヌにおいて全腫瘍の約半数を占め、発症頻度の著しく高い重要な疾患である。代表者らはイヌの乳腺腫瘍に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、これまでに腫瘍症例からBRCA2分子の機能を障害する変異の発見等について世界に先駆けて報告してきた。また最近、腫瘍症例を対象とした連鎖解析の結果よりイヌBRCA2が乳腺腫瘍の発症に関与することが報告された。しかし、代表者らの報告を含めてイヌBRCA2で同定された20種を超える変異が、実際に腫瘍罹患のリスクにどの様に影響するのかなど、詳細には不明な点が多い。

代表者らはこれまでにRad51-BRCA2結合の変化をもたらすBRCA2変異の解析を、BRCA2の結合ドメインであるBRCリピート配列(以下、BRC)を中心に進めてきた。その過程で偶然、イヌとヒトのRad51は、構成アミノ酸339個のうち3個しか変わらないにもかかわらず、BRCA2との結合において顕著な差異があることを発見した。

## 2. 研究の目的

イヌの乳腺腫瘍の発症機構について、遺伝性乳癌原因遺伝子BRCA2とそれの結合分子であるDNA組換え酵素Rad51に焦点をあてて、イヌを含めた各種動物における新規癌治療法開発の基礎研究基盤を構築することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) イヌ乳腺腫瘍においてBRCA2がRad51との結合に影響する変異の保有率やその腫瘍罹患率との関係

無作為に選んだ236検体のイヌについて、所有者の同意に基づき、5系統(ミニチュアダックス、ラブラドルレトリバー、シバ、トイプードル、チワワ)に分けてイヌのゲノムDNAを抽出し、エキソン11にコードされるRad51結合モチーフである、BRC repeat 3 (BRC3)とBRC repeat 4 (BRC4)の塩基配列を決定した。そして、この領域に存在する多型の頻度を系統ごとに明らかにした。さらに、この領域に存在するT1425P、

K1435Rに注目して変異体を作製し、それぞれの遺伝子型について哺乳類ツーハイブリッド法によりRad51との結合を解析した。

(2) イヌ乳腺腫瘍サンプルにおける癌抑制遺伝子BRCA2発現量の減少

イヌの正常乳腺及び乳腺腫瘍のサンプルからRNAを抽出し、定量的RT-PCR法によってBRCA2の発現量を測定した。発現量に影響を及ぼすと考えられる遺伝子上流領域について塩基配列を決定し、変異の有無を調べた。また、上流領域をレポータープラスミドにクローニングしてプロモーター活性を調べた。さらに、BRCA2発現量の多い精巣から抽出したRNAをRT-PCRで増幅して塩基配列を決定し、スプライスバリエーションを解析した。

(3) BRCA2相互作用分子として報告されているアンドロゲン受容体(AR)の新規調節因子の機能解析

アンドロゲン受容体の制御因子として分担者が同定したReduced Expression in Immortalized Cells (REIC/Dkk-3)は、不死化ヒト由来細胞で発現が低下する癌抑制遺伝子である。ヒトとマウスでREIC/Dkk-3遺伝子の発現量が多いイヌ小脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりイヌREIC/Dkk-3翻訳領域を増幅・配列決定した。次にイヌ正常組織におけるREIC/Dkk-3 mRNA発現量をRT-PCR法により解析した。また、正常及び乳腺腫瘍組織でのREIC/Dkk-3タンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより比較した。さらにヒトREIC/Dkk-3発現アデノウイルスベクター(Ad-hREIC/Dkk-3)を用い、イヌ乳腺腫瘍細胞株でアポトーシス誘導実験を行った。

(4) イヌとヒトとで異なるRad51のアミノ酸残基の機能解析

Rad51の動物種によって異なるアミノ酸がRad51-Rad51あるいはBRCA2-Rad51の結合力を変化させることを確認したが、これは哺乳動物ツーハイブリッド法という細胞内での相互作用解析法によるものだったため、in vitroでの解析を行うべく、無細胞タンパク質合成法によって各種Rad51置換体を作製し、ATP存在下で1本鎖相同DNAの鎖交換反応を起こさせ、その反応効率(2本鎖1本鎖DNA量の割合)を電気泳動の移動を指標として評価する実験系、すなわちstrand exchange assayの構築を試みた。

## 4. 研究成果

(1) イヌ乳腺腫瘍においてBRCA2がRad51との結合に影響する変異の保有率やその腫瘍罹患率との関係

今回解析したエキソン11の領域では、多型はBRC3のT1425PとK1435Rでのみ検出され、BRC4では検出されなかった。T1425PとK1435Rの多型の検出頻度は、それぞれ0.063

と0.314であり、前者に比べて後者の頻度が著しく高いことが分かった。1425P-1435Rアリルは検出されなかったことから、それぞれの多型は別々の祖先に由来する可能性が高いと推測された。過去の文献により、ミニチュアダックス、トイプードル、チワワは乳腺腫瘍の発症頻度が高い系統と考えられている。1425Pは乳腺腫瘍発症頻度が低いことで知られるラブラドルレトリバーで検出されなかったが、このことは1425Pが何らかの影響により乳腺腫瘍の頻度を上昇させる要因となっている可能性を示している。しかし、この可能性を確かめるにはもっと大規模な集団で解析を実施する必要がある。

T1425PとK1435Rについて、実際に多型が認められた6種類の組み合わせで組換え体を293T細胞に導入して哺乳類ツーハイブリッド法によりRad51との結合を解析したところ、K1435Rは結合に影響しないが、T1425Pは結合を著しく減弱させることが示された。このことは、1425Pが乳腺腫瘍発症頻度の低いラブラドルレトリバーで検出されなかったことの機能的な裏付けとなることが示唆された。

(2) イヌ乳腺腫瘍サンプルにおける癌抑制遺伝子 BRCA2 発現量の減少

イヌの正常乳腺に比べ、乳腺腫瘍ではBRCA2の発現が低下していることが定量的RT-PCR法によって示された。BRCA2遺伝子上流領域の塩基配列には、いくつかの変異が検出されたがいずれも遺伝子の発現を低下させるものではないことがレポーター解析によって示された。精巢のRNAをRT-PCRで増幅して塩基配列を決定したところ、これまで報告されていない新規のプライスバリアントが見出された。乳腺腫瘍でBRCA2の発現を低下させる原因は明らかでないか、ひとつの可能性としてnonsense-mediated mRNA decayによることが推測された。

(3) BRCA2相互作用分子として報告されているアンドロゲン受容体 (AR) の新規調節因子の機能解析

クローニングしたイヌREIC/Dkk-3ホモログは、既に登録されているイヌREIC/Dkk-3予測配列 (XM\_534060.3) より213塩基、71アミノ酸長く、ヒトでがん細胞にアポトーシスを誘導するN末端の78アミノ酸領域を高度に保存していた。また、正常組織におけるmRNA発現解析より、イヌREIC/Dkk-3はヒトとマウス同様全身性に発現していることが明らかとなった。REIC/Dkk-3タンパク質は正常乳腺組織では発現が見られたが、乳腺腫瘍組織および乳腺腫瘍由来細胞株では発現が減少していた。さらにAd-hREIC/Dkk-3により、イヌの乳腺腫瘍細胞株においてもcaspase-3活性化経路によるアポトーシス誘導が観察された。

(4) イヌとヒトとで異なるRad51のアミノ酸残基の機能解析

機能解析を目的としたstrand exchange assayの実験系を構築すべく、無細胞タンパク質合成法により得られた組換え体Rad51標品の可溶化及び酵素反応条件を検討したが、反応に十分な量の可溶化タンパク質を獲得できなかった。この反応を行うには、異なる条件の検討が必要と考えられた。

## 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)

1. Ochiai, K., Morimatsu, M., Kato, Y., Ishiguro-Oonuma, T., Udagawa, C., Rungsuriyawiboon, O., Azakami, D., Michishita, M., Ariyoshi, Y., Ueki, H., Nasu, Y., Kumon, H., Watanabe, M. and Omi, T. 2016. Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity. *Oncotarget* 7: 3283-3296. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.6488
2. Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Wada, S., Orino, K. and Watanabe, K. 2015. Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *BMC Vet. Res.* 11: 159. 査読有 doi: 10.1186/s12917-015-0483-9
3. 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: 155-158. 査読有 doi: 10.2220/biomedres.36.155
4. Kato, Y., Ochiai, K., Michishita, M., Azakami, D., Nakahira, R., Morimatsu, M., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Kobayashi, M., Bonkobara, M., Kobayashi, M., Takahashi, K., Watanabe, M. and Omi, T. 2015. Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. *Vet. J.* 206: 143-148. 査読有 doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.002
5. Ishiguro-Oonuma, T., Ochiai, K., Hashizume, K. and Morimatsu, M. 2015. The role of IFN-gamma in regulating Nfkbiz expression in epidermal keratinocytes. *Biomed. Res.* 36:

103-107. 査読有  
doi: 10.2220/biomedres.36.103

〔学会発表〕(計 3件)

1. 吉川泰永、森松正美、落合和彦、石黒-大沼俊名、和田成一、折野宏一 イヌ乳腺腫瘍サンプルにおける癌抑制遺伝子 BRCA2 発現量の減少、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 8 日、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)
2. 角本俊介、吉川泰永、森松正美、落合和彦、石黒-大沼俊名、折野宏一 癌抑制遺伝子 BRCA2 のイントロンにおける新規サイレンサー配列の同定と転写因子の特定 第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 8 日、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)
3. 落合和彦、閑野大輝、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、2014 年 9 月 10 日、北海道大学高等教育推進機構(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
・該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森松 正美 (MORIMATSU, Masami)  
北海道大学・(連合) 獣医学研究科・准教授  
研究者番号：70241370

### (2) 研究分担者

落合 和彦 (OCHIAI, Kazuhiko)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：30550488

### (3) 連携研究者

石黒(大沼) 俊名 (ISHIGURO-OONUMA, Toshina)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：60452695

### (4) 研究協力者

・該当無し  
( )