

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013027

研究課題名（和文） 乳腺発がん機構における BRCA1、BRCA2 遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of BRCA1 and BRCA2 on the mechanism of breast carcinogenesis.

研究代表者

三木 義男 (MIKI YOSHIO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：10281594

研究成果の概要（和文）：遺伝性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA1、BRCA2 の機能解析は、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。BRCA2 は、細胞周期の S 期に DNA 修復に関与する。また、細胞周期の G1/S 移行期から M 期前期にかけて中心体の周りを取り巻く様に局在する。細胞質分裂に入ると、BRCA2 はミッドボディに局在する。そこで、細胞周期の各時期における役割を明らかにして、BRCA2 が乳癌の発症にどのように寄与しているのが解明した。

研究成果の概要（英文）：When we elucidate the molecular mechanism of breast oncogenesis, the functional analysis of BRCA1 and BRCA2 which are responsible protein for hereditary breast cancer is indispensable. BRCA2 functions in DNA damage repair at S phase, and is localized, surrounding around centrosome from the G1/S transition to the early M phase of the cell cycle. When the cytokinesis begins, BRCA2 is localized in the mid-body. Therefore, we tried to clarify the role of BRCA2 protein, and find out how BRCA2 contributes to incidence of breast cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	10,700,000	0	10,700,000
2006 年度	10,700,000	0	10,700,000
2007 年度	10,700,000	0	10,700,000
2008 年度	10,700,000	0	10,700,000
2009 年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	53,500,000	0	53,500,000

研究分野：分子医学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：乳腺発がん、BRCA1、BRCA2、DNA 損傷修復、中心体制御、細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

BRCA1、BRCA2 は遺伝性乳がんの原因遺伝子であり、これらは二本鎖切断された DNA を修復する機能を通してゲノムの安定性維持に関与する。BRCA1 は、BARD1、あるいは EMSY と複合体を形成し転写調節因子として機能

し、他の遺伝子の転写調節を行うことにより細胞周期のコントロールやアポトーシスの制御などを行っていることが示唆されている。また、他の因子と共にゲノム中に二本鎖切断が起きている場所を認識するセンサーの働きを担っていると考えられている。

BRCA2はPALB2などの因子と複合体を形成し、二本鎖切断されたDNAを組換え修復する機構に関与している。近年、BRCA1、BRCA2とFanconi貧血(Fanconi anemia, FA)遺伝子の関連が明らかになり、FA/BRCA pathwayという概念が提唱され注目を集めている。Breast cancer syndromeはBRCA2のheterozygous germ-line mutation、FAはhomozygous germ-line mutationによって引き起こされるという違いが、結果的には2つの大きく異なる病態を生み出し、Breast cancer pathwayとFanconi pathwayという機能的には異なるpathwayの存在を考え解明を進める必要がある。しかし、BRCA2-PALB2は、Breast cancer syndrome家系におけるmutationが報告されているが、Fanconi pathwayへの機能的関与も示唆されており今後の研究が待たれる。そこで、更なるBRCA1、BRCA2関連因子を単離し、それら因子とBRCA1、BRCA2の相互作用の生理的意義を実験的に検証することによってBRCA1、BRCA2のゲノムの安定化を中心としたbreast cancer pathwayにおける機能を解析し、乳腺がんの分子機構を解明することが要求されている。

2. 研究の目的

遺伝性乳癌の原因遺伝子産物であるBRCA2タンパク質は、細胞周期のS期に核内でRad51と結合してDNA修復に関与する。最近、この結合解離がM期エントリーへの引き金として働くことが報告されて、BRCA2はDNA修復と細胞周期のM期進行を調整する機能をもつことが示唆された。また、BRCA2は細胞周期のG1/S移行期からM期前期にかけて中心体の周りを取り巻く様に局在する。中心体は、M期中期では紡錘体極に位置し、この時期になるとBRCA2は中心体で観察されなくなる。細胞周期がさらに進行して細胞質分裂に入ると、BRCA2は母・娘細胞の間に形成されるミッドボディに局在する。ところが、中心体、ミッドボディにおけるBRCA2の生理的役割については十分明らかにされていない。そこで本研究では、BRCA2タンパク質の機能解析からその役割を明らかにして、BRCA2が乳癌の発症にどのように寄与しているのか解明することを目的とする。乳癌は二本鎖DNA切断修復機構に関与するBRCA1、BRCA2遺伝子の異状により発生し、この両分子によって担われる情報伝達の流れの解明は、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。

3. 研究の方法

(1) 中心体におけるBRCA2機能の解析

細胞の中心体分画を収集し、免疫沈降法、グリセロール密度勾配遠心法の組み合わせ、あるいは蛍光免疫染色法により、BRCA2タンパク質の検出を行なう。さらに高感度MSにより、

検出されたBRCA2複合体構成分子を同定する。BRCA2タンパク質は3418個のアミノ酸から成る巨大な分子で細胞内での強制発現、蛋白精製、ウェスタンブロット解析等も困難であったが諸条件の検討をくり返しそのシステムを確立した。siRNAの導入によるRNAi法により乳がん細胞株のBRCA1、BRCA2あるいは同定した新規結合分子の機能を抑制し、標的タンパク質発現阻害下における発現プロファイルをcDNA microarrayにより解析する。また、発現ベクターを細胞内に導入することによりsiRNAがstableに発現するクローンを作製することが可能となり、遺伝子サイレンシングの早期の変化のみならず、長期経過後の機能変化もとらえることが可能である。

単離された分子については、中心体制御に関連する機能を解析する。中心体の制御に関わる機能にはリン酸化BRCA2タンパク質の関与を明らかにしており、修飾、特にリン酸化について、電気泳動にて分離・精製後、LC-MSにより修飾部位を決定する。さらに分裂期キナーゼ群との機能的相関を解明し、細胞分裂を進める中心的分子およびその機能ネットワークとの関わりを理解し、細胞分裂におけるBRCA2の系統的役割を検討する計画である。また、共焦点顕微鏡、タイムラプスの組み合わせで中心体の高精度細胞生物学的観察を行う。

(2) CytokinesisにおけるBRCA2機能の解析を行う。使用する解析手法は項目(1)で使用するものと同じである。

(3) 乳癌原因遺伝子BRCA2に結合する新規分子の探索によるDNA損傷修復機構の解明
BRCA2遺伝子産物はタンパク質間相互作用部位を複数持つ巨大分子であり、その発症における分子機構を理解するには当分子のみに留まらず相互作用する他分子がその機能に関与している可能性を考えなければならない。これら関連遺伝子を含めた系統的な機能ネットワークを解明するために、BRCA2に新規に結合する遺伝子産物の探索を行なう。

4. 研究成果

(1) BRCA2はPlectinとともに中心体の局在を制御する

今回我々は、BRCA2の新規機能を調べるため、グリセロール密度勾配遠心法を用いてBRCA2と相互作用する新規タンパク質の探索を試みた。その結果、Plectinが同定され、BRCA2-plectin複合体が中心体の局在制御に関与している可能性が示唆された。Plectinは細胞骨格系タンパク質を架橋する他、核膜構成タンパク質とも相互作用する。Plectinをリン酸化させて、架橋構造を喪失させると、中心体は核から解離した。また、BRCA2-plectinの相互作用阻害やsiRNAによる両タンパク質の発現抑制によっても同様

の中心体局在変化が観察され、さらに核の形態異常も観察された。これらの結果より、BRCA2-plectin 複合体は中心体の局在制御において重要な役割を果たしていることが示唆された (Niwa T, et al. *Cancer Sci.* 2009)。

(2) BRCA2 の細胞質分裂での機能解析

我々は、*polo like kinase1* (Plk1) によってリン酸化された BRCA2 (S193) を認識する抗体を作製して、免疫染色にてその局在を観察した結果、BRCA2 が細胞質分裂の mid-body に局在することを明らかにした。siRNA によって BRCA2 の発現を抑制させると、mid-body の伸長化を生じて細胞質分裂時間の延長や分裂阻害が観察された。このように BRCA2 は、細胞質分裂への関与が報告されているが、その詳細は明らかにされていない。また、MCF7 細胞の cell lysate をグリセロール密度勾配遠心法によって分画して、BRCA2 と同じフラクションに存在するタンパク質を質量分析法によって解析した結果、ヒト非筋肉 II 型ミオシン (NMHC IIC) を同定した。NMHC IIC は、mid-body に局在して細胞質分裂に関与していることが報告されていることから、BRCA2 と NMHC IIC は、共存して細胞質分裂に関与していることが示唆された。そこで、両タンパク質の結合を明らかにして、さらに A549 細胞で siRNA によって BRCA2 および NMHC IIC の発現を抑制させた結果、mid-body の伸長化や形態異常、二核細胞の増加を検出した。以上ことから両タンパク質の細胞質分裂への関与は、癌細胞での多核化細胞の増加にも関与している可能性が示唆され、さらなる検討を行っている。

(3) BRCA2 に結合する新規分子の探索による DNA 損傷修復機構の解明

抗 BRCA2 抗体による共免疫沈降物の質量分析を行い、BRCA2 と相互作用する分子群を同定した。そこで、相同組換え効率を定量化できる DR-GFP 実験系を導入し、相互作用候補分子を siRNA を用いてノックダウンし相同組換え効率を測定した。これにより BRCA2 と同様に相同組換えに関与する相互作用分子を特定した。今後はこの分子の BRCA2 と協調した分子機能について詳細に検討を行なう。また、放射線により二重鎖切断を引き起こした細胞の核画分からの抗 BRCA2 抗体共免疫沈降物の質量分析を開始し、これらの遺伝子についても相同組換え効率の定量化を行なった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

(1) Takenaka, K. and Miki, Y. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the POLK gene in

vertebrates. *FEBS Lett*, 583, 661-4, 2009
(2) Liu, H., Hew, H.C., Lu, Z.G., Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. DNA damage signalling recruits RREB-1 to the p53 tumour suppressor promoter. *Biochem J*, 422, 543-51, 2009 *Corresponding author

(3) Lu, Z.G., Liu, H., Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. Protein kinase Cdelta activates RelA/p65 and nuclear factor-kappaB signaling in response to tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res*, 69, 5927-35, 2009 *Corresponding author
(4) Nihira, K., Ando, Y., Yamaguchi, T., Kagami, Y., Miki, Y. and Yoshida, K. (2009) Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ.* 2009

(5) Niwa, T., Saito, H., Imajoh-ohmi, S., Kaminishi, M., Seto, Y., Miki, Y.* and Nakanishi, A. (2009) BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. *Cancer Sci*, 100, 2115-25. *Corresponding author

(6) Taira, N., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. (2009) ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2009 [Epub ahead of print] *Corresponding author

(7) Tanaka K, Ebihara T, Kusubata M, Adachi E, Arai M, Kawaguchi N, Utsunomiya J, Miki Y, Hiramoto M, Hattori S, Irie S. Abnormal collagen deposition in fibromas from patient with juvenile hyaline fibromatosis. *J Dermatol Sci* 55(3): 197-200, 2009.

(8) Han, X., Saito, H., Miki, Y.,* and Nakanishi, A. A CRM1-mediated nuclear export signal governs cytoplasmic localization of BRCA2 and is essential for centrosomal localization of BRCA2. *Oncogene*, 27: 2969-77, 2008. *Corresponding author

(9) Hirai, Y., Banno, K., Suzuki, M., Ichikawa, Y., Udagawa, Y., Sugano, K., and Miki, Y. Molecular epidemiological and mutational analysis of DNA mismatch repair (MMR) genes in endometrial cancer patients with HNPCC-associated familial predisposition to cancer. *Cancer Sci*, 99: 1715-9, 2008.

(10) Isomura, M., Oya, N., Tachiiri, S., Kaneyasu, Y., Nishimura, Y., Akimoto, T., Hareyama, M., Sugita, T., Mitsuhashi, N., Yamashita, T., Aoki, M., Sai, H., Hirokawa, Y., Sakata, K., Karasawa, K., Tomida, A.,

Tsuruo, T., Miki, Y.,* Noda, T., and Hiraoka, M. IL12RB2 and ABCA1 genes are associated with susceptibility to radiation dermatitis. *Clin Cancer Res*, 14: 6683-9, 2008. *Corresponding author
(11) Kimura, J., Nguyen, S. T., Liu, H., Taira, N., Miki, Y.,* and Yoshida, K. A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res*, 36: 5250-9, 2008. *Corresponding author
(12) Komatsu, A., Nagasaki, K., Fujimori, M., Amano, J., and Miki, Y. Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer. *Int J Oncol*, 33: 261-70, 2008.
(13) Nagasaki, K., and Miki, Y. Molecular prediction of the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer*, 15: 117-20, 2008.
(14) Nihira, K., Taira, N., Miki, Y.,* and Yoshida, K. TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress. *Oncogene*, 27: 7285-95, 2008. *Corresponding author
(15) Oku, Y., Shimoji, T., Takifuji, K., Hotta, T., Yokoyama, S., Matsuda, K., Higashiguchi, T., Tominaga, T., Nasu, T., Tamura, K., Matsuura, M., Miyata, S., Kato, Y., Yamaue, H., and Miki, Y. Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis. *Clin Cancer Res*, 14: 7215-22, 2008.
(16) Shinagawa, H., Miki, Y.,* and Yoshida, K. BRCA1-mediated ubiquitination inhibits topoisomerase II alpha activity in response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 10: 939-49, 2008. *Corresponding author
(17) Sugai, S., Satoh, Y., Komatsu, M., Okumura, S., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., and Miki, Y. Recurrence pattern and rapid intraoperative detection of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in pleural lavage in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Rinsho Byori*, 56: 851-7, 2008.
(18) Sugano, K., Nakamura, S., Ando, J., Takayama, S., Kamata, H., Sekiguchi, I., Ubukata, M., Kodama, T., Arai, M., Kasumi, F., Hirai, Y., Ikeda, T., Jinno, H., Kitajima, M., Aoki, D., Hirasawa, A., Takeda, Y., Yazaki, K., Fukutomi, T., Kinoshita, T., Tsunematsu, R., Yoshida, T.,

Izumi, M., Umezawa, S., Yagata, H., Komatsu, H., Arimori, N., Matoba, N., Gondo, N., Yokoyama, S., and Miki, Y. Cross-sectional analysis of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer. *Cancer Sci*, 99: 1967-76, 2008.
(19) Tanaka, S., Arii, S., Yasen, M., Mogushi, K., Su, N. T., Zhao, C., Imoto, I., Eishi, Y., Inazawa, J., Miki, Y., and Tanaka, H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg*, 95: 611-9, 2008.
(20) Tomiyoshi, G., Nakanishi, A., Takenaka, K., Yoshida, K., and Miki, Y. Novel BRCA2-interacting protein BJ-HCC-20A inhibits the induction of apoptosis in response to DNA damage. *Cancer Sci*, 99: 747-54, 2008.

〔学会発表〕(計 19 件)

(1) 伊藤良則; 三木義男; 秋山太; 松浦正明; 長崎光一; 岩瀬拓士; 畠清彦. 乳がん治療の個別化 病態に応じた治療法の最近の進歩 遺伝子診断による個別化乳癌術前化学療法 (Personalized breast cancer therapy tailored to individual clinical conditions Individualized primary chemotherapy by genetic diagnosis for breast cancer). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
(2) 磯村実; 松浦正明; 野田哲生; 三木義男. パクリタキセルの末梢神経障害を予測する遺伝的マーカーの探索 (Genome wide association study to identify genetic marker for prediction of peripheral neuropathy of paclitaxel treatment). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
(3) 塩谷尚志; 河口徳一; 菅原稔; 長崎光一; 磯村実; 牛嶋大; 松浦正明; 三木義男; 野田哲生. 乳がんと膵がんに関連するヒトがん幹細胞の分子学的特性解析 (Molecular characterization of human cancer stem cells-associated breast and pancreatic carcinoma). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
(4) 吉村慶子; 長崎光一; 岩瀬拓士; 秋山太; 三木義男. 乳癌の新規予後因子の同定. 第 17 回日本乳癌学会学術総会、東京、2009 年 7 月
(5) 五木田茶舞; 阿江啓介; 下地尚; 石田剛; 松本誠一; 三木義男; 四宮謙一. 分子生物学的手法による高分化型脂肪肉腫の鑑

別診断の試み. 第 82 回日本整形外科学会学術総会、福岡、2009 年 5 月

(6) 三木義男; 牛嶋大; 松浦正明; 長崎光一. 乳癌における治療効果予測因子の現状と今後の展望 化学療法の効果予測因子 基礎の立場から(シンポジウム). 第 17 回日本乳癌学会学術総会、東京、2009 年 7 月

(7) 三木義男; 中西啓. Brca2 は 14-3-3 と結合して中心体の凝集に関与する. 第 15 回日本家族性腫瘍学会学術集会、東京、2009 年 6 月

(8) 三木義男; 長崎光一; 牛嶋大; 宮田敏; 松浦正明; 野田哲生. 分子情報を用いた個別化医療の TR 乳がんの抗がん剤治療効果予測法の開発(Translational research for personalized medicine based on genome information of cancer patients Genomic study for response prediction of breast cancer chemotherapy)(シンポジウム). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(9) 小松哲; 長崎光一; 篠原剛; 五十嵐淳; 藤森芳郎; 山岸喜代文; 西村博行; 藤森実; 三木義男. 乳癌における新規遺伝子多型の同定. 第 109 回日本外科学会定期学術集会、福岡、2009 年 4 月

(10) 仁平啓史; 三木義男; 吉田清嗣. Pim-1 は RelA/p65 の Ser276 をリン酸化することで NF- κ B の活性化を制御する(Pim-1 kinase controls the transcription activity of NF- κ B through phosphorylation of the RelA/p65 subunit at Ser276). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(11) 須貝幸子; 坂尾幸則; 文敏景; 奥村栄; 尾本大輔; 大仲悟; 林俊典; 小松美樹; 石川雄一; 佐藤之俊 and others. 原発性非小細胞肺癌切除時の胸腔内洗浄液における TRC 法による CEA mRNA と CK19 mRNA の迅速的検出の検討(Rapid intraoperative detection of CEA mRNA and CK19 mRNA in the pleural lavage of NSCLCs by the TRC method). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(12) 斉藤広子; 中西啓; 三木義男. 細胞周期に関連する網羅的リン酸化タンパクの定量解析(Comprehensive phosphoproteome analysis during the cell cycle of HeLa S3 cells). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(13) 石井紀子; 新井正美; 三木義男. 遺伝カウンセリング後の hnpcc 患者・家族の近親者への医療機関受診勧奨支援の重要性について. 第 17 回日本乳癌学会学術総会、東京、2009 年 7 月

(14) 大石陽子; 三浦妙太; 佐原八束; 川村徹; 佐藤康; 中嶋昭; 三木義男. 乳がんにおける stmn1 高発現症例の病理学的特徴. 第 17 回日本乳癌学会学術総会、東京、2009 年 7

月

(15) 中西啓; 斉藤広子; 大海忍; 福田宏之; 高村千鶴子; 三木義男. BRCA2- Myosin IIC complex is localized to the midbody of cytokinesis and required the completion of cytokinesis(和訳中). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(16) 長崎光一; 下地尚; 星川裕; 松浦正明; 野田哲生; 三木義男. トランスフェクションアレイを用いた薬剤感受性遺伝子の機能ネットワーク解析(Functional Screening for Chemo-sensitivity Related Genes by Transfection Cell Array). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(17) 田中真二; 藍原有弘; 茂柳薫; ヤーセン・マームット; 野口典男; 入江工; 工藤篤; 中村典明; 井本逸勢; 三木義男 and others. 肝癌再発ネットワーク解析に基づく Aurora kinase B 分子標的治療の開発(Aurora kinase B addiction as a novel molecular target in hepatocellular carcinoma with aggressive recurrence). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(18) 平直江; 三木義男; 吉田清嗣. ATM による DYRK2 のリン酸化は MDM2 を介したユビキチン化の阻害に必要である(ATM phosphorylation of DYRK2 confers resistance to ubiquitination-mediated degradation by MDM2). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

(19) 木村純子; 平直江; 三木義男; 吉田清嗣. ライブラリー型 RNA 干渉を用いたアポトーシス誘導関連遺伝子の網羅的探索(The functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in human cancer cells). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 義男 (MIKI YOSHIO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 10281594

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし