

個別化医療のための分子イメージング技術を用いた 癌抑制遺伝子の機能解析



千葉 奈津子

加齢医学研究所 遺伝子制御研究部門
免疫遺伝子制御研究分野 准教授
E-mail: nchiba@idac.tohoku.ac.jp

1. はじめに

わが国における死亡の第一位は悪性腫瘍によるものであり、全死亡の約 3 分の 1 が悪性腫瘍で死亡しているのが現状である。一方、近年の悪性腫瘍の治療法の進歩により、悪性腫瘍の約 60% が治癒する時代になったとされる。

分子生物学の進歩は、多くの癌関連遺伝子の同定を可能にし、遺伝子レベルでの解析が進展している。また、マイクロアレイに代表されるポストゲノム時代の遺伝子解析も発展している。

乳癌は、欧米では女性 8~9 人に 1 人、日本では 40 人に 1 人が罹患すると推定され、食生活の欧米化などにより、日本でも乳癌の患者数および死亡数は年々増加傾向にある。乳癌においても関連遺伝子の同定され、乳癌の発生病機を分子レベルで解明することに加えて、臨床の場における遺伝子診断、新たな分子標的の探索などへの発展に期待がよせられている。

家族性乳癌は、全乳癌の約 2~5% 程度とされ、原因遺伝子として *BRCA1*, *BRCA2* が単離され、その後精力的に遺伝子診断とそれらの機能解析が行われた。近年はその他の家族性乳癌原因遺伝子の存在も示唆されている。その中で、現在我々は、家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* の機能解析を行っており、それによって、その遺伝子変異による発癌の分子機構を解明し、乳癌をはじめとしたその他の癌の個別化医療のための診断、治療法の開発を行うことを目標としている。

2. 家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* について

2.1 *BRCA1* の単離

1990 年に、若年性乳癌家系が第 17 染色体長腕 (17q21) に連鎖することが報告され、1994 年に、三

木らにより、ポジショナルクローニングによって *BRCA1* が単離された[1]。その後の解析により、家族性乳癌の約 30%、家族性乳癌卵巣癌の 60% で異常が検出され、10% が遺伝性とされる上皮性卵巣癌の 40% で *BRCA1* 変異が原因とされるなど、非常に重要な癌抑制遺伝子であることが分かった。*BRCA1* 生殖細胞変異による乳癌発症リスクは約 50~85%、卵巣癌発症リスクは 12~60% とされ、散发性癌に比較して若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高いとされている[2]。

2.2 構造的な特徴

BRCA1 は、1863 アミノ酸からなる分子量 220kD のタンパク質で、図 1 に示したように、N 末端に RING ドメイン、C 末端に 2 つの BRCT ドメインという特徴的な構造を持つ。また、核内移行因子、核外移行因子をもち、中間部には DNA 結合領域も存在する。



図 1. *BRCA1* の構造

2.3 機能

BRCA1 は、細胞周期に依存した発現パターンを示し、タンパク発現は G2-M 期に最も高い。多くのタンパク質と相互作用し、細胞周期や DNA 障害などに反応して、多様な複合体を形成し[3]、DNA 修復、転写制御、チェックポイント機能を含む細胞周期

制御、クロマチン修飾、アポトーシス、中心体複製制御などの細胞内の多様な機構に参与する。

BARD1 は BRCA1 の N 末端に結合するタンパクとして同定され、BRCA1 と同様に N 末端に RING ドメイン、C 末端に 2 つの BRCT ドメインを持つ。BRCA1 は BARD1 とともにヘテロ 2 量体を形成し、ユビキチンリガーゼ活性を持つ。家族性乳癌家系に認められる BRCA1 ミスセンス変異体は、このユビキチンリガーゼ活性が阻害されることより、この活性がその癌抑制機構に重要であることが推察されている。基質としては、BRCA1 と BARD1 の自己ユビキチン化、ヒストン、p53、ヌクレオフォスミン (NPM/B23)、 γ -チューブリン、PoIII などが報告され、上記の細胞内の多様な機構との関わりが示唆される[4]。

また、BRCA1 は DNA 障害後に ATM や CHK2 によってリン酸化され、核内フォーカスを形成し、Rad51 や Rad50 と共局在すること、修復機構に参与する多くのタンパクと相互作用し、DNA 結合能も有することから、DNA 修復機能への関与が示唆されており、これが BRCA1 の主な癌抑制機構と考えられている。BRCA1 欠損細胞では、DNA 二重鎖切断の修復経路の 1 つである相同組み換え (HR) が大きく障害され、さらに、もう一方の DNA 二重鎖切断の修復機構である非相同 DNA 末端再結合 (NHEJ) にも参与するとされ、さらには転写共役修復 (TCR) への関与も示唆されている。

よって BRCA1 は、さまざまな DNA 障害に対する、多様な DNA 修復機構への関与と、細胞周期チェックポイントへの関与により、BRCA1 は遺伝子の恒常性を維持するケアテーカーとして働くと考えられる。

2.4 組織特異的な発癌

上述のように DNA 修復能が BRCA1 の主な癌抑制機構と考えられるが、BRCA1 は多くの組織に発現しており、BRCA1 変異による腫瘍が、乳腺、卵巣といったエストロゲン反応性の組織に発生する理由は不明であったが、近年その原因を示唆する知見も報告されている[5]。

BRCA1 生殖細胞変異をもつ個体での卵巣摘出により、乳癌の発生頻度が約 50%減少し、また、BRCA1 変異による腫瘍発生モデルマウスでも、卵巣摘出により乳腺腫瘍の発生が抑制された。さらに、卵巣顆粒膜細胞のアロマターゼ発現は、閉経後女性の血中エストロゲン濃度を反映し、乳癌の増殖を

促すが、最近 BRCA1 の発現低下が卵巣の顆粒膜細胞と脂肪組織のアロマターゼの発現を増加させることが報告された。しかしながら、エストロゲン刺激により BRCA1 の発現が上昇するという報告がある一方、反対に BRCA1 がエストロゲンレセプターと相互作用し、その転写活性を抑制したり、増殖刺激のシグナル伝達経路を BRCA1 が抑制するといった報告もある。

詳細は未だ不明であるが、乳腺、卵巣といったエストロゲン感受性の組織では、エストロゲン刺激によって細胞増殖能が増加しており、かつ、エストロゲン代謝に関連する高度の酸化ストレスにより DNA 障害が起こりやすいにも関わらず、BRCA1 変異によって DNA 修復能が低下しているために、癌化が起こりやすい状態となっていると考えられる。

2.5 家族性乳癌家系における変異

多くの BRCA1 の生殖細胞変異が報告されており、これらは Breast Cancer Information Core (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>) で閲覧可能である。本遺伝子の変異の 80%は、タンパク切断型の変異で、フレームシフト (70%)、ナンセンス変異 (10%) とされ、ミスセンス変異は少ない。広範囲に多変異が分布し、異常が集中するホットスポットは認めないが、人種に特異的な founder mutation が存在し、Ashkenazi Jewish で 185delAG, 5382insC, Norway 人で 1135 insA, 1675delA, Canada 人でみられる C4446T が報告されている) [6]。

2.6 BRCA1 生殖細胞変異によって生じる癌の特徴

BRCA1 の生殖細胞変異のある患者の乳癌は、散発性乳癌に比較して、悪性度が高く、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、HER2、cyclin D の陰性頻度が高く、p53 高発現の陽性頻度が高いとされる。

化学療法感受性に関する近年のいくつかの報告により、臨床的な特徴も明らかになってきている。BRCA1 変異のある乳癌患者の腫瘍は、乳癌には一般に使用されない白金製剤などの DNA 架橋剤には高感受性であるが、タキサン系薬剤には低感受性であるとされ、さらに、化学療法などの治療がなされない場合、予後不良であるが、術前化学療法や放射線療法がコントロール群と比較して、より有効であるなどが明らかになっている。

2.7 散発性癌への関与

散発性癌では、*BRCA1* 遺伝子変異をほとんど認めないため、当初、散発性癌における *BRCA1* の発癌機構における役割は少ないと考えられた。しかし、その後の解析により、散発性乳癌全体の 30~40%、散発性卵巣癌の 70% で *BRCA1* の mRNA やタンパク発現が減少し、その頻度は悪性度の高いものほど高く、また、それらの癌で *BRCA1* 遺伝子がメチル化されていることが報告された。さらに、これらの散発性乳癌では、*BRCA1* の胚細胞変異を持つ患者の乳癌と同様、エストロゲンレセプター陰性の頻度が高いとされた。よって、*BRCA1* の機能低下が、散発性癌の発症機構や薬剤耐性機構にも *BRCA1* が関与することが推察される。

3. 家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* の機能解析

3.1 これまでの研究

我々はこれまで *BRCA1* の機能解析の研究により、以下のことを明らかにしてきた。

- (1) 生化学的な方法で、*BRCA1* を含む 4 つの異なるタンパク複合体の分離に成功し、その複合体が、DNA の複製停止により変化していくことを示し、*BRCA1* の多様な機能は、さまざまタンパクとの多様な複合体の形成によって発揮される[3].
- (2) *BRCA1* の細胞周期の S 期における核内フォーカスの形成や、RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素との相互作用には *BRCA1* の N 末端が重要である [7].
- (3) *BRCA1* の中間部のドメインに細胞増殖抑制効果とアポトーシスを誘導する働きがあり、*BRCA1* の N 末端は、それらの作用を抑制する働きがある [8].
- (4) *BRCA1* の有するユビキチン化能の新たな基質として RNA ポリメラーゼ II の同定に成功し、RNA ポリメラーゼ II が、紫外線照射後に *BRCA1* によりユビキチン化され、その後プロテアソームにより分解されることを示し、*BRCA1* の転写共役修復への関与のしくみを示し、DNA 障害後、RNA ポリメラーゼ II が *BRCA1* の作用により分解され、転写が停止し、さらに *BRCA1* が DNA 修復因子をリクルートするというモデルを提唱した[9] (図 2)。

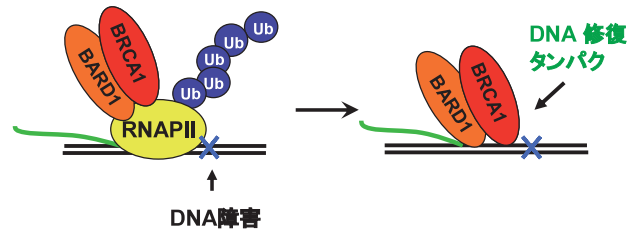


図 2. RNA ポリメラーゼ II が *BRCA1* の作用により分解され、転写が停止し、さらに *BRCA1* が DNA 修復因子をリクルートする。

- (5) *BRCA1* の N 末端において既に報告された腫瘍由来の約 30 種類の点突然変異の発現ベクターを作製し、*BRCA1* の *BARD1* との結合能、細胞周期の S 期や DNA 傷害後の核内フォーカスの形成能、ユビキチン化能により、それらの点突然変異の病的意義を検討した。

3.2 分子イメージング技術を用いた *BRCA1* の DNA 修復能の解析

3.2.1 レーザー照射による DNA 損傷に対する *BRCA1* の集積と解離

現在、東北大学加齢医学研究所、遺伝子機能研究分野、安井明教授との共同研究により、生細胞内の DNA 損傷に対する反応を、リアルタイムで解析できる分子イメージング技術を用いた実験系により、*BRCA1* の DNA 損傷部位への集積と解離をリアルタイムで詳細に観察することにより、DNA 修復における *BRCA1* の役割を検討している。

このシステムは、照射用レーザー(365nm, 405nm)と共焦点レーザー顕微鏡からなり、生細胞核に DNA 単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷などの DNA 損傷を作製し、リアルタイムで解析することができる(図 3)。365nm の色素レーザーは線量をパルスの数とフィルターで制御し、405nm の半導体レーザーは、連続光で線状に照射し、線量はレーザー出力の制御とスキャン回数で制御している。抗体を用いて内因性のタンパク質の集積と解離を解析することに加え、変異体や抗体の得られないタンパク質の解析には、GFP(green fluorescence protein)などの蛍光タンパク質を融合したタンパクを細胞に発現させて解析することができる[10-12].

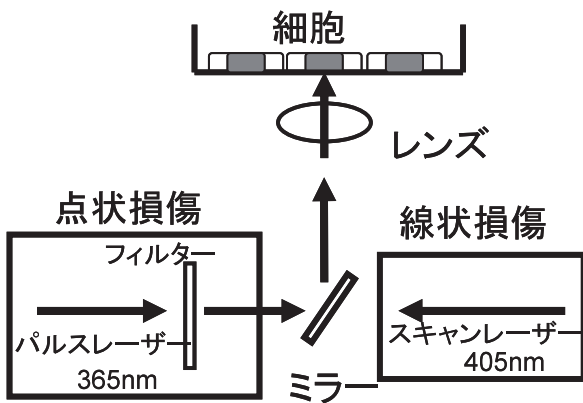


図3. レーザー照射システム(文献[10]より改変)

我々は、BRCA1 が DNA 二重鎖切断などのさまざまな障害部位に集積することを明らかにした(図4, 図5)。

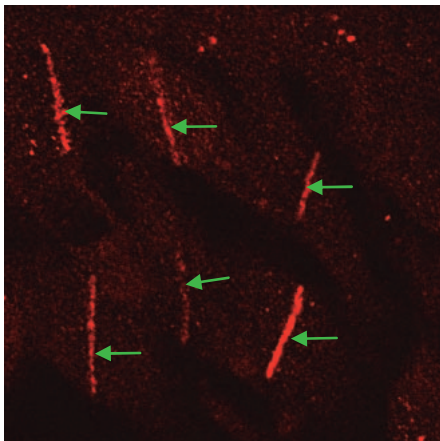


図4. 細胞核の一部に線状にレーザーを照射し、免疫蛍光染色したところ、内因性の BRCA1 がレーザー照射部位に集積した。

レーザー照射

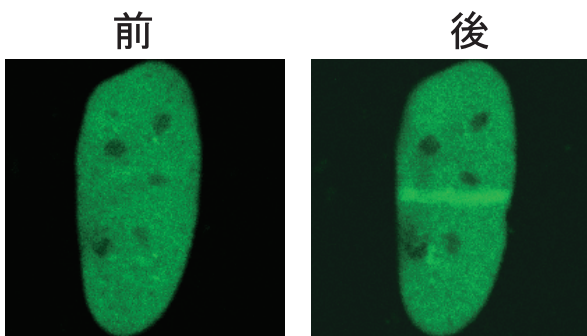


図5. GFP 付加 BRCA1 のレーザー照射部位への集積をリアルタイムで観察した。

また、いくつかの BRCA1 の欠失変異体を作製し、その集積に必要な BRCA1 の領域を明らかにした。さらに、興味深いことに、その集積のパターンは、どの領域によって異なっていた(図6)。

さらに、他の DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて、BRCA1 の DNA 傷害部位に集積する際に依存する、他の DNA 修復タンパクを同定した。さらに現在さまざまな DNA 損傷に対する BRCA1 の集積のメカニズムを明らかにしつつある。

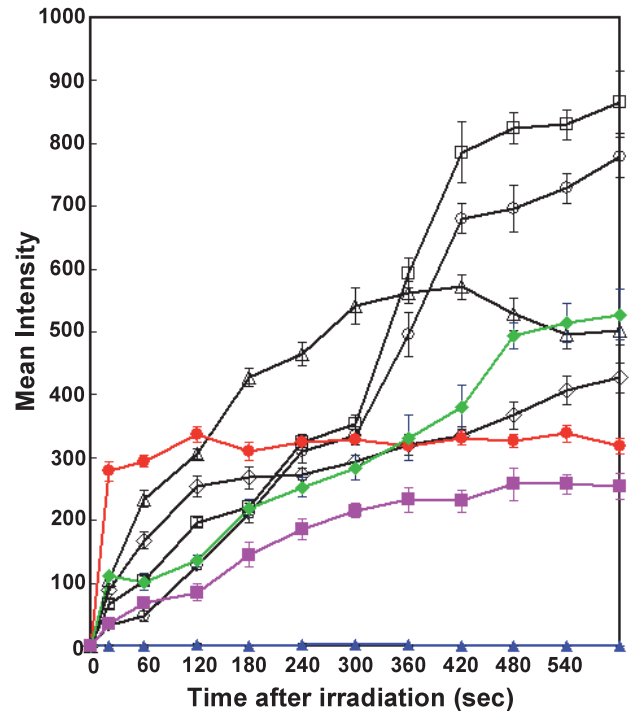


図6. BRCA1 の欠失変異体を作製し、DNA 傷害部位への集積を比較したところ、領域毎に異なる集積パターンを示した。

3.2.2 BRCA1 の紫外線による損傷に対する修復能における役割

上述のように、BRCA1 は DNA 二重鎖切断の修復経路の 1 つである相同組み換え (HR) や非同源 DNA 末端再結合 (NHEJ) にも関与するとされている。しかし、一方、それによって生じる主な DNA 障害が二重鎖切断ではない紫外線照射によっても、リン酸化されたり、核内フォーカスを形成したりすることが分かっている。

よって、フィルターを用いて細胞内に局限して紫外線を照射して、DNA 障害を引き起こしたところ(図7)、BRCA1 の集積が確認された(図8)。

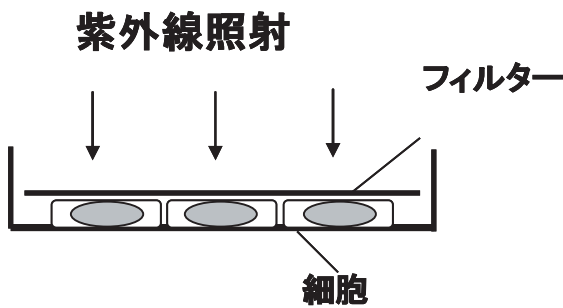


図7. 細胞上にフィルターを置いて、紫外線を照射する.

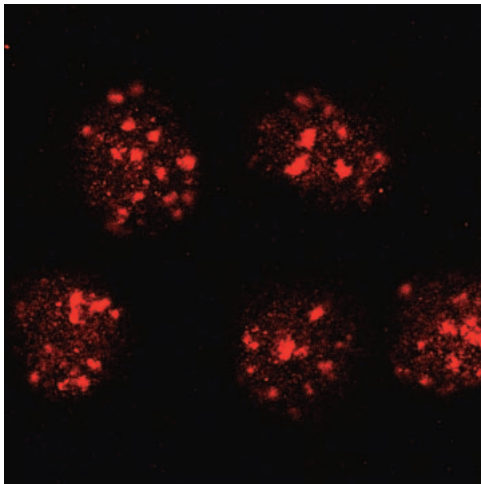


図8. BRCA1 は限局的な紫外線照射部位に集積する.

さまざまな DNA 修復タンパクの欠損細胞を用いて BRCA1 の集積を解析したところ、ある DNA 修復タンパクの欠損細胞において BRCA1 の集積が阻害されることが確認された。これまでこの修復タンパクと BRCA1 の相互作用などを示す報告はなく新しい知見となる。さらに、転写阻害剤を用いた照射実験や siRNA を用いて、紫外線照射後の細胞増殖能を検討した実験などにより、BRCA1 が転写共役修復 (TCR) への関与に関与することを明らかにした。

3.3 新規家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 関連分子の同定とその機能解析

近年、BRCA1 の BARD1 と共役したユビキチン化能が注目されており、上述のように、我々も、BRCA1 のユビキチン化の基質として、BRCA1 の BRCT ドメインに結合する RNA ポリメラーゼ II を同定している。また、最近、BRCT ドメインが、DNA 障害後の細胞周期チェックポイントや DNA 修復経路に関与

するリン酸化タンパクと相互作用すると報告された。BRCA1 は、それ自身でもユビキチン化能を持つが、BRCA1 の N 末端に結合する BARD1 と相互作用することで、ユビキチン化能は著しく増加し、BRCA1 の RING ドメイン内に存在する点突然変異により、BARD1 との結合能とユビキチン化能が阻害されることから、BARD1 が BRCA1 の癌抑制機能を制御する重要な因子であると推察される。

よって、我々は BRCA1 の癌抑制機能には BARD1 の BRCT ドメインも重要なのではないかと考え、BARD1 の BRCT ドメインを含むタンパク複合体を精製し、その構成タンパクを同定し、その機能を解析することとした。

HA、FLAG を付加した BARD1 の BRCT ドメインタンパクを強制発現する細胞を作製し、大量培養後、DNA 障害後に相互作用するタンパクをアフィニティ精製し、LC-MS/MS にて同定した。

現在、同定したいいくつかもタンパクの中で、1 つのタンパクが BARD1 の BRCT ドメインを直接結合することを確認し、BRCA1/BARD1 複合体によってユビキチン化されることを明らかにした。BRCA1 の癌抑制能への関与を含めて、現在さらなる解析を行っている。

4. おわりに

近年、BRCA1 欠損細胞が、DNA 単鎖切断の修復に関わる poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) に対する阻害剤に感受性であることが判明した[13]。これは、細胞内の複数の DNA 修復経路の中で、BRCA1 が関与するもの以外の系を阻害することで、BRCA1 欠損細胞のみに強い細胞毒性を起こすことができるということである。このような考えから、BRCA1 の DNA 修復能に関する詳細な解析により、家族性乳癌、卵巣癌の発癌機構の解明、さらに新たな治療標的を探索することが可能になると考えられる。

また、散発性癌の一部でも BRCA1 の発現が低下していることより、家族性乳癌、卵巣癌だけでなく、散発性癌にも有効な新たな治療薬の開発にも寄与することができると考えられる。また、近年は乳癌、卵巣癌以外に、食道癌、大腸癌、肺癌などへの関与も検討されている。

今後は、本研究を進展させ BRCA1 を分子マーカーとして利用することにより、個別化医療の基礎を築き、さらには、これらの癌の発症機構を解明し、新たな治療薬となる分子標的の探索、予防法解明にも寄与することを目標とする。

また、これまでの BRCA1 の研究に加え、さまざまな腫瘍関連分子に着目し、分子イメージング技術などの新しい技術を用いて、それらの機能を詳細に解析することにより、発癌や再発のリスク評価、薬剤感受性の予測、治療のための新たな標的分子探索に関する研究を展開したいと考えている。また、細胞内タンパク群の動態を解析するために、タンパク発現、相互作用、翻訳後修飾や、目的タンパク質の精製・同定などを効率的に行える実験系の開発もめざしている。

文献

- [1] Miki Y,ほか 45 名. *Science* **266**, 66-71, 1994.
- [2] 千葉奈津子, 石岡千加史. *日本臨床* **65-6**, 601-605, 2007.
- [3] Chiba N and Parvin JD. *J Biol Chem* **276-42**, 38549-38554, 2001.
- [4] 太田智彦. *蛋白質核酸酵素* **51**, 1395-1400, 2006.
- [5] Noruzinia M, ほか 2 名. *Cancer* **104**, 1567-74, 2005.
- [6] 千葉奈津子, ほか 2 名. *癌診断研究の最前線 実験医学増刊*, 2007 (in press).
- [7] Chiba N and Parvin JD. *Cancer Res* **62**, 4222-4228, 2002.
- [8] You F, ほか 5 名. *Oncogene* **23-34**, 5792-5878, 2004.
- [9] Starita LM, ほか 5 名. *J Biol Chem* **280-26**, 24498-505, 2005.
- [10] 蘭利, ほか 2 名. *実験医学* **24-3**, 364-370, 2006.
- [11] Lan L, ほか 7 名. *Proc Natl Acad Sci USA* **101-38**, 4153-4162, 2004.
- [12] Lan L, ほか 6 名. *J Cell Sci* **118**, 13738-13743, 2005.
- [13] Farmer H, ほか 13 名. *Nature* **434**, 917-921, 2005.