

主論文の要旨

**Functional differences between wild-type and
mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor
suppressor against malignant mesothelioma cells**

〔 悪性中皮腫細胞に対する野生型と
変異型 BAP1 癌抑制遺伝子の機能的差異 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 呼吸器外科学分野

(指導：横井 香平 教授)

羽切 周平

【諸言】

悪性中皮腫はアスベスト使用と共に増加した悪性新生物で、多くの患者で化学療法や放射線療法に抵抗性を示し、外科切除を含む集学的治療を施行しても根治困難な場合が多い。そのため悪性中皮腫患者における診断後の生存期間中央値は 7-12 か月と報告され、現在でも依然として予後不良な疾患である。

悪性中皮腫では *CDKN2A*、*NF2* の不活性化遺伝子異常が高頻度に特定され、特に *NF2* は Hippo シグナル経路の調節に関わることが近年報告され注目されている。その他悪性中皮腫における遺伝子異常として関心が示されているのが 1998 年に Jensen らによって同定された *BRCA1-associated protein 1 (BAP1)* で、これはクロモソーム 3 番短腕に存在する癌抑制遺伝子で、白人の悪性中皮腫患者の約 25% にその変異が認められると報告されている。その後の研究により、ブドウ膜メラノーマや腎細胞癌などいくつかの癌腫でも *BAP1* 不活化変異が確認されている。

BAP1 タンパクは脱ユビキチン化酵素として作用し、癌抑制に関わる主に 3 つの経路に関連する：① *HCF1* と複合体を形成して転写因子として転写促進に作用、② *PR-DUB* 複合体の一つとして遺伝子発現を抑制、③ *BRCA1* など相同性修復因子の一つとして二本鎖 DNA 修復に関与すると報告されているが、DNA 修復に関して詳細はまだ明らかになっていない。

今回我々は、日本人の悪性中皮腫患者から細胞株を樹立し、それらの細胞株を用いて *BAP1* 遺伝子変異の詳細を明らかにした。さらに *BAP1* タンパクの細胞局在や細胞増殖調整、または放射線照射による細胞障害に対する反応について、*BAP1* 野生型と変異型の機能的差異を検証した。

【方法】

日本人由来の悪性胸膜中皮腫から樹立した 19 細胞株中 5 株 (26%) で *BAP1* 遺伝子変異を認め、*BAP1* 野生型と変異型における腫瘍抑制能や放射線感受性の違いを検討した (Table.1)。

【結果】

樹立した細胞株における遺伝子変異は、ACC-MESO-4 で nonsense-mutation、Y-MESO-9 と Y-MESO-14 で truncatig-mutation、そして Y-MESO-61 で insertion-mutation を確認した (Fig.1)。それ以外にも我々の以前の研究において Y-MESO-25 のクロモソーム 3 番短腕におけるホモザイガス欠失を確認しており、*BAP1* では C 末端側 Exon13-17 が欠損していることを今回 genomic-PCR で改めて確認した。

BAP1 の C 末端に特異的な抗体を用いた Western-blot 分析にてタンパクレベルで *BAP1* 不活化変異を確認したところ、NCI-H28、Y-MESO-14、Y-MESO-25、Y-MESO-61 で band を確認できず、NCI-H2452、ACC-MESO-4 では非常に微弱な band を検出し、さらに Y-MESO-9 では short-size band を確認した。

次に内因性 BAP1 タンパクの細胞内局在を免疫蛍光染色分析で確認すると、野生型 BAP1 (NCI-H290) では主に核局在を示し、Nuclear Localization Signal (NLS) が欠損した変異型 BAP1 (Y-MESO-9) では主に細胞質局在を示した。また *BAP1*-3' 末端側が大きくホモザイガス欠失した BAP1 欠損細胞株 (Y-MESO-25) に野生型 BAP1 ベクターを導入すると、細胞増殖と足場非依存性増殖を有意に抑制した。一方で変異型 BAP1 導入細胞株では、増殖抑制効果はごく微弱であった。

さらに BAP1 の DNA 修復への関与を調べるため、悪性中皮腫細胞株に X 線を照射して DNA ダメージを惹起し、BAP1 が DNA 損傷修復にどのように関わるかを検証した。BAP1 は X 線照射 1 時間後よりリン酸化 BAP1 レベルが増加し、また X 線照射量に応じて BAP1 リン酸化レベルが上昇することが明らかになり、また N/C 分画分析で BAP1 野生型は total-BAP1 もリン酸化 BAP1 も核局在を示すが、BAP1 変異型では total-BAP1 は細胞質局在だがリン酸化されると核局在を示すことが判明した。このことから、BAP1 変異型でもリン酸化 BAP1 は核にある程度は存在しており、DNA 修復に関与できると思われた。

最後に重要な DNA 修復因子であり BAP1 との相互作用が報告されている BRCA1 タンパクについて検討した。BAP1 変異細胞株では BRCA1 は mRNA レベルで減少は認めなかったが、タンパクレベルで減少している割合が多いことが確認された。さらに BAP1 欠損細胞株に野生型あるいは変異型 BAP1 を導入すると減少していた BRCA1 タンパクの発現量が増加すること、また BAP1 欠損細胞株では MG132 (プロテアーゼ阻害剤) を加えた場合も BRCA1 タンパク発現量が増加することが明らかになった (Fig.2)。これらより詳しい機序は不明だが、BAP1 が BRCA1 のプロテアーゼ分解を抑制している可能性が示唆された。さらに X 線照射後の細胞生存率を調べたところ、BAP1 欠損細胞株と比較して BAP1 野生型導入株と変異型導入株で有意に生存率が改善を認めた (Fig.3)。

【考察】

我々の研究では 25 細胞株のうち 7 株 (28%) で BAP1 不活性化変異を認め、この結果は Bott らの結果と矛盾しなかった。また、Ventii らは BAP1 の NLS が腫瘍抑制に重要であると報告しているが、本研究でも NLS が欠損した BAP1 変異細胞株 (F679Lfs) が主に細胞質に局在し、野生型と比較して細胞増殖抑制効果が劣っていることが示された。その他に BAP1 の存在が BRCA1 発現量の回復に関わることが明らかになったが、その結果から BAP1 が BRCA1 タンパクの安定化を通して DNA 修復に関与していること、また変異型 BAP1 でも変異形態によっては DNA 修復機能がある程度保持される可能性が示唆された。

【結論】

本研究において、野生型だけでなく変異型 BAP1 でも細胞増殖抑制効果や DNA 修復活性を変異形態によって様々なレベルで示すことが判明した。以上より、BAP1 は

悪性中皮腫における重要な癌抑制遺伝子であり、また変異形態を調べることで治療感受性を推測でき、悪性中皮腫の治療戦略構築に貢献すると思われる。