

論文の内容の要旨

論文題目 BRCA1 転写共役因子 MED1 の DNA 損傷修復機構における機能解析

氏名 本城 晴紀

卵巣癌は世界全体で女性が罹患する癌のうち 7 番目に多く、癌による死因としては 8 番目である。高齢化に伴い罹患患者数は増加することが予想され、世界全体での 2018 年の卵巣癌発症者数が 295,414 人、死亡者数が 184,799 人であったが、2035 年には発症者数は 371,000 人、死亡者数は 254,000 人に急伸すると予測されている。女性性器悪性腫瘍の中で卵巣癌は最も死亡率が高く予後の悪い疾患である。本邦における卵巣癌の罹患数・年齢調整罹患率・死亡者数・年齢調整死亡率はすべて漸増傾向にある。

卵巣癌の約 15~25%は遺伝性の癌とされており、そのうち 50~75%は生殖細胞系列における *BRCA1/2* 遺伝子 (Breast cancer susceptibility gene 1/2) の異常が関与する常染色体優性遺伝である、遺伝性乳癌卵巣癌 (HBOC: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome) である。BRCA1 は、放射線や複製ストレスにより生じる DNA 二本鎖切断 (DSB: Double strand break) の正確な修復を行う相同組換え修復経路 (HR: Homologous recombination) を調節する他、細胞周期 Checkpoint の制御、クロマチン再構成、DNA 損傷修復因子のスプライシング、転写副産物 R-loop (DNA-RNA hybrid) の処理など広範な機能を担うことでゲノム安定性に寄与する。

我々のグループでは以前に、相同組み換え修復機序の解明のため siRNA ライブラリを用いた網羅的なスクリーニングを行い、多数の mRNA プロセッシング因子を新規の HR 経路候補因子として同定した。本研究では、それらの新規候補因子の中で乳癌の発癌機序の関連が示唆されているメディエーター複合体 (Mediator complex) の構成因子 MED1 (Mediator complex subunit 1) に着目し、BRCA1 との相互作用、HR 経路の制御能、転写副産物 R-loop の処理能に関する機能解析を行った。

まず MED1 が HR 経路のマスターレギュレーターである BRCA1 と細胞内において相互作用することを免疫沈降法で確認した。さらに MED1 が、HBOC で高頻度に変異を認める領域である BRCA1 の BRCT 領域 (BRCA1 C Terminus domain) とヒト細胞内で複合体を形成すること GST pull down 法にて示した。またルシフェラーゼアッセイにより MED1 過剰発現が BRCA1-BRCT の転写活性を正に制御することが確認された。

続いて細胞周期調節への影響について検討した。FACS (Fluorescence-activated cell sorting) では *MED1* を siRNA でノックダウンした後、Double thymidine block にて細胞周期を G1 / S 境界に同調させ、同調解除した細胞で G2 / M 期停止が生じることが示された。ウェスタンブロットティングでは MED1 が BRCA1 依存性転写産物 p21、GADD45 α の発現を調節していること

が示され、MED1はBRCA1の抗腫瘍的な細胞周期調節機能に寄与する可能性が示唆された。

さらにMED1がDSB後の相同組換え修復にもたらす影響について検討した。MED1をsiRNAでノックダウンした細胞ではIR、CDDPの感受性が高まることから、これらの細胞ではHR機構が破綻している可能性が考えられた。MED1をsiRNAでノックダウンした後にHydroxyurea処理を施してDSBを誘導した際の、主要なHR因子のタンパク発現についてウエスタンブロットティングで観察したところ、転写制御を介したATM (Ataxia-telangiectasia mutated)、Chk2 (Checkpoint kinase 2)、H2AX (H2A histone family member X) のリン酸化タンパク発現の低下を認めた。免疫染色による検討ではMED1ノックダウンによりDSB部位へのpATM (phosphor-ATM)、 γ H2AX、RPA (Replication protein A) の集積が阻害されており、MED1はATM下流の広範囲に渡ってシグナルを制御しDSB修復に寄与していると考えられた。

次に相同組換え修復能へ及ぼす影響をDR-GFPアッセイ (Direct-repeat GFP assay) で検討した。BRCA1ノックダウン細胞ではHR活性がコントロールに比して約1/7に、MED1ノックダウン細胞では約1/2に減弱し、MED1がHR活性に寄与する可能性が示された。免疫染色ではMED1ノックダウンによりDNA損傷部位へのRAD51、 γ H2AX、BRCA1の核内集積減弱が示され、DR-GFPアッセイの結果と符合した。HR経路が破綻している場合の代替修復経路として機能する、NHEJ経路 (Non-homologous end-joining) の活性に対してMED1が及ぼす影響についても検討した。EJ5-GFP assayではMED1ノックダウン細胞でC-NHEJ (Canonical / Classical-NHEJ)活性が約1/2に低下していた、ウエスタンブロットティングでの検討ではDNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) のリン酸化が著しく抑制されており、MED1はDNA損傷を認識するレベルのC-NHEJ上流域の制御に対しても影響を持つ可能性が示唆された。またMED1ノックダウン条件ではPARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1) のリン酸化抑制と、XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1)の転写抑制を認め、Alt-NHEJ (Alternative-NHEJ)にも支障をきたす可能性が推察された。以上よりBRCA1非依存性のDNA損傷修復路に関してもMED1はその上流域で寄与する可能性が示唆された。

DNA損傷レベルの経時的変化に対してMED1が及ぼす影響をコメットアッセイで検討したところ、MED1ノックダウンによりIRによるDNA損傷が遷延することが示され、ウエスタンブロットティングではMED1ノックダウンによりATM、Chk2のリン酸化が遅延・遷延する現象を認めた。

さらに、MED1がBRCA1のBRCT領域と結合し共役することから、転写副産物R-loopとMED1の関連性を検証した。BRCA1のBRCTドメインは、BRCA1がSenataxinと複合体を形成してR-loop除去を行う領域と推定されている。既知のR-loop分解酵素であるRNaseH1を併用したコメットアッセイでは、MED1ノックダウンにより生じたDNA損傷が、RNaseH1強制発現によりキャンセルされる現象が確認された。さらに免疫染色ではMED1ノックダウンによるR-loop蓄積を認め、MED1がR-loopの処理に寄与する可能性が示唆された。

最後に、BRCA1機能失活が高頻度で生じる高異型度漿液性癌 (HGSO: High grade serous ovarian carcinoma) におけるR-loop蓄積及びその意義について臨床検体を用いて検討した。

細胞及び組織における R-loop を S9.6 抗体による蛍光免疫染色および DRIP アッセイ (DNA-RNA hybrid immunoprecipitation) で評価した。培養細胞を用いた蛍光免疫染色、DRIP アッセイでは、*BRCA1* のノックダウン下で核内 R-loop が増加することを示した。続いて次世代シーケンサー解析により既に *BRCA1* 変異プロファイルが判明している HGSOC 臨床検体 18 例 (*BRCA1*mut. 9 例 vs. g*BRCA1*wt. 9 例) を対象として免疫染色を行ない、腫瘍部での R-loop 蓄積を評価した。*BRCA1* 変異陽性群において変異陰性群に比して腫瘍部における R-loop 蓄積が優位に増加すること、*BRCA1* 変異陽性例で正常卵管上皮から卵管上皮内癌へ移行するにつれて R-loop 蓄積が増加することを示した。*BRCA1* 変異キャリアでは R-loop 漸増が正常卵管上皮から STIC、HGSOC への発展過程において生じている可能性が示唆された。

以上結論として、本研究では、*BRCA1* の C 末端 BRCT 領域結合タンパクとして転写因子 MED1 を同定し、MED1 が相同組換え修復の制御に寄与することを示した。さらに MED1 は転写副産物 R-loop の処理を行うことでゲノム恒常性に寄与する *BRCA1* の新規機能にも関連している可能性が示唆された。MED1 は多様な発癌抑制機能をもち、薬剤感受性バイオマーカーや新規治療標的としての可能性を有すると考えられた。また、*BRCA1* 機能失活による R-loop 過剰蓄積が、HGSOC の発癌機序において重要な役割を担う可能性が示唆された。