

悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異と DNA 修復に関する研究

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学部 部長 関戸好孝

同 リサーチレジデント 羽切周平

悪性中皮腫は極めて難治性であり、現在、有効な治療法はない。上皮成長因子受容体 (EGFR) などに代表される活性型がん遺伝子の変異は稀であり、チロシンキナーゼ阻害剤の分子標的剤などもほとんど有効性を示さない。悪性中皮腫におけるがん抑制遺伝子異常として CDKN2A (p16^{INK4a}-ARF) および NF2 の高頻度の不活性化変異が知られているが、最近、染色体 3 番短腕に局在する BRCA1 associated protein 1 (BAP1) 遺伝子が中皮腫の約 25% に不活性化変異が認められることが報告された。BAP1 遺伝子は脱ユビキチン化酵素をコードし、ヒストン 2A の脱ユビキチン化を促進してクロマチンリモデリングを誘導することにより、多くの遺伝子の転写調節をしていることが示唆されている。さらに最近、BAP1 が DNA 損傷の修復、特に細胞にとって極めて重大な損傷である DNA の 2 重鎖切断の修復 (特に相同組換えによる修復) に関与していることも報告された。本研究では、中皮腫細胞における BAP1 の腫瘍抑制機能を明らかにし、BAP1 遺伝子異常の有無に基づく中皮腫細胞の放射線による DNA 障害・細胞障害に対する反応の違いを明らかにすることを目的とした。

愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部で樹立された 19 株の悪性中皮腫細胞株を用い、BAP1 遺伝子変異を検討したところ 5 株 (26%) において不活性化変異が検出された。海外共同研究者から提供を受けた 7 細胞株においては 2 株において、報告されている同一の遺伝子変異を確認した。合計 26 株中 7 株 (27%) に BAP1 遺伝子変異が認められた。

Immunocytochemistry 解析により BAP1 の細胞内局在を検討した。BAP1 野生型である NCI-H290 株では BAP1 蛋白は細胞核内に局在した。一方、C 末端側が欠失した BAP1 変異型 (F679LfsX37) では細胞質内に優位に BAP1 蛋白が局在した。さらに、BAP1 発現ベクターを作成し、BAP1 遺伝子がホモザイガス欠失している細胞株 (Y-MESO-25) に導入して細胞内局在を検討した。発現ベクターは野生型 BAP1、および変異型 BAP1 は同定された変異の内から 3 種類 (A95D, Y724X, F679fsX37 : アルファベット大文字はアミノ酸、数字はアミノ酸の位置を示す) を作成した。その結果、野生型 BAP1 は核内優位の局在を示したが、A95D, Y724X, F679LfsX37 の順に細胞質局在が優位になることが明らかとなった。

これらの BAP1 発現ベクターを導入し、BAP1 ホモザイガス欠失細胞株 (Y-MESO-25) に対する細胞増殖抑制能を検討した。カロリメトリックアッセイでは、野生型 BAP1 は約 50%、変異型 (Y724X) では 20%の増殖抑制効果が認められたが、A95D, F679LfsX37 では有意な細胞増殖抑制効果は観察されなかった。さらに、足場非依存性のコロニー形成能を観察したところ、野生型のみ約 50%の抑制効果が観察されたが 3 種類の変異型では有意な抑制効果は観察されなかった。

DNA 障害に対する BAP1 の活性化(リン酸化)を検討するために、不死化中皮細胞株 MeT-5A に対して放射線照射を行ったところ、5Gy 以上で有意なリン酸化 (p-S592) が観察された。リン酸化は照射 1 時間後がピークであり、その後、リン酸化レベルは漸減した。同様に、BAP1 ホモザイガス欠失細胞株 (Y-MESO-25) に野生型および変異型 BAP1 を導入して放射線照射を行ったところ、野生型では細胞核内に強いリン酸化が、また、変異型でも BAP1 のリン酸化の促進が認められた。次に、Y-MESO-25 細胞株に放射線照射を行い、中皮腫細胞の生存能を検討した。その結果、親株に比べ、野生型 BAP1 導入時においてその生存能が有意に回復したが、Y724X 変異体の導入でも生存能の一部回復が認められた。

BAP1 は最初、BRCA1 に結合する蛋白としてクローニングされたが、BAP1 と BRCA1 の機能的な連携に関しては、未だ不明な点が多い。合計 26 細胞株での BRCA1 蛋白発現を検討したところ、有意差は認められなかったものの BAP1 遺伝子変異を有する細胞株において BRCA1 蛋白発現の低下が観察された。これらの細胞株の RT-PCR 解析では有意な BAP1-mRNA 発現低下は認められず翻訳後の分解亢進が示唆されたため、MG132 (プロテアゾーム阻害剤) を投与したところ BRCA1 蛋白レベルの回復が認められた。さらに、BAP1 ホモザイガス欠失細胞株 (Y-MESO-25) に BAP1 を導入したところ、野生型 BAP1 において BRCA1 蛋白レベルが回復したのみならず、変異型 BAP1 でも BRCA1 蛋白レベルの回復が認められた。これらの結果は、BAP1 が BRCA1 の安定化に寄与していることを強く示唆した。

以上の検討により、BAP1 は中皮腫細胞に対して腫瘍抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、一部の変異型ではその機能が完全に失活せず、弱いながら腫瘍抑制効果を有することも明らかになった。一方、放射線照射による DNA 損傷時には、BAP1 は DNA 修復・細胞生存に寄与すると考えられるため、この点では BAP1 は中皮腫細胞に対して cell survival に働くものと考えられた。本研究結果により、悪性中皮腫細胞は BAP1 遺伝子の変異の有無により、治療法 (特に、DNA 修復に関与する分子標的薬や放射線) に対して異なる反応を示すことが強く示唆され、今後の治療法の開発に対して有用な知見になり得るものと考えられた。