

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09157

研究課題名(和文)悪性中皮腫リスクバイオマーカーとしてがん抑制因子BAP1活性検査の実用化研究

研究課題名(英文)Practical Application of Cancer Suppressor BAP1 Activity as a Biomarker for Malignant Mesothelioma

研究代表者

伊藤 達男 (Ito, Tatsuo)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80789123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1-associated protein 1 (BAP1)は、悪性胸膜中皮腫などにおいて、主要ながん抑制遺伝子として注目されている。本研究計画ではNonhomologous end-joining (NHEJ)におけるBAP1の役割を明らかにした。

結果：BAP1の不活性化は、ヒト中皮細胞およびヒト悪性中皮腫細胞株の両方において、DNA損傷の増加と関連していることがわかった。更に、プロテオミクス解析により、MPM細胞および293T細胞において、DNA修復のNHEJ経路で機能するDNAプロテインキナーゼ(DNA-PKcs)がBAP1タンパク質複合体の相互作用パートナーとして同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、BAP1がDNA-PKとの相互作用を介して二本鎖DNA修復のNHEJ経路に関与していることを示しており、悪性中皮腫のようにBAP1の不活性化が頻繁に見られるがんでは、治療及び、予後診断の標的となりうるDNA修復の脆弱性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：BRCA1-associated protein 1 (BAP1) is one of the major tumor suppressor genes in malignant pleural mesothelioma. In this study, we clarified the role of BAP1 in nonhomologous end-joining (NHEJ).

RESULTS: We found that inactivation of BAP1 was associated with increased DNA damage in both human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cell lines. Furthermore, proteomic analysis identified DNA protein kinases (DNA-PKcs), which function in the NHEJ pathway of DNA repair, as interaction partners of the BAP1 protein complex in MPM and 293T cells.

研究分野：予防医学

キーワード：悪性中皮腫 BAP1 NHEJ DNA-PKcs

1. 研究開始当初の背景

BRCA1-associated protein 1 (BAP1)は、729 アミノ酸の核内ユビキチンヒドロラーゼであり、細胞増殖、クロマチン制御、DNA 修復反応に関与していることが知られている。ゲノムプロファイリングの結果、BAP1 は悪性胸膜中皮腫(MPM)において頻繁に不活性化される遺伝子であることが最初に判明し、最大で42%の症例で欠失、突然変異、またはその両方が認められた。最近のゲノムデータによると、MPM における BAP1 の不活性化の割合は 60%近くになると考えられている。BAP1 の不活性化体細胞変異はブドウ膜メラノーマでもよく見られ、特に転移サブセットでは BAP1 の変異率が 80%近くに達している。BAP1 の腫瘍抑制機能をさらに裏付ける証拠として、BAP1 の生殖細胞変異が MPM やぶどう膜黒色腫の素因となる家系で見つかっている。生殖細胞 BAP1 症候群の腫瘍スペクトラムには、他のいくつかの癌も含まれており、これらの癌では BAP1 が体細胞でよく不活性化されていることが分かっている。また、生殖細胞 BAP1 のヘテロ接合体を持つマウスでは、BAP1 が古典的な癌抑制因子として機能することが確認されている。

2. 研究の目的

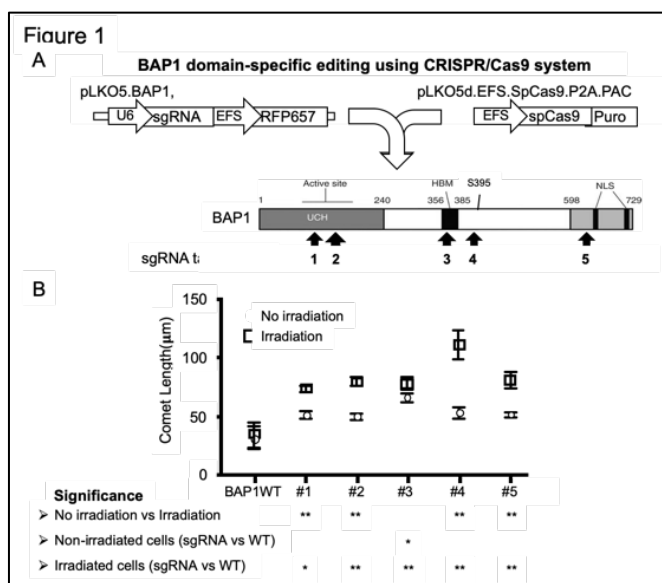
BAP1 の機能として最初に考えられたのは、二本鎖切断(DSB)に対する DNA 修復反応であった。DSB の修復には、相同組換え(HR)と非同末端結合(NHEJ)という2つの主要な経路がある。NHEJ では、Ku70/Ku80(Ku)タンパク質が DNA 末端に結合することで、DNA 鎖の末端が整列し、DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PKcs)の触媒サブユニットが結合する。そして、DNA-PKcs は、整列した DNA 鎖の処理を促す。現在のところ、DNA-PKcs のリン酸化標的として最もよく知られているのは、DNA-PKcs 自身である。DNA-PKcs にはいくつかの自己リン酸化部位が同定されており、DNA 損傷時には生体内でリン酸化される。重要なのは、DNA-PKcs が欠損した細胞は放射線に対する感受性が高まることである。これまでのいくつかの研究では、BAP1 が HR に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、NHEJ に BAP1 が関与していることを示す明確な証拠はまだない。本研究計画では、MPM 細胞において、腫瘍抑制因子 BAP1 の主要な相互作用パートナーとして DNA-PKcs を同定し、この相互作用が NHEJ を介した DNA 修復に果たす役割を機能的に明らかにした。

3. 研究の方法

- 1) BAP1 のゲノム改変によるゲノムの不安定性をコメットアッセイで解析
- 2) プロテオミクス解析(LC/MC)による BAP1 相互作用タンパク質の解析
- 3) BAP1 のリン酸化部位の解析
- 4) BAP1 タンパク質と DNA-PK との共発現解析
- 5) MPM における BAP1 欠損による潜在的なゲノム不安定性を標的とした治療の可能性探索

4. 研究成果

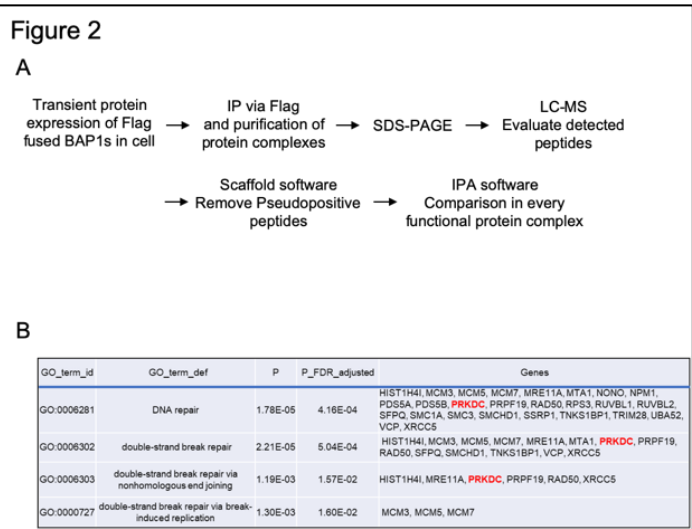
1) BAP1 が DNA 修復に及ぼす影響を細胞レベルで評価するために、まず MPM 細胞株 H-meso において siRNA を用いて BAP1 のノックダウンを行い、コメットアッセイによりゲノムの安定性を評価した。その結果、BAP1 をノックダウンすると、コメットテールの長さがネガティブコントロールに比べて長くなり、BAP1 がゲノムの安定性維持に関与していることが示唆された。そこで、BAP1 の DNA 修復に関わる特定のドメインを調べるために、ヒト中皮細胞株 MeT-5A を用いて、sgRNA と Cas9 タンパク質 (CRISPR/Cas9) のレンチウイルス発現システムにより、既知の重要な機能ドメインを標的とした BAP1 のドメイン特異的ノックダウンを行った。各 sgRNA のターゲティングサイトを図 1 A に示す。サンガー配列解析の結果、部位特異的な変異を細胞内に導入することに成功した。その結果、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (UCH) ドメイン (sgRNA#1 および#2)、セリン 395 付近 (sgRNA#4)、核局在化シグナル (NLS) ドメイン (sgRNA#5) を標的とする sgRNA を発現させた MeT-5A 細胞では、放射線 (10Gy) によって誘発される DNA 損傷がコメットアッセイで測定され、有意に増加することがわかった (図 1B)。一方、ヘリカルバイモジュラー (HBM) ドメインを標的



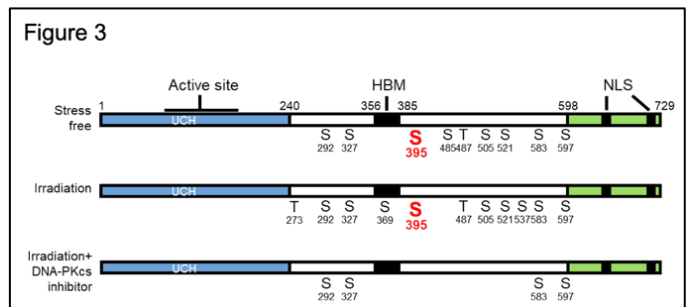
した。サンガー配列解析の結果、部位特異的な変異を細胞内に導入することに成功した。その結果、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (UCH) ドメイン (sgRNA#1 および#2)、セリン 395 付近 (sgRNA#4)、核局在化シグナル (NLS) ドメイン (sgRNA#5) を標的とする sgRNA を発現させた MeT-5A 細胞では、放射線 (10Gy) によって誘発される DNA 損傷がコメットアッセイで測定され、有意に増加することがわかった (図 1B)。一方、ヘリカルバイモジュラー (HBM) ドメインを標的

とした sgRNA (sgRNA#3) を発現させた Met-5A 細胞では、放射線を照射してもゲノムの不安定性は引き起こされなかった。次に、DSB の修復に関わる主要なタンパク質の状態をウェスタンブロット解析で調べた。図 1C に示すように、特定のドメインを標的とした sgRNA (特に sgRNA#4) を導入した放射線照射 Met-5A 細胞では、BAP1、DNA-PKcs、-H2AX の発現が増強された。このことから、BAP1 は放射線損傷後のゲノム安定性維持に役割を果たしており、セリン 395 に依存している可能性があり、セリンドメイン近傍が重要であることが示唆された。

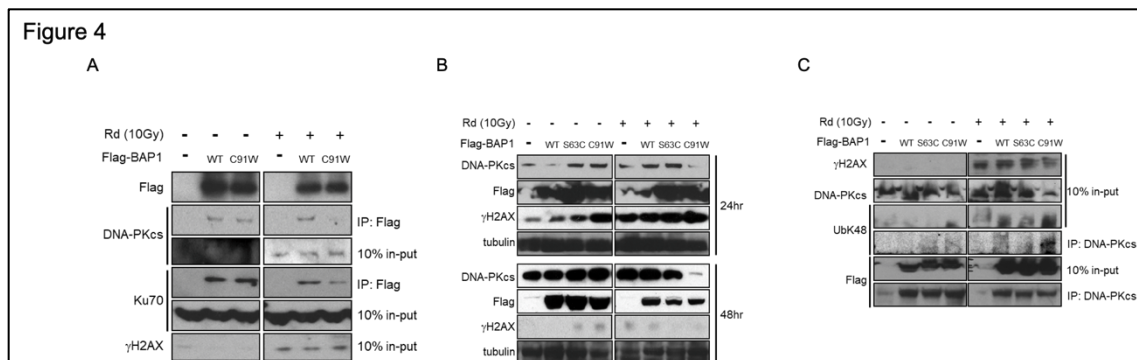
2) MPM 細胞における BAP1 の役割、特に DNA 損傷修復経路における BAP1 の相互作用パートナーを明らかにするため、ヒト MPM 細胞株である H-meso および HEK293T (293T) 細胞を用いて、フラグタグ付きの野生型および変異型 BAP1 コンストラクト (BAP1 C91W) を用いたタンパク質複合体の免疫沈降 (IP) を行った。この変異体を選んだのは、このミスセンス変異が機能的アッセイにおいてユビキチンヒドロラーゼ活性を損なうことが以前に示されていたからである。LC/MS 解析までのフローチャートを図 2A に示す。アフィニティーで精製したタンパク質複合体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、クーマシーブルーで染色した。分離したタンパク質バンドを切り出し、ナノ LC-MS/MS 解析を行った。BAP1 と co-IP したタンパク質配列 (正規化された倍数濃縮スコアとともに) は、GO 分析 (DICE ツール、<https://tools.dice-database.org/>) を用いて正準経路分析を行った。これにより、H-Meso 細胞と 293T 細胞の両方で BAP1 と強い相互作用を示したタンパク質複合体のそれぞれを比較することができた。H-Meso 細胞と 293T 細胞の質量分析の結果を組み合わせ co-IP タンパク質の GO 解析を行ったところ、NHEJ 経路のタンパク質である PRKDC (DNA-PKcs) が野生型 BAP1 と関連して有意に過剰発現していることが確認されたが (図 2B)、BAP1 C91W とは関連していないことから (結果は省略)、BAP1 は HR を介した DSB 修復だけでなく、NHEJ を介した DSB にも極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。



3) BAP1 は、DNA 損傷時にいくつかの部位でリン酸化されることが知られている。電離放射線 (10Gy) による二本鎖 DNA 損傷が BAP1 のリン酸化に影響を与えるかどうかを調べたところ、BAP1 の 395 番目のセリンが強くリン酸化されることがわかった。次に、BAP1 S395 のリン酸化が BAP1 による DNA 修復に果たす役割を調べた。その結果、BAP1 WT を発現させた照射済み 293T 細胞の phosphoBAP1S395 のレベルは、DNA-PKcs 阻害剤で前処理することで低下することがわかり、DNA-PKcs による DNA 修復がリン酸化 BAP1S395 を介して制御されている可能性が示唆された (図 3)。BAP1 C91W を誘導すると、リン酸化 BAP1S395 のレベルが低下した。これらの結果は、BAP1 の脱ユビキチン化活性が、リン酸化 BAP1S395/DNA-PKc の複合体形成を介した DNA 修復の過程において重要な役割を果たしている可能性を示唆していることが分かった。

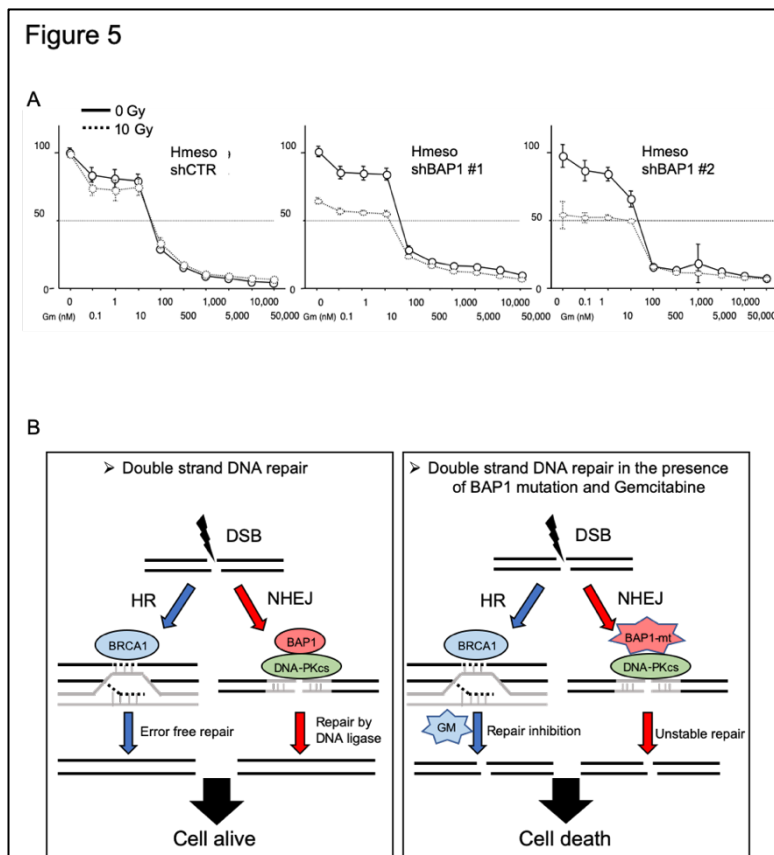


4) 293T 細胞と H-Meso MPM 細胞株を用いて、DNA-PKcs と BAP1 との相互作用を異なる条件下で調べた。私たちは、野生型の BAP1 と、NHEJ を介した DNA 修復の鍵となるタンパク質である DNA-PKcs または Ku70 との間に、放射線を照射した場合としない場合とで、同様の相互作用があることに注目した。ユビキチン化欠損 BAP1 C91W 変異体 (BAP1C91W) を発現させた細胞では、放射線の非照射時に DNA-PKcs と BAP1C91W の相互作用が検出されたが、放射線照射 (10Gy) によって DNA が損傷すると、DNA-PKcs タンパク質のレベルが低下することが原因の一つとなって、この相互作用が顕著に低下した (図 4A および B)。これは、DNA-PKcs のユビキチンを介した分解の増加と関係があるのではないかと考え、DNA-PKcs のユビキチン化の程度を調べた。その結果、ユビキチン化欠損変異体 BAP1 C91W を発現させた照射 293T 細胞から免疫沈降させた DNA-PKcs は、K48 結合のポリユビキチンが増加していることがわかった (図 4C)。これらの結果から、BAP1 の



デユビキチナーゼ活性は、DNA 損傷の際に DNA-PKcs のタンパク質レベルを安定化させるために必要であると考えられる。DNA-PKcs による BAP1 のリン酸化を裏付けるデータと合わせて、BAP1 と DNA-PKcs が互いに標的となってそれぞれの機能を高め、NHEJ での DNA 修復複合体を安定化させている可能性を示唆している。

5) ゲムシタビンによる悪性中皮腫細胞株の DNA への放射線損傷の増強に対する BAP1 機能の影響を調べた。3 種類の shRNA をレンチウイルスで Hmeso 細胞株に導入し、放射線照射の有無にかかわらず、ゲムシタビンで細胞を処理した。Hmeso 細胞株における BAP1 のノックダウンは、放射線感受性の増加と関連していた (図 5A)。この結果は、BAP1 の発現をノックダウンすることで NHEJ 活性を抑制すると、Hmeso 細胞の放射線感受性が高まることを示している。おそらく、NHEJ と HR の複合的な障害が原因であると考えられる。本研究計画で得られた、MPM におけるゲノムの不安定性を標的とした治療戦略の可能性を示す模式図を図 5B に示す。



本研究計画を実施した結果、BAP1 と DNA-PKcs との直接的な相互作用により、MPM ではリン酸化 BAP1S395 が生じ、BAP1 の核内移行により脱ユビキチン化活性が維持されている結果得られた。DNA-PKcs の分解は、BAP1 による脱ユビキチン化によって制御され、NHEJ を介した DNA 修復のプロセスに貢献している。NHEJ を介した DNA 修復がこの BAP1/DNA-PKcs 相互作用に依存していることは、BAP1 の機能に異常を来した MPM の新たな治療法につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Shoko, Lee Suni, Matsuzaki Hidenori, Kumagai-Takei Naoko, Yoshitome Kei, Sada Nagisa, Shimizu Yurika, Ito Tastsuo, Nishimura Yasumitsu, Otsuki Takemi	4. 巻 138
2. 論文標題 Enhanced expression of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) and its role in a human T cell line continuously exposed to asbestos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environment International	6. 最初と最後の頁 105654 ~ 105654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envint.2020.105654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤達男
2. 発表標題 中皮腫関連蛋白BAP1の機能と発癌予備群検出マーカーとしての利用価値
3. 学会等名 87回日本衛生学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤達男
2. 発表標題 中皮腫関連蛋白BAP1の機能と発癌予備群検出マーカーとしての利用価値
3. 学会等名 90回産業衛生学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長岡 憲次郎 (Nagaoka Kenjiro) (40752374)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 依里 (Eguchi Eri) (60635118)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	荻野 景規 (Ogino Keiki) (70204104)	高知大学・医学部・特任教授 (16401)	
研究分担者	大内田 守 (Ouchida Mamoru) (80213635)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関