

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

黒田 貴子

専攻分野：外科学

コース：乳腺・内分泌外科

指導教授：津川 浩一郎

主論文の題目：

Doxycyclin 誘導性 ER $\alpha$  陽性 BRCA1 枯渇ヒト乳腺細胞の樹立

共著者：

岡田 麻衣子、津川 浩一郎、太田 智彦

### 緒言

Breast and ovarian cancer susceptibility gene 1(BRCA1) 遺伝子の生殖細胞系列変異は家族性乳癌および卵巣癌の主要因の一つである。BRCA1 変異によって生じる癌の特徴は、乳房と卵巣のみに発症するという臓器特異性であるが、その発癌機序は解明されていない。古くよりエストロゲンとの関連が示唆されていたが、BRCA1 機能不全によって発症する Basal-like 型乳癌は、一般にエストロゲンレセプター(ER $\alpha$ )陰性の乳癌である。また、卵巣はエストロゲンの産生臓器であるが、標的臓器ではなく、ER $\alpha$ の発現も低い。しかし最近になって、Basal-like 乳癌の発生母地は ER $\alpha$  陽性の乳腺上皮管腔前駆細胞由来であることが示されている。また、予防的卵巣付属器切除検体の病理所見から、これまで卵巣癌と考えられていた癌は、卵管より発生する可能性が指摘された。ヒト卵管上皮は ER $\alpha$  が陽性であることから、BRCA1 枯渇によって発生する

癌はエストロゲンと関連するという仮説が成り立つ。BRCA1 の主要な機能は遺伝子の恒常性維持であり、DNA 二本鎖切断をエラーなく修復するための相同組替え修復に必須の役割を果たす。したがって、BRCA1 不全による遺伝子不安定性を促進することに ER $\alpha$  が関与していると予想される。これを解明する手法の1つとして ER $\alpha$  陽性細胞株を用いた解析が有用と考えられるが、現在乳腺においては株化された ER $\alpha$  陽性二倍体細胞は存在しない。そこで、本研究では遺伝子工学的手法を用いて doxycyclin (Dox) による tet-off と tet-on システムを利用した ER $\alpha$  陽性 BRCA1 枯渇のヒト乳腺細胞を樹立した。

#### 方法・対象

BRCA1 の発現を抑制する至適 shRNA 配列を決定するために、4 種の BRCA1 に対する siRNA およびコントロール siRNA をトランスフェクションし、ウェスタンブロット法で発現を確認した。蛋白質の細胞内局在は蛍光免疫染色法、mRNA の発現は RT-qPCR、細胞増殖能は Cell-titer blue 法にて解析した。

ER $\alpha$  陰性の正常乳腺細胞株である MCF10A を用いて、Dox 誘導性 BRCA1 枯渇細胞を作成した。BRCA1 に対する shRNA 配列をエンタリーベクターにサブクローニングし、Gateway 法にて CS-RfA-ETBsd-shBRCA1 レンチウイルスベクターを作成した。Lenti-X 293T 細胞より調整したレンチウイルスを MCF10A 細胞に感染後、Blasticidin で選択して MCF10A-Dox-shBRCA1 細胞株を樹立した。

同様に、CSIV-TRE-Rfa-Ubc-puro- ER $\alpha$  由来レンチウイルスを作成し、Puromycin の選択下で Dox 誘導性に ER $\alpha$  を発現する MCF10A-Dox-ER $\alpha$  細胞を樹立した。

さらに MCF10A-Dox- ER $\alpha$  細胞に CS-RfA-ETBsd-shBRCA1 由来レンチウイルスを感染後、Blasticidin と Puromycin の両抗生剤選択下で MCF10A-Dox- ER $\alpha$ -shBRCA1 細胞を樹立した。

#### 結果

4 種の BRCA1 に対する siRNA およびコントロール siRNA をトランスフェクションし、ウェスタンブロットで発現を確認したところ、No. 11 と No.12 で BRCA1 の発現抑制が得られた。このうち No. 12 の配列を shRNA の配列に用いて Dox 誘導性 BRCA1 枯渇細胞の樹立を行った。

ウェスタンブロット解析にて、Dox 誘導性 BRCA1 枯渇細胞が Dox の濃度依存的に BRCA1 が抑制することを確認した。

また、Dox 誘導性 ER $\alpha$  発現細胞において、Dox の添加により ER $\alpha$  が発現することをウェスタンブロット解析により確認した。更に、蛍光免疫染色法により、発現した ER $\alpha$  の核内局在が観察された。ER $\alpha$  の標的遺

伝子である *hFOS* の発現を RT-qPCR にて解析した。その結果、MCF10A 細胞に比べて、MCF10A-Dox-ER $\alpha$  で *hFOS* 遺伝子の mRNA の発現亢進が確認された。

更に、Dox 誘導性 ER $\alpha$  発現 BRCA1 枯渇細胞においても Dox 添加により BRCA1 の発現が低下すると同時に ER $\alpha$  が発現することを確認した。

最後に、細胞増殖能を指標として、BRCA1 枯渇時における ER $\alpha$  の影響を検討した。MCF10A-Dox-ER $\alpha$ -shBRCA1 細胞では MCF10A-Dox-shBRCA1 に比べて顕著な細胞数の低下を認めた。これらの結果から、外因性蛋白が非特異的に細胞増殖を抑制する可能性は残るものの、BRCA1 が機能しない細胞においては ER $\alpha$  によって細胞増殖の抑制または細胞死の増加が起こる可能性が示唆された。

### 考察

本研究結果において、BRCA1 が正常に発現している細胞では Dox 添加による ER $\alpha$  の発現は細胞増殖にほとんど影響を与えなかったのに対して、BRCA1 枯渇細胞では ER $\alpha$  の発現によって顕著な細胞数の低下が観察された。一般に BRCA1 が機能しない細胞では、DNA 複製や転写の際に自然発生する DNA 損傷の修復が完全に行えないことから、MCF10A 細胞のように野生型 *TP53* を有する細胞ではチェックポイント機能により G1-S 期進行の遅れを引き起こす。一時的に細胞の増殖は低下するが、ゲノム不安定性の結果、一部の細胞から癌化が生じる。BRCA1 枯渇 ER $\alpha$  発現細胞においては、ER $\alpha$  の発現に起因する付加的な DNA 損傷が生じた結果、それを処理することができず、G1-S 期進行のさらなる遅延あるいはアポトーシスの亢進を来した可能性が考えられる。今後、本研究で作成した細胞株を用いて ER $\alpha$  に起因するゲノム不安定性の機序について検討していく予定である。

### 結論

本研究ではレンチウイルスベクターを用いて、tet-off および tet-on 技術による Dox 誘導で ER $\alpha$  の発現と同時に BRCA1 が枯渇するヒト正常乳腺細胞を樹立した。この細胞は BRCA1 機能低下における ER $\alpha$  依存的な DNA 損傷およびゲノム不安定の解析に有用であると考えられる。