

課題番号 21

## 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 10 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  $\alpha$ -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)。

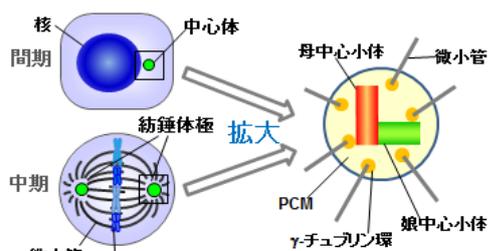


図1 中心体の構造

OLA1 の発現抑制は、中心体の複製異常と断片化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、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。悪性リンパ腫組織、異型細胞の増殖を認める組織、正常脾臓組織で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。

また、雌マウスのみ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、エストロゲン受容性陽性、プロゲステロン受容性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、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、減弱した。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。

これらの結果を踏まえ、今年度は、Ola1ホモノックアウトマウスの胎生致死の原因の探索、腫瘍性病変におけるOla1発現量の変化、妊娠期間中の脾臓細胞の中心体数、エストロゲン処理のBRCA1、OLA1の中心体局在への影響について解析した。

研究代表者の中村と加齢研対応教員の千葉は、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ホモノックアウトマウスの胎生致死の原因について、病理学的に検討したところ、野生型とOla1ヘテロノックアウトマウスの個体では観察した時期のいずれでも明らかな差異は指摘できなかったが、Ola1ホモノックアウトマウスの個体ではE12.5において肝臓の発生が、E18.5において肺の発生に遅延を認めた。

次に、Ola1ヘテロノックアウト雌マウスの脾臓におけるOla1発現量を、正常組織、異型細胞の増殖、悪性リンパ腫の各組織で評価した。対照として野生型マウスの正常脾臓組織を用いた。その結果Ola1発現量は、野生型とOla1ヘテロノックアウトマウスの正常組織では違いがなく、異型細胞の増殖、悪性リンパ腫組織では低下していた。異型細胞の増殖よりも悪性リンパ腫組織においてOla1の発現量低下が著しく、Ola1の発現量低下と組織の異形成との相関関係が示唆された。

また、性ホルモンが中心体複製制御に及ぼす影響を解析するため、生理的に女性ホルモンおよび黄体ホルモンの血中濃度が上昇する妊娠期間中の脾臓の中心体数を評価した。その結果、非妊娠マウスと比較して有意に中心体数が増加していた。

さらに、OLA1の過剰発現による中心体数の増加はBRCA1との結合に依存することが示唆されている。エストロゲンがBRCA1の中心体への局在を変化させ、OLA1の発現異常による中心体数の増加を制御する可能性を考え、エストロゲン受容体陽性のMCF7細胞をエストロゲンで処理し、BRCA1の中心体局在を解析した。その結果、エストロゲン処理によってBRCA1の中心体局在はG1期、S-G2期の両方で低下した。一方OLA1の中心体局在にはエストロゲン処理による変化を認めなかった。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

BRCA1のがん抑制能として、以前よりDNA修復能が注目され、精力的に解析され、この機能の

破綻が主要な発がんの原因と考えられてきた。しかし、BRCA1の組織特異的なDNA修復能の報告はなく、BRCA1変異による組織特異的な発がん機構は不明であった。しかし、千葉らの解析により、BRCA1、BARD1、OLA1、その新規結合分子RACK1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すことが明らかになり、BRCA1の中心体制御機構の破綻が組織特異的な発がんを引き起こすことが示唆されている(Yoshino et al. Mol Cancer Res, 2018、Yoshino et al. Oncogene, in press)。

Ola1ノックアウトマウスで観察された腫瘍は、雌マウスのみに見られ、エストロゲンが中心体数の制御に関わり、妊娠マウスでより高度な中心体数の異常が見られた。脾臓腫瘍は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。興味深いことにヒト細胞での解析で最近、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)。加えて、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(論文作成中)。本研究によりエストロゲン処理がBRCA1の中心体局在を制御することも明らかになり、これが受容体を介するのかも含めてさらに解析が必要である。

本研究のさらなる進展により、BRCA1の機能不全による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) 吉野優樹、齋匯成、小林輝大、遠藤菜乃、方震宙、千葉奈津子. 新規BRCA1結合分子RACK1の中心体複製制御能 第36回染色体ワークショップ 第17回核ダイナミクス研究会(2019年1月25日, 宝塚)
- (2) Yuki Yoshino, Huicheng Qi, Kei Otsuka, and Natsuko Chiba. Function of BRCA1-interacting proteins OLA1 and BIP in centrosome and carcinogenesis. BASSER CENTER FOR BRCA 6<sup>th</sup> Annual Scientific Symposium BRCA1, BRCA2 and Beyond: An Update on hereditary Cancer May 22 2018, Philadelphia, USA