

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03493

研究課題名(和文) がんの中心体制御異常の統合的理解による新たな中心体標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of Targeting therapy for centrosome dysregulation in cancer

研究代表者

千葉 奈津子 (Chiba, Natsuko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50361192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は微小管形成中心として機能し、分裂期には紡錘体極として娘細胞への均等な染色体分配を担う。我々は、遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因遺伝子産物であるBRCA1が、BRCA1結合分子BARD1、OLA1、RACK1とともに、分裂期キナーゼであるAurora AやPLK1の中心体局在や活性を制御して、中心体の複製機構とDNA損傷後の中心体数の増加において重要な働きをすることを明らかにした。また、これらの分子のがん由来の変異や発現量の異常が中心体複製の異常を引き起こし、中心体数の増加を起こすことを示し、これらの中心体複製機構の破綻が発がんに関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、がん関連分子による中心体制御機構と中心体DNA損傷応答の制御機構が明らかになり、がんDNA損傷応答という観点から中心体の統合的な理解が進み、新たな中心体生物学の学問領域の基盤が創出されたと考えられる。中心体の異常は染色体分配に異常を来し、発がんの原因になる一方で、正常細胞にはないがんの特徴で、がんの診断や治療の標的として有望である。今後さらにこれらの研究を継続・発展させていくことで、異常な中心体をバイオマーカーにした、中心体を標的とした新しいがん治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Centrosomes are the major microtubule nucleation centers in animal cells and are critical for forming a bipolar mitotic spindle. Defects in the mechanisms regulating centrosome number are associated with carcinogenesis and cancer progression. Pathogenic variants of BRCA1 cause hereditary breast and ovarian cancer syndrome. We found that BRCA1 regulates the centrosome localization and the activities of the mitotic kinases, Aurora A and PLK1, and plays important roles in centrosome duplication and the centrosomes amplification induced by DNA damage with the BRCA1-binding proteins, BARD1, OLA1, and RACK1. We also showed that cancer-derived mutations and abnormal expression levels of these proteins cause abnormal centrosome duplication and centrosome amplification.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：中心体 がん関連分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心体は間期には核の近傍に存在する細胞内小器官で、分裂期には紡錘体極として娘細胞への均等な染色体分配を担う(図 1)。中心体は 1 回の細胞周期に 1 度複製され、その複製は分裂期キナーゼである Aurora A や polo-like kinase 1 (PLK1) に厳密に制御されている。中心体の数や構造の異常は染色体分配に異常を来たし、発がんの原因になる。一方、中心体の異常は正常細胞にはない明らかながんの特徴で、がんの診断や治療の標的として有望である。

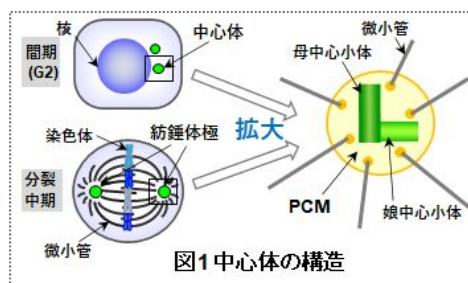


図1 中心体の構造

BRCA1 (Breast Cancer 1) はその生殖細胞系列変異により遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすがん抑制遺伝子で、難治性のトリプルネガティブ乳がんや他の散発性がんにも関与する。従来、がん抑制能として DNA 修復能が注目されてきたが、我々はプロテオーム解析で、新規 BRCA1 結合分子 Olg-like ATPase 1 (OLA1)¹⁾ や Receptor for activated C kinase (RACK1) を同定し(図 2)、これらが BRCA1 と結合分子 BARD1 とともに中心体複製を制御し、機能破綻が発がんに関与することを明らかにしてきた。特に RACK1 は、BRCA1 の中心体局在に重要で、RACK1 のがん由来の変異である K280E 変異は、BRCA1 との結合能が減弱し、BRCA1 の中心体局在を減弱させることが明らかにしていた。

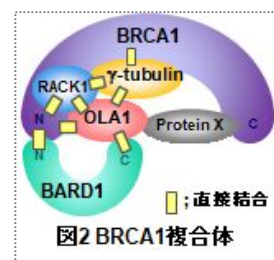


図2 BRCA1複合体

BRCA1 はコピキタスに存在する。変異や機能低下による DNA 修復能の異常は、組織特異性を認めず、その変異がなぜ組織特異的な発がんを引き起こすのかは不明であった。しかし、我々は、乳腺由来細胞では、中心体の複製が他の組織由来の細胞より中心体の複製のタイミングが早い、あるいはスピードが速くなって、亢進していることを明らかにし、乳腺由来細胞が BRCA1 関連分子の異常により中心体の異常が起きやすいことも示してきた。

近年、BRCA1、BRCA2 などの DNA 修復因子や CHK1、CHK2 などの細胞周期チェックポイント関連因子が、核内に加えて中心体に局在し、また反対に、中心体構成因子である centrin、pericentrin、Cep152 などが DNA 修復や細胞周期チェックポイントに関与することが明らかになり、DNA 損傷応答と中心体との関わりが示唆されている。以前より DNA 損傷後に中心体数が増加することが示されており(図 3)、BRCA1 が関与するという報告がある。しかし、その分子機構の詳細は不明である。

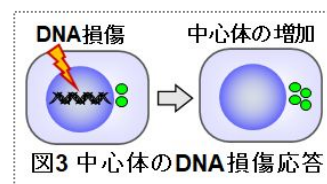


図3 中心体のDNA損傷応答

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに明らかにしてきた BRCA1 関連分子による中心体制御機構をさらに詳細に解析した。また、DNA 損傷後の中心体数増加メカニズムにおける BRCA1 関連分子の機能についても解析した。これらにより、中心体をがん DNA 損傷応答という観点から統合的に理解し、新たな中心体生物学の学問領域を創出し、中心体を標的とした新しいがん治療法を開発する分子基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BRCA1 関連分子と分裂期キナーゼの細胞学的、生化学的解析

BRCA1、RACK1、OLA1、BARD1、Aurora A、PLK1 の欠失変異体や点変異体の発現ベクターを作製した。点変異体は、site-directed mutagenesis にて作製した。免疫沈降は、HEK-293T 細胞にこれらのベクターを導入し、Protein G ビーズを用いて行った。Pull-down アッセイは、大腸菌で GST あるいは His タグを付加した精製タンパク質を調整し、グルタチオンビーズあるいは、を用いて行った。

BRCA1 関連分子と分裂期キナーゼの中心体局在や、発現抑制や強制発現の中心体への影響

は、それぞれの分子に対する抗体や HA などのタグに対する抗体と中心体のマーカーとなる抗 γ -tubulin 抗体で蛍光免疫染色を行って解析した。また、中心体のマーカーとなる GFP-centrin を発現する細胞株を樹立し、蛍光免疫染色を行って解析した。

(2) 中心体での蛍光強度の定量解析

サンプルを免疫蛍光染色し、各分子の中心体局在の定量的な解析のため、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) で観察し、写真を撮影した。中心体での各分子の蛍光強度を Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) で計測して定量した。 γ -tubulin、GFP-centrin の foci を中心として測定範囲を指定後、指定範囲内の目的分子の抗体で染色された最大蛍光強度または、指定範囲内の目的分子の抗体で染色された輝度の総和を背景の輝度の総和で補正し、測定した。

4. 研究成果

(1) RACK1 の中心体複製制御能とその機能破綻の発がん機構への関与

Aurora A と PLK1 の分子間の結合を助ける足場タンパク質として、Bora や CEP192 が知られていたが、いずれも主に細胞周期の G2 期から M 期に働くとしていた。我々は、RACK1 の発現抑制で S 期のリン酸化 PLK1 の中心体局在が減少すること、RACK1 が Aurora A と PLK1 の足場タンパク質として機能してこれらの結合を促進することを示し、RACK1 が S 期の PLK1 の活性化に機能して、中心体の複製を促進することが明らかにした (図 4, 5)。

また、RACK1 はがんでの高発現が報告されており、我々は乳がん細胞で RACK1 を過剰発現すると中心体が過剰複製することも明らかにしてきたが、本研究により、RACK1 の過剰発現が中心体の PLK1 を活性化し、中心体の早期解離がおきることを明らかにした。したがって、RACK1 の過剰発現により、Aurora A/PLK1 相互作用の足場としての活性の亢進して、発がんに寄与する可能性が示された。

また、がんで報告されている RACK1 の変異の中に、RACK1 の足場としての活性に異常をきたす変異、T94A、T303M を同定した。これらの変異により、PLK1 の活性化が障害され、正常の中心体制御能を失うことが明らかになり、これらの機能も発がんに関与することが明らかになった。

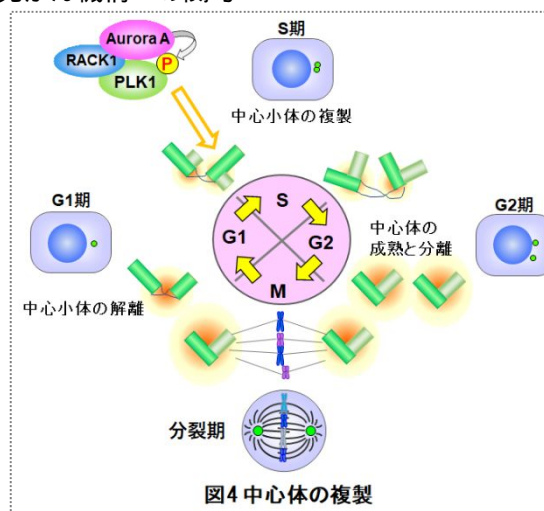


図4 中心体の複製

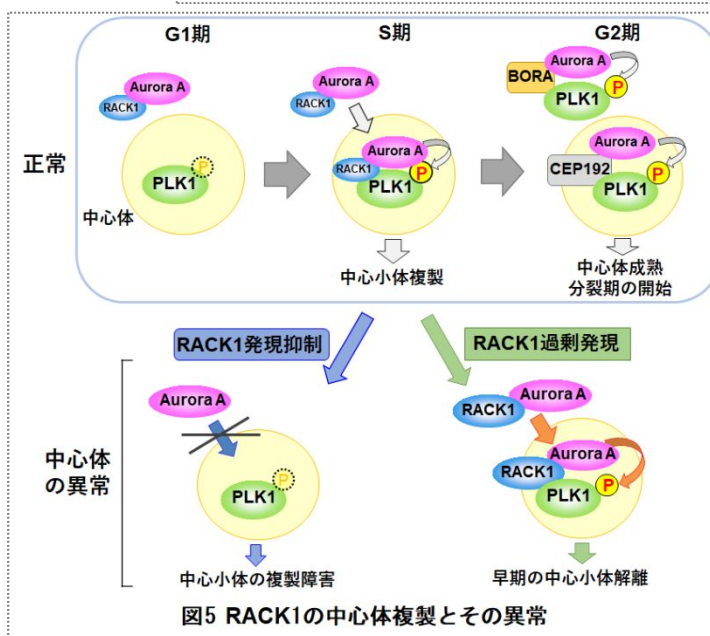


図5 RACK1の中心体複製とその異常

(2) Aurora A による OLA1 の制御機構

OLA1 は細胞周期を通じ中心体に局在したが、G2 期に低下した。中心体で働く分裂期キナーゼとしての機能が知られている Aurora A が E3 活性を持ち、OLA1 をユビキチン化して、プロテアソームを介して分解に導くこと、G2 期の OLA1 の中心体局在を低下させることを明らかにした。また、OLA1 の発現量が、G2 期の中心体周辺物質の中心体局在量を制御することも明

らかにした。Aurora A は G2 期で中心体局在が上昇することから、Aurora A による OLA1 のユビキチン化は、中心体の成熟に機能する可能性が示唆された。

(3) BARD1 isoform による中心体複製の制御機構

がん由来の変異やがんで高発現する BARD1 isoform は、BRCA1 との結合能が消失する一方、OLA1 との結合能は増強した。また、BRCA1 と BARD1 が中心小体伸長因子の発現量をユビキチン化によって制御し、BARD1 isoform の過剰発現により、中心小体伸長因子を安定化して、中心小体の過剰伸長がおき、中心体数の増加を引き起こすことを明らかにした。これらにより、BRCA1 と BARD1 は、中心小体の適切な伸長を制御し、BARD1 isoform の過剰発現は、中心体複製制御異常を介した中心体数の増加により、発がんに関与することが示唆された。

(4) DNA 損傷後の中心体数が増加における BRCA1 の機能

DNA 架橋剤であるシスプラチンによる DNA 損傷後に、BRCA1 の中心体局在が増強し、BRCA1 依存性に Aurora A とリン酸化 PLK1 の中心体局在が増強し、早期中心小体解離と中心小体の過剰複製が起こることを明らかにした。シスプラチン処理後の Aurora A の中心体局在の増強と中心体数の増加には、BRCA1 の核外移行が重要で、DNA 損傷のセンサーとされる ATM による BRCA1 のリン酸化も重要であることが明らかになった。以上より、BRCA1 が ATM にリン酸化されて核外に移行して中心体に局在し、DNA 損傷後に BRCA1 依存性に Aurora A の中心体局在が増加し、Aurora A による PLK1 のリン酸化を促進し、中心小体の早期解離と過剰複製を起こすことが示唆された (図 6)。

さらに、OLA1 と RACK1 も DNA 損傷後の中心体数の増加に関与することが明らかになり、BRCA1 関連分子が協調して機能する可能性が示唆された。

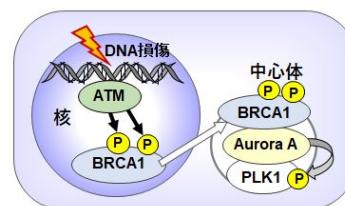


図6 中心体のDNA損傷応答

< 引用文献 >

- 1) Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 53(1) : 101-114, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Otsuka K Yoshino Y, Qi H, and Chiba N	4. 巻 11
2. 論文標題 The function of BARD1 in centrosome regulation in cooperation with BRCA1/OLA1/RACK1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11080842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshino Y, Kobayashi A, Qi H, Endo S, Fang Z, Shindo K, Kanazawa R, Chiba N	4. 巻 133
2. 論文標題 RACK1 regulates centriole duplication through the activation of polo-like kinase 1 by Aurora A.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs238931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.238931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ui A, Chiba N, and Yasui A.	4. 巻 111
2. 論文標題 Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1443-1451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshino Y, Fang Z, Qi H, Kobayashi A, and Chiba N	4. 巻 112(5)
2. 論文標題 Dysregulation of the centrosome induced by BRCA1 deficiency contributes to tissue-specific carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1679-1687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino Y, Qi H, Kanazawa R, Sugamata M, Suzuki K, Kobayashi A, Shindo K, Matsuzawa A, Shibata S, Endo S, Miyanishi Y, Shimaoka T, Ishioka C, Kanno S, Yasui A, and Chiba N.	4. 巻 38(16)
2. 論文標題 RACK1 regulates centriole duplication by controlling localization of BRCA1 to the centrosome in mammary tissue-derived cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3077-3092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0647-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino Y and Chiba N	4. 巻 90
2. 論文標題 Roles of RACK1 in centrosome regulation and carcinogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 110207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2021.110207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Endo S, Yoshino Y, Shirota M, Watanabe G, and Chiba N.	4. 巻 1(2)
2. 論文標題 BRCA1/ATF1-mediated transactivation is involved in resistance to PARP inhibitors and cisplatin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research Communications	6. 最初と最後の頁 90-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2767-9764.CRC-21-0064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 遠藤菜乃, 千葉奈津子	4. 巻 70(5)
2. 論文標題 DNA修復機構の基礎知識	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 479-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chiba N, Qi H, Yoshino Y.
2. 発表標題 Dysfunction of centrosome regulation by BRCA1-containing complex increases tumor heterogeneity.
3. 学会等名 AACR Virtual Special Conference: Tumor Heterogeneity: Form Single cell to Clinical Impact (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋匯成、吉野優樹、菊池 めぐみ、方震宙、石岡千加史、千葉奈津子.
2. 発表標題 リン酸化BRCA1はAurora Aの中心体局在を介してDNA損傷後の中心体増幅を制御する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉奈津子
2. 発表標題 DNA修復とDNA損傷応答を標的とした新規がん治療
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 方震宙、齋匯成、森隆弘、吉野優樹、鈴木萌、石岡千加史、千葉奈津子.
2. 発表標題 Aurora AによるOLA1のコピキチン化は中心体複製制御に重要である
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino Y, Kobayashi A, Qi H, Endo S, Fang Z, Chiba N.
2. 発表標題 A novel BRCA1-interacting protein, RACK1, contributes centriole duplication in mammary cells via regulation of PLK1.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉 奈津子, 吉野 優樹, 齋 匯成, 遠藤 菜乃, 方 震宙, 石岡 千加史, 安井 明
2. 発表標題 新規BRCA1結合分子であるOLA1とRACK1は中心体複製を制御してゲノム安定性に寄与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino Y, Qi H, Endo S, Fang Z, Otsuka K, Chiba N.
2. 発表標題 Centrosome regulation by a novel BRCA1 complex: insight into tissue-specific carcinogenesis.
3. 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 慧, 内山 千尋, 吉野 優樹, 齋 匯成, 千葉 奈津子.
2. 発表標題 BARD1アイソフォームの発現は中心体の異常な伸長を引き起こす.
3. 学会等名 第42回分子生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋匯成, 菊地めぐみ, 大橋和音, 方震宙, 吉野優樹, 千葉奈津子.
2. 発表標題 BRCA1とその関連分子による中心体のDNA損傷応答機構の解明.
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地めぐみ, 齋匯成, 趙懿, 方震宙, 吉野優樹, 千葉奈津子.
2. 発表標題 BRCA1はDNA損傷後のAurora Aの中心体局在を制御する.
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉奈津子
2. 発表標題 RCA1/2によるゲノム安定性維持機構とその機能破綻による発がん
3. 学会等名 「がんプロ」特別公開講演会 がんゲノム医療先端レクチャー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉奈津子
2. 発表標題 BRCA1のゲノム安定性維持能の破綻の発がんと抗がん剤感受性への影響について
3. 学会等名 「7大学連携個別化がん医療実践者養成プラン」第54回がんプロセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野 優樹, 遠藤 菜乃, 渡部 剛, 千葉奈津子.
2. 発表標題 BRCA1関連乳がんの 新たな診断法の開発と 発がん機構の解析.
3. 学会等名 第8回HBOCコンソーシアム学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fang Z, Yoshino Y, Mori T, Suzuki M, Li X, Qi H, Ishioka C, and Chiba N.
2. 発表標題 Dual activities of Aurora A regulate OLA1 ubiquitination to control centrosome number.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fang Z, Li X, Suzuki M, Yoshino Y, Qi H, Mori T, and Chiba N.
2. 発表標題 Aurora A-dependent ubiquitination of OLA1 regulates centrosome number through controlling the recruitment of PCM proteins
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiba N, Kikuchi M, Fang Z, Goto T, YoshinoY, Ishioka C, Qi H
2. 発表標題 BRCA1 transports DNA-damaging signal to centrosome through its phosphorylation by ATM
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshino Y and Chiba N.
2. 発表標題 Regulatory mechanism of precise localization of BRCA1 in centrosome
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉奈津子
2. 発表標題 発がんと薬剤感受性に関するBRCA1/2の新たな機能.
3. 学会等名 第1回一般社団法人日本遺伝性乳癌卵巣癌総合診療制度機構学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Yuki Yoshino and Natsuko Chiba	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 p47-64
3. 書名 Hereditary Breast and Ovarian Cancer - Molecular Mechanism and Clinical Practice 4. Variants of uncertain significances in hereditary breast and ovarian cancer	

1. 著者名 本成登貴和, 千葉奈津子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 p433-441
3. 書名 疾患の原因遺伝子・タンパク質の解析と診断/治療技術の開発 5章 がんの発症原因となる変異遺伝子・タンパク質とその診断・治療への活用 1節. 乳がん	

1. 著者名 千葉奈津子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 p588-599
3. 書名 阻害剤・活用化剤ハンドブック 第38章 制癌剤	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学加齢医学研究所 腫瘍生物学分野 研究紹介 http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/cab/research.html</p>
--

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	城田 松之 (Shirota Matsuyuki) (00549462)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	
研究分担者	大塚 慧 (Otsuka Kei) (20772437)	東北大学・加齢医学研究所・助教 (11301)	
研究分担者	吉野 優樹 (Yoshino Yuki) (60755700)	東北大学・加齢医学研究所・助教 (11301)	

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	渡部 剛 (Watanabe Gou) (70451573)	東北医科薬科大学・医学部・准教授 (31305)	

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			
スイス	University Hospitals Geneva(HUG)			
オーストラリア	BARD1 Life Sciences Limited			