

論文の内容の要旨

Human *NBS1* polymorphism reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability

(ヒト *NBS1* の塩基多型は DNA 修復活性を低下させ染色体不安定性を誘起する)

病態医療科学分野

山本 悠貴

研究背景と目的

DNA 相同組換え修復はウイルスからヒトまで生物全般で保存された 2 本鎖切断 DNA を修復する基本的な DNA 修復経路である。酵母を用いた遺伝学的解析からその DNA 相同組換え修復の開始反応に重要な因子として XRS2, Mre11 および RAD50 遺伝子が知られていた。さらに、ナイミーヘン症候群の原因遺伝子としてクローニングされた *NBS1* 遺伝子は酵母 XRS 遺伝子のヒトホモログであることがわかった。ナイミーヘン症候群の患者は若年で白血病やリンパ腫を高頻度で発症し、患者から樹立された繊維芽細胞 (GM07166VA7 細胞) は DNA 相同組換え修復活性が低下し、染色体異常が観察された。*NBS1* 蛋白質はヒト RAD50 および Mre11 蛋白質と細胞核内で複合体を形成し相同組換え修復に関係していることが明らかにされた。この *NBS1* は主に 2 つの機能的領域に分かれている。C 末端側領域は DNA 修復因子 MRE11, リン酸化酵素 ATM の結合モチーフを有した領域であり、もう一方の N 末端側領域は FHA (フォークヘッド相同性関連) ドメインと BRCT (BRCA1 カルボキシル末端) ドメイン 2 種類のドメインからなり、ATM によるリン酸化依存的にタンパク質間相互作用を仲介する領域であることが知られている (図-1)。



図-1 *NBS1* のドメイン構造および I171V 型変異の位置

NBS1 の N 末端近傍の BRCT ドメインに位置する 171 番目のイソロイシンがバリンに変化するような I171V 変異 (生殖細胞変異) は若年性急性リンパ芽球系白血病の患者において最初に見出された。また白血病を高頻度で発症する再生不良性貧血を持つ患者において、I171V 変異をホモで持っていることが報告された。この患者の B 細胞ではナイミーヘン症候群の患者から樹立された繊維芽細胞と同様に DNA 相同組換え修復活性が低下し染色体不安定性が観察された。しかし、この患者の B 細胞の性質は I171V 型 *NBS1* が原因となっているのか不明であった。そこで、本研究では I171V 型 *NBS1* の機能解析を行うことを目的とした。また治療に関して相同組換え修復活性が低下した細胞に特異的に感受性を示す薬剤を見出すために、*NBS1* 変異細胞を相同組換え修復活性が低下し

た細胞のモデルとして用い、そのような特異性を示す薬剤を探索することを行った。

研究方法

1. I171V 型 NBS1 の機能解析：遺伝的バックグラウンドが同一な細胞で I171V 型 NBS1 が相同組換え修復活性低下に関与しているのか解析するため、GM07166VA7 細胞（NBS1 欠損細胞）に正常型および I171V 型 NBS1 遺伝子をそれぞれ導入し、電離放射線や薬剤（マイトマイシン C；MMC, PARP 阻害剤；AZD2281）に対する感受性をコロニーアッセイ法により解析した。さらに、相同組換え修復活性を定量的に測定するため DR-GFP をゲノムに挿入した細胞株を作成した。また、相同組換え修復のどのステップが異常を起しているのか数種類の相同組換え修復因子に対する抗体を利用した免疫染色法を用いて解析した。さらに、野生型 NBS1 と相互作用することが知られている相同組換え修復因子の中から I171V 型 NBS1 と相互作用が異常を起こす因子を免疫沈降法を用いて探索した。
2. I171V 型 NBS1 の頻度解析：I171V 型 NBS1 を持つ人がどの位の頻度で見つかるのか検証を行うため、健常人および乳癌患者各 1500 人程の血液 DNA を用いた塩基配列解析を行った。
3. 野生型 NBS1 と I171V 型 NBS1 を同量発現する細胞の解析：野生型および変異型 NBS1 をヘテロアレルに持つ細胞が見つからないため、正常型 NBS1 を発現している HeLa 細胞に Flag タグ付きの正常型あるいは I171V 型 NBS1 遺伝子を導入し、内在性の正常型 NBS1 と同量の Flag タグ付きの NBS1 を発現する細胞株を作成し、野生型および変異型 NBS1 をヘテロアレルに持つ細胞を模倣した細胞株を樹立した。これら細胞株を用いて電離放射線や薬剤（マイトマイシン C；MMC, PARP 阻害剤；AZD2281）に対する感受性をコロニーアッセイ法により解析した。さらに、相同組換え修復のステップに異常が現れるのか数種類の相同組換え修復因子に対する抗体を利用した免疫染色法を用いて解析した。また、I171V 型 NBS1 が染色体不安定性の要因になっているのかを明らかにするために、上記作製した細胞株に放射線を照射し、二本鎖 DNA 切断誘発後の染色体異常をギムザ染色法により解析した。
4. 相同組換え修復活性低下細胞に効果を示す薬剤の解析：相同組換え修復活性低下細胞に効果を示す薬剤を探索するため、GM07166VA7 細胞およびそれに I171V 型 NBS1 を発現させたもの、HCC1937 細胞に数種類の薬剤を投与し、正常型 NBS1 を戻した細胞との感受性が大きく違う薬剤を探索した。

実験結果と考察

1. I171V 型 NBS1 の機能解析：野生型 NBS1 を発現回復させた GM07166VA7（NBS1 欠損）細胞は電離放射線や薬剤に対してベクターのみを発現させた細胞と比較して約 10 倍の耐性を示し、正常な繊維芽細胞と同程度の耐性を示すことがわかった。一方、I171V 型 NBS1 を発現している細胞では電離放射線や薬剤に対してベクターのみを発現させた GM07166VA7 細胞と同程度の感受性が見られ、I171V 型 NBS1 では相同組換え修復活性が低下していることが示唆された（図 2-左図）。そこで、I171V 型 NBS1 では相同組換え修

復活性が低下していることを証明するため相同組換え修復活性を定量的に測定可能な DR-GFP 解析を行った。その結果、野生型 NBS1 を発現回復させた GM07166VA7 細胞は高い相同組換え修復活性が検出されたが、I171V 型 NBS1 を発現している細胞では殆ど検出されなかった (図 2-右図)。これらの解析結果から、I171V 型 NBS1 では相同組換え修復活性が低下していることがわかり、I171V 型 NBS1 はこれまで報告のある若年性急性リンパ芽球系白血病や再生不良性貧血の原因の一つになっていることが示唆された。

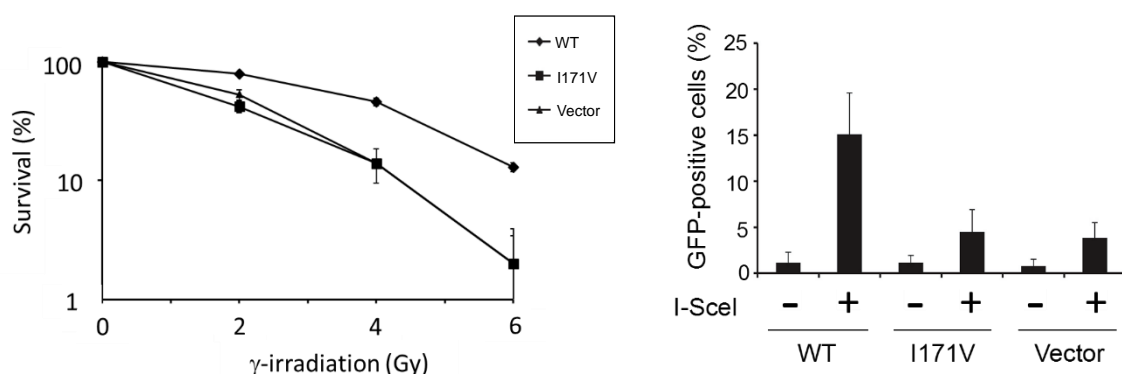


図-2 I171V 型 NBS1 を発現する細胞での電離放射線への感受性 (左図) 及び相同組換え修復活性 (右図)

I171V 型 NBS1 では相同組換え修復のどのステップが異常を起こしているのか解析を行った。NBS1 は核内で MRE11 および RAD50 と蛋白質複合体 (MRN 複合体) を形成して働くことが知られているので、I171V 型 NBS1 は MRE11 および RAD50 との蛋白質複合体形成能を検証したが野生型 NBS1 と同程度に MRN 複合体を形成することがわかった。次に、NBS1 は 2 本鎖 DNA 切断部位を認識して局在することが知られているので、電離放射線を細胞に照射することで 2 本鎖 DNA 切断を誘発しその部位への局在能力を検証したところ、I171V 型 NBS1 は 2 本鎖 DNA 切断部位に殆ど局在しないことがわかった。この結果から、I171V 型 NBS1 は 2 本鎖 DNA 切断部位に局在できないことが原因で相同組換え修復活性が低下していることがわかった。

次に、I171V 型 NBS1 が 2 本鎖 DNA 切断部位に局在できない原因に関して調べた。NBS1 は多くの蛋白質と相互作用をしながら 2 本鎖 DNA 切断部位に局在することが知られていることから I171V 型 NBS1 はそれら蛋白質との相互作用が低下している可能性が予想された。そこで、NBS1 と相互作用することが知られている複数の蛋白質との相互作用を免疫沈降法を用いて調べたところ、MDC1 との相互作用が減少していることがわかった。また MRN 複合体が 2 本鎖 DNA 切断部位にリクルートされて起こる (MRN 複合体の持つ DNA ヌクレアーゼ活性によって形成される) ssDNA による RPA32 の集積も減少していることが免疫染色から確認できた。これらのことから I171V 型 NBS1 では MDC1 との相互作用が低下することにより NBS1 が 2 本鎖 DNA 切断部位に集積できなくなり、MRN 複合体が 5' 末端を消化することによる ssDNA の形成が起きなくなり相同組換え修復活性が低下し

ていると考えられた。

2. I171V 型 NBS1 の頻度解析 : I171V 型 NBS1 変異を持つ頻度は健常人では 0.5%、乳がん患者では 1.5%であった。この結果から、I171V 型 NBS1 変異は日本人の乳がん罹患性と相関している可能性が強く示唆された。しかし、これら変異型を持つ人の頻度が低いことから、人数をさらに増やして解析する必要があると思われる。

3. 野生型 NBS1 と I171V 型 NBS1 を同量発現する細胞の解析:乳がん患者に I171V 型 NBS1 変異をヘテロに持つ人が偏っていることから、I171V 型 NBS1 の機能低下がこれら患者の相同組換え修復活性に影響を与えていることが予想された。そこで、正常型 NBS1 を発現している HeLa 細胞に正常型あるいは I171V 型 NBS1 遺伝子を導入し、内在性の正常型 NBS1 と同量の NBS1 を発現する細胞株を作成し、野生型および変異型 NBS1 をヘテロアレルに持つ細胞を模倣した細胞株を樹立した。これら細胞株を用いて解析を行ったところ、正常型と I171V 型両方を同量発現している細胞では正常型 NBS1 のみを発現している細胞に比べて電離放射線および各種薬剤に対して高い感受性が見られ(図 3-左図)、また、染色体異常が誘発されることがわかった(図 3-右図)。これらの解析結果から、I171V 型 NBS1 をヘテロアレルで持つ場合でもホモアレルで持つ場合と同様に DNA 相同組換え修復活性が低下していることが予想された。

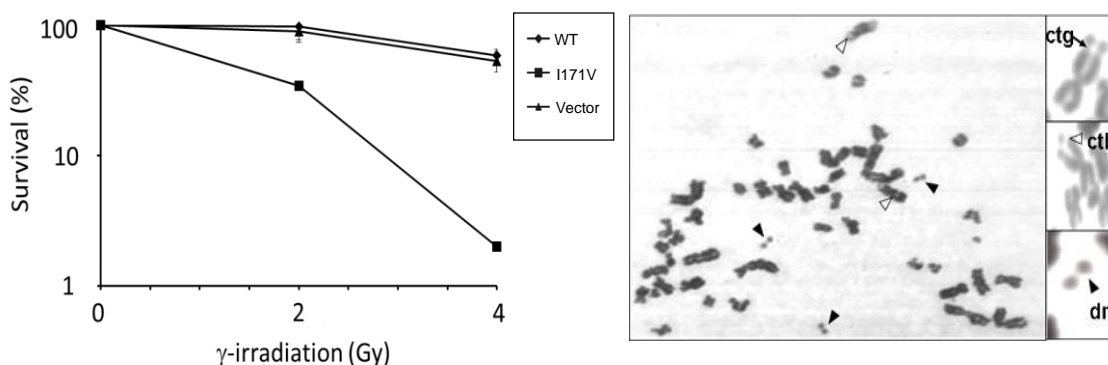


図-3 I171V 型 NBS1 ヘテロな状態を模倣した細胞での電離放射線への感受性(左図)及びギムザ染色(右図; 代表的な染色体像)。

4. 相同組換え修復活性低下細胞に効果を示す薬剤の解析 : GM07166VA7 細胞およびそれに I171V 型 NBS1 を発現させたもので特異的に感受性を示す薬剤として主に一本鎖切断修復で働く PARP1 の阻害剤である AZD2281 が効果を示した。また 26S プロテアソーム阻害剤である Bortezomib が効果を示すことを新たに見いだした。これらの薬剤は BRCA1 が異常で相同組換え修復活性が低下している HCC1937 細胞に対しても効果を示した。さらにそれらの併用は相乗的な効果を示しこれらの細胞に高い特異性を示した。これらのことから HR 修復能力が低下した細胞に対して用いることができる薬剤として、AZD2281 と Bortezomib の併用が高い効果を示す可能性が示唆された。