

## Ola1 ノックアウトマウスの表現型の解析による 新たな発癌機構の解明

### [1] 組織

代表者：中村 保宏

(東北医科薬科大学医学部)

対応者：千葉 奈津子

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費30万円

### [2] 研究経過

*Breast Cancer gene 1 (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ん抑制遺伝子である。散発性がんでは、BRCA1 の発現の減少が報告されており、近年は難治性乳がんであるトリプルネガティブ乳がんとの関連も明らかになっている。BRCA1 は BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1) とヘテロダイマーを形成し、DNA 修復、クロマチンリモデリング、中心体制御など、細胞内の様々な機能に関与する。

所内対応者である千葉らが BARD1 の結合分子として同定した Obg-like ATPase 1 (OLA1)は、BRCA1、BARD1、中心体の構成因子である  $\gamma$ -tubulin と直接結合し、間期に細胞質と中心体に、分裂期には紡錘体極に局在する。中心体は、L字型に配置した母中心小体と娘中心小体の2個の中心小体から構成され、微小管形成中心として機能し、分裂期には紡錘体極となり、娘細胞への染色体の均等な分配を担う(図1)。

OLA1 の発現抑制は、中心体の複製異常と断片化

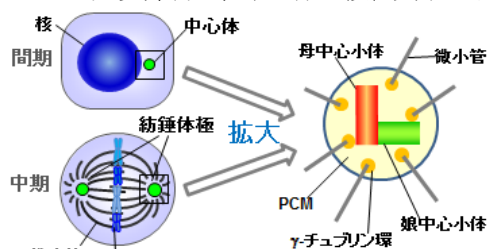


図1 中心体の構造

による中心体数の増加を引き起こす。中心体数の増加は、染色体分配の異常をもたらし、がんの特徴的な染色体不安定性の原因となる。

千葉らは、OLA1 の個体レベルで機能を解明するため、*Ola1* のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、全身で Cre を発現する CAG-Cre マウスと交配し、全身でのノックアウトの影響を観察した。*Ola1* ホモノックアウトマウスは胎生致死であったが、*Ola1* ヘテロノックアウトマウスは、雌でのみ脾臓に腫瘍細胞が増加し、脾臓構造が破壊され、老齢マウスには腸間膜リンパ節や肝臓に転移巣が見られた。これまでの共同研究により、この腫瘍が脾臓原発の B 細胞型リンパ腫で、異常な染色体分配が見られることなどが明らかになった。

今年度はこれらの腫瘍形成に女性ホルモンが関わることを明らかにすることができた。これによって *Ola1* の個体レベルでの機能とがん抑制機構を解明し、がんの予防法、治療法開発のための分子基盤を確立することが可能になると考えられる。

研究代表者の中村と加齢研対応教員の千葉は、以前より共同研究を行っており、本共同研究においても、千葉研究室において議論を重ね、電子メールでも連絡をとり、共同研究を進めた。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

*Ola1* ヘテロノックアウトマウスでの脾臓の腫瘍形成は、雌マウスだけに生じ、老齢マウスには転移巣も認められた。脾臓腫瘍は、病理組織学的解析の結果、濾胞構造や細胞の異型性から、①悪性リンパ腫、②異型細胞の増殖、③髄外造血の亢進の3群に分類され、背景組織はいずれも増殖性疾患と考えられた。HE 染色でそれぞれの細胞の形態を観察したところ、悪性リンパ腫では B 細胞型で、細胞分裂像が多く、中心体異常の結果と考えられる異常な染色体分配が起きている分裂像が多く観察された。*Ola1* 機能欠損による中心体数の異常が起きていることが示唆された。そこで、悪性リンパ腫、異型細胞、

正常細胞での中心体数を、悪性リンパ腫組織、異型細胞の増殖を認める組織、正常脾臓組織を抗 $\gamma$ -tubulin抗体による免疫染色で解析し、中心体の増加した細胞を計数したところ、悪性リンパ腫で明らかに中心体数が増加していることが明らかになった(図2)。

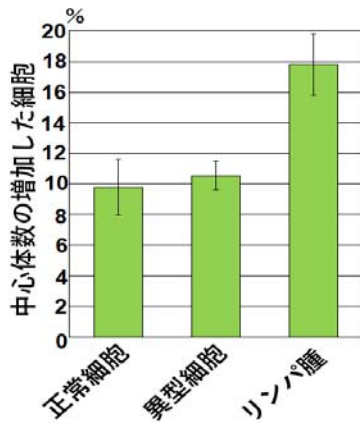


図2 脾臓組織の中心体数

また、雌マウスのみに腫瘍が形成されるため、女性ホルモンが中心体数の制御に影響を与えるのではないかと考え、エストロゲンとプロゲステロン処理による影響を解析した。ヒト乳腺由来細胞で、OLA1を発現抑制すると中心体数が増加する。そこで、エストロゲン受容体陽性、プロゲステロン受容体陽性の乳がん細胞であるMCF7細胞に、OLA1のsiRNAを導入し、エストロゲン処理とプロゲステロン処理を行い、抗 $\gamma$ -tubulin抗体による免疫染色で解析し、中心体数が増加した細胞を計数したところ、OLA1の発現抑制による影響ほどではないが、エストロゲン処理のみで、中心体数の増加が見られた。しかし、OLA1を発現抑制し、エストロゲン処理すると、中心体数の増加は、エストロゲン処理のみと同程度となった。一方、プロゲステロン処理は、中心体数には影響を及ぼさなかった。この結果は、女性ホルモンがOLA1の機能不全により生じる中心体数の増加に促進的に働き、雌のOla1ヘテロノックアウトで発がんを引き起こすのではないかという仮説に反するものであった。しかしながら、エストロゲン処理がOLA1の中心体複製制御に何らかの影響を及ぼすことが明らかになった。

### (3-2) 波及効果と発展性など

BRCA1の機能としては、以前よりDNA修復能が精力的に解析され、この機能の破綻が発がんの原因になると考えられてきた。しかし、BRCA1はユビキタスに存在し、組織特異的にDNA修復能

を発揮するという報告はなく、BRCA1変異による発がんが、なぜ女性に組織特異的に発症するのか不明であった。

しかし、Ola1ノックアウトマウスで観察された腫瘍は、雌マウスのみに、特に妊娠マウスで見られ、女性ホルモンの関与が考えられた。これまでの解析により、B細胞型リンパ腫であることが明らかになったが、マウスでは、妊娠時にエストロゲンがエストロゲン受容体を介してリンパ球の増殖能を制御することが報告されている。また、多くのヒトの造血器腫瘍でも、中心体異常が報告されている。興味深いことにヒト細胞での解析でBRCA1の発現抑制では乳腺由来細胞でのみ中心体数の異常を引き起こす。千葉らの解析により、OLA1やその新規結合分子で、BRCA1、BARD1と直接結合する分子の発現量の異常も、乳腺由来細胞でのみ中心体数の増加を引き起こし、OLA1とエストロゲン受容体との相互作用も明らかになった(論文投稿中、作成中)。最近、エストロゲン受容体が中心体に局在することも報告もされた(Okada et al. *Mol Endocrinol* 2015)。

よって本研究の進展により、組織特異的な発がんのメカニズムが明らかになり、BRCA1変異の保因者のがんの発症予防やがんの治療法の開発に貢献できると考えられる。

### [4] 成果資料

学会発表

- (1) 吉田貴大, 吉野優樹, 小河穂波, 佐々木伯大, 中村保宏, 渡邊利雄, 千葉奈津子. BRCA1の新規結合分子Ola1のノックアウトマウスの表現型の解析. Function of the novel BRCA1-interacting protein OLA1 in mice 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017(2017年12月7日, 神戸)
- (2) Yuki Yoshino, Huicheng Qi, Natsuko Chiba. Function of the novel BRCA1-interacting protein OLA1 in centrosomal regulation and carcinogenesis. 2nd Global Onsite Conference on Breast Cancer Sep.4 2017 Rome, Italy
- (3) Huicheng Qi, Kazune Ohashi, Fang Zhenzhou, Yuki Yoshino, Natsuko Chiba. BRCA1-interacting protein OLA1 is involved in the centrosomal duplication and response to DNA damage. The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University 第33回放射線生物研究センター国際シンポジウム(2017年12月5日, 京都)