

# 論文審査の結果の要旨

氏名 山本 悠貴

本論文はヒト *NBS1* の I171V 型塩基多型における相同組換え修復機能異常、その分子メカニズム、染色体不安定性の増加や乳がんのリスク増大との関連についての研究成果をまとめたものである。以下にその概略を述べる。

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。*NBS1* 遺伝子はこの DNA 相同組換え修復に重要な因子であることが知られていた。その *NBS1* の 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、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 DNA 相同組換え修復機能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。

まず遺伝的バックグラウンドが同一な細胞で I171V 型 *NBS1* が相同組換え修復機能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、DNA 損傷に対する感受性をコロニーアッセイ法により解析した。その結果 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機能が低下していることが示唆された。そこで、相同組換え修復機能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相同組換え修復レポーターアッセイを行った所、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機能が検出されたが、I171V 型 *NBS1* を発現している細胞では殆ど検出されなかった。これらの解析結果から、I171V 型 *NBS1* では相同組換え修復機能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。

そこで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免疫沈降法、染色法により解析した所、I171V 型 *NBS1* では DNA 修復因子 MRE11、RAD50 と野生型 *NBS1* と同様に相互作用し複合体を形成する段階は正常であった。しかしながら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機能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* の損傷部位への集積に必要で 171 番目のアミノ酸部位に相互作用ドメインを持つ MDC1 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。また免疫染色法ではその細胞内での共局在が I171V 型ではほとんど見られなかった。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って NBS1 が 2 本鎖 DNA 切断部位に集積できなくなり、相同組換え修復機能が低下していると考えられた。

また 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。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。

解析を行った乳がん患者に 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 をヘテロアル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、また、染色体異常が誘発されることがわかった。これらの解析結果から、I171V 型 NBS1 をヘテロアルルで持つ場合でもホモアルルで持つ場合と同様に DNA 相同組換え修復機能が低下していることが予想された。

さらにこれらの相同組換え修復機能低下細胞に効果を示す薬剤を探索するため、GM07166VA7 細胞に正常型、I171N 型 NBS1、コントロールベクターを発現させたものにおいて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。その結果これら NBS1 異常細胞が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 および 26S プロテアソーム阻害剤である Bortezomib が見いだされた。またそれらの併用により NBS1 異常細胞はさらに特異的な感受性を示した。また NBS1 異常細胞と同様に相同組換え修復機能が低下した BRCA1 異常細胞である HCC1937 細胞もこのような Bortezomib およびその AZD2281 との併用に感受性を示した。これらから両薬剤の併用が相同組換え修復機能が低下したがん細胞の増殖を抑制する可能性が示された。

本研究における研究成果として I171V 型 NBS1 におけるがんのリスク増大との関連およびその背景に相同組み換え修復機能の異常が存在することが示唆された。また AZD2281 と Bortezomib の併用がそのような相同組み換え修復能力が低下したがん細胞の増殖を抑制する可能性が示された。これらの研究成果から I171V 型 NBS1 のがんのリスク増大への関与、および分子メカニズム、効果を示す薬剤についての情報が得られ、そのがんの予防、治療への応用が期待される。したがって、博士(医科学)の学位を授与できると認める。