

放射線治療抵抗性がんに対する RAD51 を標的とした新規治療法の開発

落 合 和 彦

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 獣医保健看護学基礎部門・講師

日獣生大研報 64, 10-12, 2015.

はじめに

近年、愛玩動物の寿命が長くなるにつれて腫瘍性の疾病が増加している^{1,2)}。イヌでは乳腺腫瘍が雌イヌの全腫瘍に占める割合は約 40%に達するといわれており、これほど多く乳腺腫瘍を発症する動物は他に知られていない^{3,4)}。

ヒトでは、乳ガンが多発する家系よりポジショナルクローニング法によって、1994年にBRCA1が、1995年にBRCA2がそれぞれ分離、同定され、機能に関する研究が展開されている^{5,6)}。BRCA1およびBRCA2タンパク質は、ともに乳腺だけではなく広範な組織で発現しており、減数分裂期相同組換えやDNA損傷修復反応で重要な働きをするRAD51タンパク質と結合し、その機能発現を調節することが明らかにされた⁷⁾。疫学的調査により、BRCA1の変異は乳線ばかりでなく消化器系など多様な組織のガンの原因になるが、それとは対照的にBRCA2の変異は乳腺、卵巣、すい臓、前立腺など比較的限られた組織でガンの原因となることが示された⁸⁾。両分子は発見当初には哺乳動物にしか存在しないと考えられていたが、2002年になってニワトリのBRCA2がクローニングされ注目を集めた⁹⁾。その後、植物であるシロイヌナズナや担糸菌類でもBRCA2の相同分子が報告された。この様に、BRCA2は乳腺腫瘍という特定の組織の異常と密接に関連している一方で、乳腺を持つか否かに関わらず様々な生物種のあらゆる細胞にBRCA2あるいはその相同分子が存在してDNAの相同組換え反応に関与していることが明らかになった。

我々はイヌの乳腺腫瘍に着目し、腫瘍が高い頻度で発生する原因の候補としてBRCA2とRAD51に焦点を当ててその構造と機能の関連を解析してきた¹⁰⁻¹²⁾。ヒトやマウスでのこれまでの報告から、BRCA2とRAD51の機能が欠損するとゲノムの不安定化が起こるといわれているが¹³⁾、イヌの乳腺腫瘍細胞では染色体に異数性の変化が認められており¹⁴⁾、近年の研究によって、乳腺腫瘍罹患イヌから分離されたBRCA2で多型配列も見つかっており¹⁵⁻¹⁷⁾、イヌでもこれらの分子が乳腺腫瘍と関わっている可能性が考え

られる。また、DNA相同組換え修復の中心的な役割を持つRAD51ではあるが、腫瘍細胞内でその発現が亢進すると、放射線治療や化学療法等の腫瘍細胞DNAの損傷を機序とする抗がん治療に抵抗性を獲得することが知られている¹⁸⁾。イヌのBRCA2-RAD51相互作用様式はヒトと異なることが我々の研究で明らかとなったため、その機序を特定し、新たな分子創薬戦略の構築を試みた。

イヌのBRCA2とRAD51のクローニングと構造および発現解析

BRCA2がRAD51と結合することは、DNAの相同組換えが正常に進行するために必須の反応である⁷⁾。両者の結合はBRCA2分子のほぼ中央に位置するBRC repeatsまたはBRCA2分子のC末端でRAD51と結合することが明らかとなっている。乳腺腫瘍が好発するイヌにおいてBRCA2とRAD51の機能を探る第一歩として、両分子をクローニングして構造および発現の解析を行った。

イヌのBRCA2のcDNAは全長が約11kbで10,341bpのORFを有し、推定3,446個のアミノ酸で構成される巨大分子をコードしていた(NM_001006653.4)。イヌBRCA2のcDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、ヒトBRCA2と68%、マウスBRCA2と58%の相同性を示した。一般的に、ガン抑制遺伝子であるp53やRB1、APCなどは80%以上の高い種間相同性を示すことが知られており、BRCA2の種間相同性の低さは際立っている。この相同性の低さがイヌBRCA2の機能に影響を与え、乳腺腫瘍罹患率を高くしている可能性も考えられる。

一方、RAD51のcDNAは全長が約1.5kbであり、1,020bpのオープンリーディングフレーム(ORF)に339個のアミノ酸から構成されるタンパク質をコードしていた(NM_001003043)。このORFの長さは、ヒトおよびマウスのものと一致した。イヌRAD51タンパク質のアミノ酸配列は、ヒトおよびマウスRAD51と99%の相同性を示した。この結果より、種間で高い相同性を示すRAD51よりも、互いの相同性がそれほど高くないBRCA2に、動物

種間での乳腺腫瘍発症頻度の相違に関わる機能が隠されている可能性が示された。

BRCA2 と RAD51 の組織分布を調べたところ、両分子はともに乳腺で発現していたことから、イヌでも乳腺でなんらかの働きをしていることが推察された。また、ヒトとマウスで報告された結果と同様に、DNA の相同組み換えがさかんな精巣で強い発現が見られ、卵巣にもその発現が見られた。しかし、細胞分裂が活発ではない脳では BRCA2 の発現しかみられないことから、組織によって BRCA2 と RAD51 の相互関係に違いがあることが考えられた。

イヌの BRCA2 と RAD51 の相互作用

これまでの報告で、BRCA2 は RAD51 と結合し、減数分裂期や電離放射線照射による二重鎖切断 (DSB) 発生時に RAD51 を DNA 損傷部位に輸送し、解離することで正常な損傷修復が行われることが明らかにされてきた。そしてその破綻が乳腺腫瘍発症につながることも報告されてきた¹³⁾。

酵母および哺乳類ツーハイブリッド法の結果から、イヌの BRCA2 は BRC repeats および C 末端の両方で RAD51 と結合することが明らかとなった。BRC repeats の欠失変異体を解析した結果から、repeats の数や長さが RAD51 との結合の強さに影響を与えることがわかった。さらに、個々の repeat と RAD51 との結合を解析した結果から、repeat ごとに結合の強さが異なることが明らかとなった¹²⁾。ヒトやマウス以外の哺乳動物で BRC repeats と RAD51 の相互作用について検討された例はなかったが、このイヌでの結果をあわせるとこの 2 つの分子が種を超えて広く相互作用を持つことがより明確なものとなった。Pellegrini らは、ヒトでは 8 個の BRC repeats のうち repeat 4 が RAD51 との結合に中心的な役割を担うことを報告した¹⁹⁾。そこで、イヌとヒトの BRC repeat 4 で異なっているアミノ酸を各々置換して RAD51 との相互作用に及ぼす影響を哺乳類ツーハイブリッド法で検討したところ、ヒト型よりもイヌ型の BRC repeat 4 のほうがより強い結合を示した。ヒトの BRC repeat 4 (BRC4) の特定のアミノ酸を置換することによって RAD51 との結合が弱くなるという報告はあるが²⁰⁾、アミノ酸を置換したものが RAD51 とより強く結合したという報告は初めてである²¹⁾。本研究においてはヒト BRC4 の 1532 番目の Valine をイヌとの相同部位に存在する Isoleucine に置換した場合 (V1532I) に BRC4 と RAD51 の結合能力は Mammalian two-hybrid assay において約 5 倍以上に上昇した。また、ヒトの乳がん患者より同定された変異である V1532F については Rad51 との結合がほぼ消失することも確認できた。この結果について UCSF-Chimera ソフトウェア (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) による結晶構造モデルシミュレーションを行ったところ、V1532I の場合は相互作用部位である RAD51 の M210 を中心とする結合ポケット

との推定 contact 数が増加し、結合に有利になると予測されたが、V1532F の場合には推定 clash が増加し結合に不利な状態になることが予測され、Mammalian two-hybrid との結果と一致した。本研究はイヌとヒトの BRC repeat の構造比較から、RAD51 との結合力に影響を与えるアミノ酸を特定したものであり、獣医学が持つ比較生物学的着眼点に基づいて行われた研究である。ヒトのがん症例においては、RAD51 の発現および機能亢進のため、がん細胞での相同組換え頻度が上昇し、DNA の 2 本鎖切断を機序とした放射線治療等に抵抗性の事例が存在する¹⁸⁾。これらの症例に対しては、本研究で発見された V1532I 置換を組み込んだ BRC repeat 分子を構築し、より強く RAD51 と結合しその機能を抑制する分子薬剤ができれば、がん治療の有効な補助療法としての可能性も見えてくるものと推察される。

終 わ り に

近年、遺伝学・統計学的な解析により、イヌ BRCA2 の多型配列と乳腺腫瘍発症との関連性が論じられつつあるが、具体的な配列の変異と乳腺腫瘍発症との関係はいまだ明らかになっていない。これを解明するためには、乳腺腫瘍に罹患したイヌにおける BRCA2 の変異の有無を大規模解析する必要がある。しかし、BRCA2 は巨大分子であるため、その変異解析は容易ではない。今後は積極的に変異解析用イヌ DNA サンプルを収集し、乳腺腫瘍罹患個体からの BRCA2 変異分離を積極的に行う必要があると考えている。我々はこれまでにイヌ BRCA2 遺伝子において、いくつかの多型を発見しており、今後の大規模解析により、乳腺腫瘍発症との相関を検討することが可能となる。今後は、さらに BRCA2 の機能解析を進めるとともに、多検体での変異解析を実施して、この分子がイヌの乳腺腫瘍において果たす役割を解明したい。そして、その結果をイヌの乳腺腫瘍の予防や治療に活用する道を開きたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) MOE, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57, 439-443.
- 2) TAYLOR, G.N., SHABESTARI, L., WILLIAMS, J., MAYS, C.W., ANGUS, W. and MCFARLAND, S. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 36, 2740-2743.
- 3) DORN, C.R., TAYLOR, D.O., FRYE, F.L. and HIBBARD, H.H. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40, 295-305.
- 4) MOULTON, J.E., TAYLOR, D.O., DORN, C.R. and ANDERSEN, A.C. (1970). Canine mammary tumors. *Pathol. Vet.*, 7, 289-320.

- 5) MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P.A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNETT, L.M., DING, W. and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**, 66-71.
- 6) WOOSTER, R., BIGNELL, G., LANCASTER, J., SWIFT, S., SEAL, S., MANGION, J., COLLINS, N., GREGORY, S., GUMBS, C. and MICKLEM, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, **378**, 789-792.
- 7) WONG, A.K., PERO, R., ORMONDE, P.A., TAVTIGIAN, S.V. and BARTEL, P.L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31941-31944.
- 8) RANDALL, T.C., BELL, K.A., REBANE, B.A., RUBIN, S.C. and BOYD, J. (1998). Germline mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in a breast and ovarian cancer patient. *Gynecol. Oncol.*, **70**, 432-434.
- 9) TAKATA, M., TACHIIRI, S., FUJIMORI, A., THOMPSON, L.H., MIKI, Y., HIRAOKA, M., TAKEDA, S. and YAMAZOE, M. (2002). Conserved domains in the chicken homologue of BRCA2. *Oncogene*, **21**, 1130-1134.
- 10) OCHIAI, K., MORIMATSU, M., TOMIZAWA, N. and SYUTO, B. (2001). Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 cDNA. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1103-1108.
- 11) OCHIAI, K., MORIMATSU, M., YOSHIKAWA, Y., SYUTO, B. and HASHIZUME, K. (2004). IBrca2 C-terminus interacts with Rad51 and contributes to nuclear focus formation in double-strand repair of DNA. *Biomed. Res.*, **25**, 269-275.
- 12) OCHIAI, K., YOSHIKAWA, Y., OONUMA, T., TOMIOKA, Y., HASHIZUME, K. and MORIMATSU, M. (2011b). Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. *Vet. J.*, **190**, 293-295.
- 13) MOYNAHAN, M.E. and JASIN, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **11**, 196-207.
- 14) RUTTEMAN, G.R., CORNELISSE, C.J., DIJKSHOORN, N.J., POORTMAN, J. and MISDORP, W. (1988). Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res.*, **48**, 3411-3417.
- 15) HSU, W.L., HUANG, Y.H., CHANG, T.J., WONG, M.L. and CHANG, S.C. (2010). Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *Vet. J.*, **184**, 351-356.
- 16) RIVERA, P., MELIN, M., BIAGI, T., FALL, T., HAGGSTROM, J., LINDBLAD-TOH, K. and VON EULER, H. (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.*, **69**, 8770-8774.
- 17) YOSHIKAWA, Y., MORIMATSU, M., OCHIAI, K., NAGANO, M., TOMIOKA, Y., SASAKI, N., HASHIZUME, K. and IWANAGA, T. (2008). Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. *Am. J. Vet. Res.*, **69**, 1323-1328.
- 18) RICHARDSON, C., STARK, J.M., OMMUNDSEN, M. and JASIN, M. (2004). Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*, **23**, 546-553.
- 19) PELLEGRINI, L., YU, D.S., LO, T., ANAND, S., LEE, M., BLUNDELL, T.L. and VENKITARAMAN, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, **420**, 287-293.
- 20) CHEN, C.F., CHEN, P.L., ZHONG, Q., SHARP, Z.D. and LEE, W.H. (1999). Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G (2) /M checkpoint control. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32931-32935.
- 21) OCHIAI, K., YOSHIKAWA, Y., YOSHIMATSU, K., OONUMA, T., TOMIOKA, Y., TAKEDA, E., ARIKAWA, J., MOMINOKI, K., OMI, T., HASHIZUME, K. and MORIMATSU, M. (2011a). Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction between BRCA2 and RAD51. *FEBS Lett.*, **585**, 1771-1777.