

新規乳癌関連分子のノックアウトマウスの作成と その解析による新たな発癌機構の解明

[1] 組織

代表者：渡邊 利雄
(奈良女子大学大学院人間文化研究科)
対応者：千葉 奈津子
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：松澤 綾子
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費25万8千円，旅費4万2千円

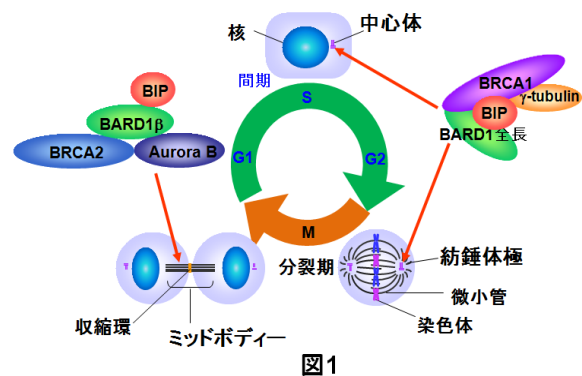
[2] 研究経過

家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 は、その生殖細胞系列変異により乳癌、卵巣癌を引き起こす癌抑制遺伝子である。一方、散発性癌では BRCA1 遺伝子変異をほとんど認めないが、散発性乳癌の 30~40%、卵巣癌のほとんどで BRCA1 の発現が減少している。また、近年、散発性乳癌の中の Basal-like 乳癌と言われる予後不良なサブグループの遺伝子発現プロファイルが BRCA1 変異による家族性乳癌のものと同様であることや、BRCA1 の発現量により抗癌剤感受性が異なることなどが報告され、BRCA1 が散発性癌の発症や薬剤感受性にも関与することが示唆されている。

BARD1 は BRCA1 とヘテロダイマーを形成し、DNA 修復、中心体制御、細胞周期チェックポイント、転写制御に関与する。BRCA1 の腫瘍由来の点突然変異で BARD1 との結合能とそのユビキチン化能は阻害され、BARD1 は BRCA1 の癌抑制機能を制御すると考えられる。

千葉は、プロテオミクス解析により BARD1 に結合する新規分子として BARD1-interacting protein (BIP) の同定に成功した。これまでの解析により、BIP は、BARD1 のみならず、BRCA1 や中心体の主要な構成因子である γ -tubulin に直接結合し、中心体、紡錘体極、ミッドボディーに局在することが明らかになった。BRCA1 は中心体、紡錘体極には局在するが、ミッドボディーには局在を認めない。一方 BARD1 は、中心体や紡錘体極には全長の BARD1 が局在し、ミッドボディーでは N 末端を欠

き BRCA1 に結合しないアイソフォームの BARD1 β が第2の家族性乳癌原因遺伝子の産物である BRCA2 や分裂期キナーゼである Aurora B と複合体を形成し、細胞質分裂に関与する。よって BIP は、中心体や紡錘体極とミッドボディーで異なった複合体を形成すると考えられる (図1)。



siRNA によって BIP を発現抑制すると、中心体数の増加や多核細胞の増加、細胞質分裂の異常が引き起こされ (図2)、BIP が中心体制御や細胞質分裂において重要な働きをすることが明らかになった。

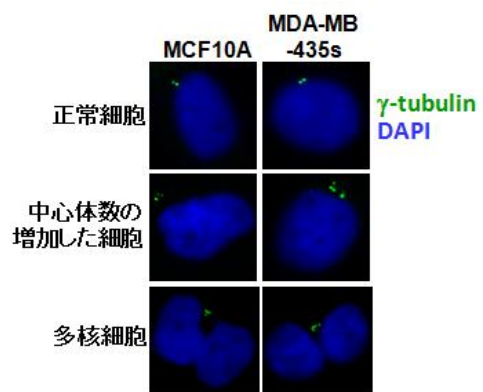


図2

本研究では、BIP のノックアウトマウスを作成し、BIP のノックアウトによる影響を *in vivo* にて解析し、その破綻による乳癌、卵巣癌の個体レベルでの新たな発癌メカニズムを解明することと、ノックア

ウトマウスから樹立した細胞を用いた細胞生物学的・生化学的解析により分子メカニズムを解明することを目的とした。

渡邊と千葉は、10年ほど前に共同でノックアウトマウスと胚の器官培養系を用い、造血幹細胞の発生を支配する転写因子 AML1 に関する研究を行い、多数の成果を上げている。

数年ほど前から、両者の共通の興味の対象である癌細胞における細胞分裂に関する研究に関して研究上の相談を行っている。それまでの話し合いで、BIP の新たな発癌メカニズム解析に関して、マウスの系を用いた解析の必要性を認識し、今回の共同研究を実施することを立案し、平成 23 年度から本共同研究に採択され、共同研究を行っている。共同研究のための連絡は、メール・電話等で緊密に常時行った。

また、H24 年 11 月に、奈良女子大学大学院生が、H25 年 3 月には渡邊が加齢医学研究所を訪問し、研究の打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

(1) 千葉らにより明らかにされた情報を基に、BIP の機能ドメインの上流にある Exon3 を *loxP* で挟んだコンディショナルノックアウトマウスを作成するために必要な、遺伝子破壊用組み換え体 DNA を完成させた。

この計画では、万が一 Exon3 が読み飛ばされても、Exon3 を欠損するとフレームシフトにより直ちに STOP コドンが生じ、前述の BIP の機能に重要な領域は翻訳されない。

加えて、相同組み換え体 ES 細胞取得のために、PCR による遺伝子改変 ES 細胞の選別条件（1 次スクリーニング）とサザン法による確認条件の検討を行った。PCR 条件に関しては、条件検討用に組換え体 DNA を作製し最適条件を決定した。また、サザン法による確認のために必要なプローブに関しては、標的とする遺伝子領域に反復配列が多く困難を極めたが、確認用の制限酵素を変更することで、10 か所目のプローブの候補で良好な結果を得ることに成功した。

これらの条件の決定により、BIP 遺伝子改変 ES 細胞の取得に成功し、理化学研究所で BIP 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスのキメラマウスを作製した。これらのキメラマウスを、奈良女子大

学、加齢医学研究所に搬出し、野生型のマウスと交配して、BIP 遺伝子ヘテロ flox マウスを作製した。

さらに、全身で Cre リコンビナーゼが発現する CAG-Cre マウスと交配を行い、BIP 遺伝子ヘテロ欠損マウスを作製し、現在は、BIP 遺伝子ホモ欠損マウスを作製している。

(2) これまでの研究により、BIP の発現抑制により、BIP が中心体制御と細胞質分裂に関与することが明らかになっていたが、その後の研究の進行により、BIP の中心体制御機構の分子メカニズムが明らかになってきた。

BIP は BARD1 の C 末端と直接結合することが分かっていたが、BRCA1 の N 末端とも直接結合することも明らかになった。また、BIP は、乳癌細胞株で既に点突然変異が報告されているが、この変異体では BRCA1 との直接結合能が消失した。さらに、野生型の BIP を発現抑制して、この BIP の変異体を導入した細胞では、中心体数が著しく増加し、この変異体では、中心体の制御能が障害されることが明らかになった。さらに興味深いことに、BRCA1 の家族性乳癌由来の点突然変異で、その変異により中心体制御能が障害されることが明らかになっている変異体では、BIP との直接結合能が著しく低下することも明らかになった。よって、BIP の機能の破綻が発癌メカニズムに大きく関与することが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

千葉、渡邊は、この共同研究により、科学研究費補助金 基盤研究(B) (1,110 万円、平成 27 年度まで継続) と、東北大学学際科学国際高等研究センタープログラム研究 (平成 24 年度は 300 万円、平成 26 年度まで継続) の研究資金を獲得した。

また、これらの研究成果を大学院生が、文科省科研費「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」の「がん若手研究者ワークショップ」に参加して発表した。

[4] 成果資料

現在、論文作成のためにさらに研究を進めている。