

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390083

研究課題名（和文） 乳癌におけるストレス応答性アポトーシス誘導機能破綻の分子機構

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of breast cancer cells in the apoptotic response to DNA damage

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：DNA 損傷に関わる機構の破綻は、癌をはじめとする広範な疾患の原因となる。我々は、乳癌において DNA 損傷に誘導される細胞死（アポトーシス）の制御機構の解明を目指し、このシグナル伝達を担ういくつかのキナーゼに焦点を絞り機能解析を進めた。その結果、(1) トポイソメラーゼ II α 、Rb と BRCA1、(2) c-Abl と 14-3-3、(3) TAF1 などの分子に関わる、乳癌における新たな細胞死誘導機構およびその破綻のメカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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、DNA 損傷修復、細胞死誘導、c-Abl、14-3-3、TAF1

1. 研究開始当初の背景

現在、乳癌発生分子メカニズムにおいて最も機能、制御機構の解明が進んでいる分子は遺伝性乳癌原因遺伝子として単離された BRCA1、BRCA2 である。これらは、ゲノムの安定化に働く caretaker 型癌抑制遺伝子で、DNA の損傷修復、特に二本鎖切断された DNA を修復する機構に関与するが明らかとなった。一般乳癌においても、染色体の高頻度の aneuploidy が特徴であり、その発生機構にゲノム DNA を安定に保存する修復機構の破綻が関与する可能性が知られている。これらの DNA 修復機構とチェックポイント機構は、生物種を超えて発生、増殖、分化、細胞死（ア

ポトーシス）というプログラムを厳密に制御し、このプログラムの破綻はゲノム構造の不安定性をもたらし、最終的には発癌という形で大きく寄与している。そこで、これまでの乳癌に関する知見を総合し、乳癌発生機構においてはゲノム構造の安定化を制御する DNA 修復機構、チェックポイント機構、アポトーシス誘導機構の 1 連の機構によって制御される細胞機能の不全が根幹をなしていると判断した。そこで DNA 修復機構、チェックポイント機構に関しては、BRCA1、BRCA2 研究で解明し、本申請研究では、アポトーシス誘導機構に焦点を当て、その体系的なアポトーシス誘導機能情報を解明すると同時に乳腺発

癌における分子機構の解明に応用し、その統合的全体像を明らかにしていくことが必要であると考えらるにいたった。

2. 研究の目的

乳癌発生の分子機構は「ゲノム構造の安定化機構の機能破綻」が根幹を成していると判断したことが独創的出発点であり、その解明を目指し、まず、ゲノム構造の安定化機能の1つであるストレス応答性アポトーシスの誘導機能に注目し、個々の関連機能分子およびその機能の同定を積み重ねると同時に、系統的な解析を行うことによって、アポトーシス誘導機構を個々の分子で説明するのではなく統合的システムとして理解することを目指す。さらに、これらの体系的アポトーシス関連情報を乳癌発癌機構解明に応用することにより乳癌発生メカニズムの分子モデルを統合的システムとして構築する。

様々なストレスに対する適応形態の一つであるアポトーシスと呼ばれる細胞死は、生体の恒常性維持において不可欠な生命現象として獲得され保存されてきた基本機能である。この細胞内情報伝達網としてキナーゼによるタンパク質リン酸化システムが用いられており、多彩な細胞応答を可能にしている。ストレス応答におけるアポトーシス制御機構もこのシステムによって厳格にコントロールされており、その分子メカニズムは一部解明されつつあるが、多くは未だ明らかになっていない。また、リン酸化による情報伝達機構が、如何にしてアポトーシス実行因子である種々の蛋白・DNA分解酵素へとシグナルを伝えているのかについてはほとんど不明である。申請者はすでに、LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) によるプロテオミクス解析によって上記のキナーゼの複合体構成分子群を単離しており、本研究ではそれら複合体因子群の機能解析に主眼を置く。特に複合体因子群がストレス刺激によるキナーゼの核移行や活性化に及ぼす影響に焦点をあて、キナーゼの機能的制御因子を同定する。複合体因子群のリン酸化による制御にも着目し、ストレス刺激で誘発されるリン酸化部位の特定と機能との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 複合体構成分子の網羅的探索とアポトーシス関連因子の単離

c-Ab1 チロシンキナーゼ、プロテインキナーゼ C δ (PKC δ) など、アポトーシスを誘導するキナーゼをベイトにした高感度 LC-MS/MS 解析により得られた複合体構成分子群について、細胞分画法や免疫染色法により局在を確認する。次に、実際の細胞内での複合体形成の有無を調べる。ストレス刺激に

よる複合体形成の変化にも焦点をあて、複合体の細胞内移行についても詳細な検討を行う。複合体因子のリン酸化については、まずイン・ビトロにてリン酸化の有無を確認後、MALDI-TOF-MS によるリン酸化部位の同定を行う。さらにこれら標的複合体分子がストレス刺激におけるアポトーシス誘導機構にどのような機能を果たしているかを調べるため、ストレス刺激下において、機能的変化や siRNA 発現ベクターの導入による標的蛋白質発現阻害下でのアポトーシス誘導の影響などについて解析を行い、アポトーシス誘導制御因子を同定する。

プロテオミクス解析についてより特異的な複合体因子を単離すべく、① 細胞内の局在による複合体形成の差異、② ストレス刺激による複合体形成の差異、③ リン酸化による複合体形成の差異、に着目して高感度 LC-MS/MS 解析の第二次スクリーニングを開始する。さらにこれら一連の複合体因子の網羅的探索によって、ストレス刺激におけるアポトーシス誘導シグナル伝達経路とそのメカニズムを明らかにする。

(2) 乳癌細胞における単離したアポトーシス関連因子の機能解析

同定したアポトーシス誘導関連因子の、乳癌細胞に特化した機能解析を進める。まず GFP を融合したキナーゼがテトラサイクリンによって発現誘導可能な乳癌細胞を樹立し、また乳癌細胞におけるアポトーシス誘導関連因子の機能については、導入と siRNA を駆使したノックダウン法を併用しながら乳癌を含む種々の癌細胞と正常細胞とを比較検討し、癌特異的な機能不全、あるいは機能亢進の有無を解明する。さらにこれらの細胞に siRNA ライブラリーを導入し、キナーゼの細胞内局在を GFP でモニターしながら種々のストレス刺激に抵抗性をもつ細胞群をクローニングし、ノックダウンされている遺伝子を同定することで、キナーゼを介したアポトーシス誘導に直接関与する分子の機能的アッセイを並行して進める。アポトーシス制御機能のメカニズムについては、ストレス刺激下でのキナーゼの活性阻害、核移行阻害、リン酸化状態の変化に焦点を絞って、アポトーシス誘導との相関を踏まえながら乳癌を含むいくつかの癌細胞による比較を通して明らかにしていく。これら一連の複合体因子の機能解析を通じて、乳癌治療における新たな標的分子の可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) BRCA1 のユビキチン化機能によるトポイソメラーゼ II α の活性抑制

トポイソメラーゼ II α は細胞増殖と細胞死に不可欠であるが、細胞にストレスが加わった際のトポイソメラーゼ II α 制御の分子機

構は、まだ完全には解明されていない。本研究は、酸化ストレスがトポイソメラーゼ II α へ与える影響を解析した。酸化ストレスを加えると、トポイソメラーゼ II α の活性と発現は低下し、このとき酸化ストレス依存的にトポイソメラーゼ II α のユビキチン化の亢進が見られた。遺伝性乳癌原因遺伝子である BRCA1 は転写制御、チェックポイント機構の制御、DNA 損傷修復等に関与し、また、RING finger domain による E3 ユビキチンリガーゼ活性を持っている。さらに、BRCA1 は酸化ストレスによる損傷修復に関与しているという報告もある。そこで、BRCA1 が酸化ストレスによるトポイソメラーゼ II α のユビキチン化を抑制し、DNA 損傷修復に関与していると推測した。Rb は DNA 損傷に反応してチェックポイント機構を活性化し、DNA 修復に関わる遺伝子の発現を抑制すること、トポイソメラーゼ II α および BRCA1 と相互作用することが報告されている。まず、BRCA1 の過剰発現により、トポイソメラーゼ II α のユビキチン化の亢進、活性の一部低下を確認した。これは BRCA1 がユビキチン化を誘導することにより、トポイソメラーゼ II α の活性制御に関与していることを示す。また、酸化ストレスによりトポイソメラーゼ II α 、BRCA1、Rb の相互作用が強まり、Rb をノックダウンするとトポイソメラーゼ II α と BRCA1 の相互作用が減弱することを明らかにし、BRCA1 と Rb が、これらのトポイソメラーゼ II α を制御している可能性を示した。結論として、酸化ストレスが加わるとトポイソメラーゼ II α は Rb と共同した BRCA1 によるユビキチン化によって機能制御されることを明らかにした。

(2) DNA 損傷における c-Abl チロシンキナーゼによるアポトーシス誘導の解析

c-Abl チロシンキナーゼは細胞質、核両方に存在するが、核内 c-Abl が DNA 損傷により活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている (Yoshida K, et al. Mol. Cell. Biol. 2002)。c-Abl の核移行には、14-3-3 との解離が必要であり、MAPK スーパーファミリーの一つである JNK による 14-3-3 のリン酸化がその解離に重要な機能を果たしていることを明らかにした。c-Abl の 14-3-3 結合部位も同定し、結合に最も重要なスレオニン (Thr735) をリン酸化するキナーゼが TTK であることを明らかにした。また、TTK の発現は c-Abl 依存的なアポトーシスを抑制することを示した。

(3) DNA 損傷におけるアポトーシス誘導関連因子の網羅的探索

DNA 損傷におけるアポトーシス誘導に関わる新規遺伝子の網羅的探索を目的として、shRNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニング系を構築した。その結果、アポトーシス関連遺伝子の候補として 32 クロウンを同定

し、そのなかで最も細胞死誘導に関与している遺伝子として TAF1 という分子を見出した。TAF1 は基本転写因子の中核をなす分子であり、そのアポトーシス誘導における機能解析を進めるために、マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、TAF1 に制御されている分子群において p27 の発現が細胞死誘導に関わっていることを見出した。

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 25 件)

すべて査読有り

(1) 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

(2) 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.

(3) 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

(4) Izawa, N., Matsumoto, S., Manabe, J., Tanizawa, T., Hoshi, M., Shigemitsu, T., Machinami, R., Kanda, H., Takeuchi, K., Miki, Y., Arai, M., Shirahama, S., and Kawaguchi, N. A Japanese patient with Li-Fraumeni syndrome who had nine primary malignancies associated with a germline mutation of the p53 tumor-suppressor gene. *Int J Clin Oncol*, 13: 78-82, 2008.

(5) 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

- (6) 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.
- (7) Nagasaki, K., and Miki, Y. Molecular prediction of the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer*, 15: 117-20, 2008.
- (8) 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
- (9) 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.
- (10) 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
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced Levels of ATF-2 Predispose Mice to Mammary Tumors. *Mol Cell Biol*. 27:1730-44, 2007.
- (16) Noda H, Miyaji Y, Nakanishi A, Konishi F, Miki Y. Frequent reduced expression of alpha-1B-adrenergic receptor caused by aberrant promoter methylation in gastric cancers. *Br J Cancer*. 96:383-90, 2007.
- (17) Oishi Y, Nagasaki K, Miyata S, Matsuura M, Nishimura S, Akiyama F, Iwai T, Miki Y. Functional pathway characterized by gene expression analysis of supraclavicular lymph node metastasis-positive breast cancer. *J Hum Genet*. 52:271-9, 2007.
- (18) Nakanishi A, Han X, Saito H, Taguchi K, Ohta Y, Imajoh-Ohmi S, Miki Y. Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:34-40, 2007.
- (19) Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, Tomioka H, Ushijima M, Noda M, Omura K, Miki Y. Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 98:740-6, 2007.
- (20) Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell*. 25:725-38, 2007.
- (21) Yamaguchi T, Miki Y, * Yoshida K. Protein kinase C delta activates IkappaB-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal*. 19:2088-97, 2007.
*Corresponding author
- (22) Fujisawa H, Isomura M, Eguchi S, Ushijima M, Miyata S, Miki Y, Matsuura M. Identifying haplotype block structure using an ancestor-derived model. *J Hum Genet*. 52:738-46, 2007.

(23) Yamaguchi T, Kimura J, Miki Y, * Yoshida K. The Deubiquitinating Enzyme USP11 Controls an I {kappa} B Kinase {alpha} (IKK {alpha})-p53 Signaling Pathway in Response to Tumor Necrosis Factor {alpha} (TNF {alpha}). J Biol Chem. 282:33943-8, 2007. *Corresponding author

(24) Liu H, Lu ZG, Miki Y, * Yoshida K. Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. Mol Cell Biol. 27:8480-91, 2007. *Corresponding author

(25) Horii R, Akiyama F, Ito Y, Matsuura M, Miki Y, Iwase T. Histological features of breast cancer, highly sensitive to chemotherapy. Breast Cancer. 14:393-400, 2007.

[学会発表] (計14件)

(1) 三木義男, 長崎光一, 牛嶋大, 松浦正明. 乳癌診療 標準化から個別化へ 乳癌の化学療法感受性予測の試み. . 第16回日本乳癌学会学術総会, 大阪, 2008年9月

(2) 三木義男. 乳がん術前化学療法の効果予測システム開発の試み (Molecular prediction of the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer). 第108回日本外科学会定期学術集会, 長崎, 2008年5月.

(3) 菅野康吉, 中村清吾, 安藤二郎, 神野浩光, 池田正, 青木大輔, 福富隆志, 吉田輝彦, 新井正美, 平井康夫, 霞富士雄, 福井崇史, 三木義男, and Brcal/2 多施設共同研究グループ. 遺伝性の癌 その研究と臨床の最前線 遺伝性乳癌卵巣癌が疑われる日本人を対象とする BRCA1/2 遺伝子変異の横断的研究 (Forefront of Basic and Clinical Researches in Hereditary Cancer Cross-sectional study of BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected of hereditary breast/ovarian carcinoma). 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008年10月

(4) 三木義男, 丹羽隆善, 齊藤弘子, 中西啓. 乳がん 基礎・病理・1次予防 BRCA2-Plectin 複合体は中心体の固定に関与する. 第14回日本家族性腫瘍学会学術集会, 東京, 2008年6月

(5) 木村純子, グェンティエンスー, 平直江, 三木義男, 吉田清嗣 アポトーシス誘導関連遺伝子の網羅的探索による TAF1 の同定と機能解析 BMB2008, 神戸; 2008年12月

(6) 仁平啓史, 安藤雄祐, 山口智子, 三木義男, 吉田清嗣 Pim-1 は RelA/p65 のリン酸化を介して NF-kB の活性化を制御する

BMB2008, 神戸, 2008年12月

(7) 平直江, 山本宙亨, 山口智子, 三木義男, 吉田清嗣 ATM は DYRK2 のリン酸化はキナーゼ活性を制御するとともに, MDM2 を介したプロテアソーム系による分解からの回避を引き起こす BMB2008, 神戸, 2008年12月

(8) 三木義男: 乳がんの分子遺伝学 BRCA の機能と乳がん発生における役割 (In the Forefront of Breast Cancer Research-Towards Steady Decrease of Cancer Mortality Breast cancer molecular biology and genetics: the role and function of BRCA1 and 2) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

(9) 三木義男: ゲノム、トランスクリプトーム情報の癌個別化治療への展開. 第44回日本臨床分子医学会学術集会, 和歌山, 2007年7月

(10) 中西啓, 齊藤広子, 太田吉泰, 大海忍, 三木義男: 非筋肉型ミオシン IIC による細胞質分裂の制御 (Nonmuscle myosin IIC regulates the division of intercellular bridge of cytokinesis) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

(11) 丹羽隆善, 中西啓, 大海忍, 上西紀夫, 三木義男: BRCA2 と相互作用する新規蛋白質プレクチン (Plectin, a novel protein which interacts with BRCA2) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

(12) 韓香子, 中西啓, 齊藤広子, 三木義男: BRCA2 における機能的核輸送配列の同定 (Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA2) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

(13) 平直江, 三木義男, 吉田清嗣: DNA 損傷に対するアポトーシス反応において DYRK2 は核を標的とし, Ser46 リン酸化を介して p53 を制御する (DYRK2 is Targeted to the Nucleus and Controls p53 via Ser46 Phosphorylation in the Apoptotic Response to DNA Damage) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

(14) 品川弘州, 三木義男, 吉田清嗣: 酸化ストレス下における, BRCA1 および pRb を介した ubiquitination による topoisomerase II alpha の活性阻害 (BRCA1-mediated ubiquitination through pRb inhibits topoisomerase II alpha activity in response to oxidative stress) (英語). 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月

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