

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670730

研究課題名(和文) BRCA1欠損とエストロゲン作用に起因する卵巣がん発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Unravelling the mechanism of ovarian carcinogenesis caused by BRCA1 depletion and estrogen action

研究代表者

太田 智彦(OHTA, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60233136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1変異によってなぜ乳癌と卵巣癌のみを発症するか、臓器特異性の原因は不明である。本研究ではdoxycyclin誘導性BRCA1欠損エストロゲンレセプター(ER⁺)陽性diploidヒト乳腺細胞を樹立し、BRCA1欠損下にER⁺によってもたらされるゲノムおよびエピゲノムの変化とその分子機構を解析した。BRCA1欠損ER陽性細胞ではコントロールのER陽性あるいはBRCA1欠損細胞と比較してdox誘導によってクロマチンの脱凝縮、G2/M期の増加、アポトーシス誘導の誘導を認め、これに伴う著明な細胞数の低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of tissue specificity; how BRCA1 mutation specifically triggers only breast and ovarian cancer, has been unrevealed. In this study we established doxycyclin-inducible BRCA1 deficient and estrogen receptor (ER⁺) positive diploid human breast cell lines and investigated the effect of estrogen receptor expression on genomic and epigenomic stability in BRCA1-defective cellular background. BRCA1-depleted/ER⁺-positive cells exhibited chromatin de-compaction, increase of G2/M phase population and apoptosis, accompanied by significant cell number reduction, in response to doxycyclin treatment when compared to control BRCA1-depleted or ER⁺-positive cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：BRCA1 エストロゲン 卵管癌 DNA損傷 ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

1994年にBRCA1が家族性乳癌および卵巣癌の原因遺伝子として同定されて以来20年近くが経過したが、いまだにBRCA1変異によってなぜ乳癌と卵巣癌のみを発症するか、臓器特異性の原因は不明である。エストロゲンとの関連が示唆されているが、卵巣はエストロゲン産生臓器であり癌発生母地である卵巣上皮はEstrogen Receptor- α (ER)陰性でエストロゲンの標的ではない。これに対して最近、予防的卵巣付属器切除検体の病理所見から、これまで卵巣癌と考えられていた癌は、実は卵管より発生する可能性が指摘されている。興味あることにヒト卵管上皮はERが陽性であることから、BRCA1欠損によって発生する癌はエストロゲンと関連するという仮説が成り立つ。一方、以下にあげるように分子生物学的にこの仮説を支持する根拠がある。a) ERが転写を行う際にTopoIIによるDNA二本鎖切断が生じる。b) Androgen Receptor(AR)転写ではTopoIIによるDNA損傷が前立腺癌の原因となる。a, bからERによって生じたDNA二本鎖損傷をBRCA1欠損細胞では修復できず、これにより癌が生じる可能性がある。さらに、c) ERによるヒストンH3リン酸化がLSD1によるH3のLys9残基(H3K9)の脱メチル化を引き起こし、ヘテロクロマチンを解除する。d) BRCA1のコピキチンリガーゼ(E3)活性欠損によってヒストンH2Aのコピキチン化が阻害され、サテライト領域DNA(H3K9メチル化領域)の脱ヘテロクロマチンが生じ、これによって癌が発症する。c, dからBRCA1欠損とエストロゲンの相乗効果によってヘテロクロマチンが解除され、癌が生じることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では乳管および卵管の上皮細胞からBRCA1欠損ER陽性diploidヒト細胞を樹立し、BRCA1欠損下にエストロゲンレセプターによってもたらされるゲノムおよびエピゲノムの変化とその分子機構を解析する。これによりBRCA1欠損細胞がエストロゲンによって癌化するのを証明し、臓器特異性の謎を解明する。

3. 研究の方法

(1)BRCA1欠損ER陽性diploidヒト細胞の樹立：手術にて余剰検体として切除された卵管の上皮細胞からROCK阻害剤を用いてER陽性の不死化正常ヒト卵管上皮細胞株を樹立する。BRCA1をTALENおよびCRISPRを用いてノックアウトし、BRCA1欠損ER陽性正常ヒト上皮細胞株を樹立する。
(2)Doxycyclin誘導性BRCA1欠損ER陽性乳管細胞の樹立：BRCA1野生型ER陰性の

正常乳管細胞株であるMCF10Aより、レンチウイルスベクターを用いて、doxycyclin誘導性のBRCA1欠損ER陽性乳管細胞を樹立。
(3)R-loopの同定：GFPタグをつけたRNaseH1のDNA-RNA hybrid binding(HB)ドメインを発現させ、フローサイトメータにてR-loopの集積を検出。
(4)DNA二本鎖切断の集積：蛍光免疫染色法によるH2AXの核内foci形成によって解析。
(5)分裂期クロマチン架橋：EdUを添加して蛍光発色によってAnaphase DNA架橋を検出。
(6)クロマチンの脱凝縮：マイクロコッカスクレアーゼ(MNase)アッセイにてクロマチン凝縮の有無を解析。
(7)細胞周期：フローサイトメータにて細胞周期を解析。
(8)細胞生存性測定：生存細胞率をCell Titer-Blue®(Promega)にて解析。

4. 研究成果

(1)BRCA1欠損ER陽性diploidヒト細胞の樹立：当初計画どおり、乳管線維腺腫の正常乳管上皮余剰検体および卵管余剰検体よりER陽性diploidヒト細胞の樹立を試みた。正常乳管上皮より多数の細胞株を樹立し、そのうちの3株がER陽性であったが、継代をするとERが陰転化することを繰り返し、目的の細胞株の樹立には至らなかった。ウェスタンブロットによる各種タンパク質発現状況から、ROCK阻害剤によるEpithelial-mesenchymal transitionが原因として考えられた。代替する方法として、以下(2)によって実験を継続した。
(2)Doxycyclin誘導性BRCA1欠損ER陽性乳管細胞の樹立：まず、Dox誘導性BRCA1欠損細胞を作成した。BRCA1遺伝子に対するshRNAのオリゴDNAをエンタリーベクターpENTR4-H1tetOx1にクローニングし、Gateway相同組換えによりレンチウイルスベクターに組換え、blasticidinで選択可能なCS-Rfa-ETBsd-shBRCA1を作成した。293T細胞よりレンチウイルスを作成、MCF10A細胞に感染させた後、blasticidinで選択して細胞株(MCF10A-Dox-shBRCA1)を樹立した。次にドキシサイクリン誘導性ER発現細胞を作成した。エンタリーベクターpENTR1A1にERをクローニングしたのち、上記同様にpuromycinで選択可能なCSIV-TRE-Rfa-Ubc-puro-ERを内包するレンチウイルスを作成した。上記MCF10A-Dox-shBRCA1細胞に感染させたのちblasticidinとpuromycinで選択しMCF10A-Dox-shBRCA1-ER細胞を樹立した。Dox添加48時間後のウェスタンブロットにて、BRCA1の発現が消失し、ERが出現することを確認した。また、蛍光免疫染色による解析では、発現したERは核内に局在し、RT-qPCRにてERによって転写制御

されている下流因子である Fos の発現誘導が確認された。

(3)細胞増殖低下・アポトーシス誘導：親株の MCF10 細胞、MCF10A-dox-ER 細胞では dox 添加が細胞数増加に与える影響はほとんどないのに対して、MCF10A-dox-ER-shBRCA1 細胞では dox 誘導によって G2/M 期の顕著な増加とアポトーシス誘導を認め、これに伴う著明な細胞数の低下を認めた。

(4)ゲノム不安定性が生じるメカニズムの解析：dox 誘導時の R-loop の集積、 γ H2AX の核内 foci 形成、分裂期クロマチン架橋形成は、コントロール細胞と BRCA1 欠損 ER 陽性乳腺細胞の間に明らかな差は認めなかった。

(5)ヘテロクロマチンに与える影響：MNase アッセイにて BRCA1 欠損 ER 陽性乳腺細胞細胞では dox 添加によってクロマチンの脱凝縮が生じていることが示唆された。

以上より、BRCA1 機能不全細胞では ER α によりクロマチン構造の異常が誘発されて染色体不安定性に繋がる可能性が示唆された。

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 10 件)

黒田貴子、岡田麻衣子、津川浩一郎、太田智彦. Doxycyclin 誘導性 ER 陽性 BRCA1 枯渇ヒト乳腺細胞の樹立. 聖マリアンナ医科大学雑誌. 43:151-162, 2015, 査読有.

Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Nishikawa H, Ohta T. Functional link between BRCA1 and BAP1 through histone H2A, heterochromatin and DNA damage response. *Curr Cancer Drug Targets*. 16(2):101-109, 2016, DOI: 10.2174/1568009615666151030102427, 査読有.

Okada M, Ohtake F, Nishikawa H, Wu W, Saeki Y, Takana K, Ohta T. Liganded ER stimulates the E3 ubiquitin ligase activity of UBE3C to facilitate cell proliferation. *Mol Endocrinol*. 29(11):1646-1657, 2015, DOI: 10.1210/me.2015-1125, 査読有.

Fukuda T, Wu W, Okada M, Maeda I, Kojima Y, Hayami R, Miyoshi Y, Tsugawa K, Ohta T. Class I histone deacetylase inhibitors inhibit the retention of BRCA1 and 53BP1 at the site of DNA damage. *Cancer Sci*. 106(8):1050-1056, 2015, DOI: 10.1111/cas.12717, 査読有.

Nagasawa S, Maeda I, Fukuda T, Wu W, Hayami R, Kojima Y, Tsugawa K, Ohta T. MED12 exon 2 mutations in phyllodes tumors of the breast. *Cancer Med*.

4(7):1117-1121, 2015, DOI:

10.1002/cam4.462, 査読有.

Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Takeuchi J, Wu W, Ohta T. The BARD1/HP1 interaction: another clue about heterochromatin involvement in homologous recombination. *Molecular & Cellular Oncology*. 2(2):e1-e8, 2015, DOI: 10.1080/23723556.2015.1030535, 査読有.

Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Kleivit RE, Ohta T. Interaction of BARD1 and HP1 Is Required for BRCA1 Retention at Sites of DNA Damage. *Cancer Res*.

75(7):1311-1321, 2015, DOI:

10.1158/0008-5472.CAN-14-2796, 査読有.

Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep*.

16(2):192-201, 2015, DOI:

10.15252/embr.201439152, 査読有,

Nagasawa S, Sedukhina AS, Nakagawa Y, Maeda I, Kubota M, Ohnuma S, Tsugawa K, Ohta T, Roche-Molina M, Bernal JA, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Sato K. LSD1 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Basal-Like Breast Cancer, and Sensitivity to PARP Inhibition. *PLoS One*. 10(2):e0118002, 2015, DOI:

10.1371/journal.pone.0118002, 査読有,

Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K. NF- κ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. *Oncotarget*. 6(6): 3825-3839, 2015, URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686825>, 査読有.

[学会発表](計 10 件)

黒田貴子、岡田麻衣子、呉文文、敦賀智子、福田貴代、太田智彦、津川浩一郎、「ドキシサイクリン誘導性 BRCA1 欠損 ER 陽性細胞の樹立」、第 23 回日本乳癌学会学術総会、2015 年 7 月 3 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
太田智彦、「HERC2 and its interactors in regulation of DNA damage response and cell cycle.」、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
太田智彦、前田一郎、津川浩一郎、「ト

ランスレーショナルリサーチを進める
上での問題点」、第23回日本乳癌学会学
術総会、2015年7月3日、東京国際フ
ォーラム（東京都・千代田区）
Tomohiko Ohta、「BRCA1 retention at DNA
double-strand breaks in
homology-directed repair pathways」、
International Symposium on
Homeostasis through development, life,
and diseases、2014年11月7日、群馬
大学（群馬県前橋市）
Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa,
Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda,
Wenwen Wu, 「HP1 amma mediates BARD1
retention on Lys9-dimethylated
histone H3 at sites of DNA damage」,
Fusion Conference DNA Replication as
a Source of DNA Damage, 2014年10月
2日、カサブランカ（モロッコ）
太田智彦、「Therapeutic strategy
targeting the mechanism of BRCA1
retention at DNA damage sites via a
histone modification.」、第73回日本
癌学会学術総会、2014年9月25日、パ
シフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa,
Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda,
Wenwen Wu, 「ATM-dependent but
RNF168-independent BRCA1/BARD1
retention at sites of DNA damage」,
Benzon Symposium No 60 - Nuclear
Regulation by Ubiquitin, 2014年8月
18日、コペンハーゲン（デンマーク）
太田智彦、「BRCA1のDNA損傷応答とヒス
トン修飾」、第19回日本病態プロテアー
ゼ学会学術集会、2014年8月9日、千里
ライフサイエンスセンター（大阪府豊中
市）
太田智彦、「BRCA1の新規DNA損傷応答メ
カニズムを標的とした治療戦略」、第22
回日本乳癌学会学術総会、2014年7月
10日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
太田智彦、「BRCA1の新規クロマチン結合
機構を標的としたがん治療戦略」、第15
回ホルモンと癌研究会、2014年7月4
日、良陵会館（宮城県仙台市）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 智彦 (OHTA, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・教授