

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591656

研究課題名（和文） 新たな乳癌治療のための

家族性乳癌原因遺伝子の新規関連分子の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of a novel BRCA1-associated protein for new cancer therapy

研究代表者

千葉 奈津子（CHIBA NATSUKO）

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：50361192

研究成果の概要（和文）：家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* は、変異により乳癌、卵巣癌を引き起こす癌抑制遺伝子で、近年は散発性乳癌との関わりも注目されている。*BRCA1* は、*BARD1* とヘテロダイマーを形成し、DNA 修復や中心体制御に関与する。我々は *BARD1* に結合する新規分子 *BARD1*-interacting protein (BIP) を同定し、その機能を解析した。その結果、BIP が *BRCA1*、*BARD1* とともに中心体制御や細胞質分裂で重要な機能を担うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Germline mutations in the breast cancer susceptibility gene *BRCA1* predispose women to breast and ovarian cancers. *BRCA1* plays important roles in DNA repair and centrosome regulation, along with its heterodimer partner *BARD1*. We identified a new protein that interacts with *BARD1* (here we call it *BARD1*-interacting protein (BIP)). We found that BIP plays an important role in the regulation of centrosome amplification and cytokinesis together with *BRCA1* and *BARD1*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、化学療法、標的分子、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、欧米では女性 8～9 人に 1 人、日本では 40 人に 1 人が罹患し、患者数および死亡数は年々増加傾向にある。家族性乳癌は乳癌全体の 5% で、家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* はその 15～20% の原因遺伝子とされる癌抑制遺伝子である。*BRCA1* 生殖細胞系列変異による発症リスクは乳癌で約 80%、卵巣癌で約 40% で、若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高い。また、これらの乳癌は、

エストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロンレセプター (PgR)、HER-2 が陰性で、内分泌療法やトラスツマブに抵抗性であり、細胞障害性薬剤には、DNA 架橋剤には高感受性で、タキサン系薬剤には低感受性である。

一方、散発性癌では *BRCA1* 遺伝子変異をほとんど認めないが、*BRCA1* 遺伝子のメチル化が報告され、散発性乳癌の 30～40%、卵巣癌の 70% で *BRCA1* の mRNA やタンパク発現が減少している。さらに、それらの癌でも ER 陰

性の頻度が高く、遺伝子発現プロファイルが *BRCA1* 変異を持つ患者の乳癌と類似する。また、散発性癌の 10-15% を占める Basal-like 乳癌と言われる予後不良で、ER、PgR、HER-2 が陰性のサブグループの遺伝子発現プロファイルが *BRCA1* 変異による家族性乳癌のものと酷似し、散発性癌の中に *BRCA1* 変異による家族性乳癌に近いサブグループが存在することが明らかとなった。よって、*BRCA1* は散発性癌の発症機構、薬剤耐性機構にも関与することが推察され、*BRCA1*、あるいはその関連分子が散発性乳癌の診断や治療のバイオマーカーとなる可能性がある。

2. 研究の目的

BARD1 は *BRCA1* とヘテロダイマーを形成し、そのユビキチン化能を増強し、*BRCA1* の腫瘍由来の点突然変異により *BARD1* との結合能とユビキチン化能は阻害される。よって、*BARD1* は、*BRCA1* の癌抑制機能を制御すると考えられる。*BARD1* には、DNA 損傷後の細胞周期チェックポイントや DNA 修復に関与するタンパク質に存在することが知られている BRCT ドメインを持つ。そこで、*BARD1* の BRCT ドメインと結合する分子をプロテオミクス解析で探索したところ、*BRCA1/BARD1* 複合体に結合する新たな分子を同定した。

本研究では、この新規 *BARD1* 分子 (BIP) の機能を解析し、さらに本分子に相互作用する分子をプロテオミクス解析により同定し、それらの機能を解析する。これにより、乳癌、卵巣癌の新たな発癌機構を明らかにし、診断や治療効果予測のための新たな分子マーカーや予防や治療のための分子標的となるかどうかを検討し、臨床応用のための分子基盤を築く。

3. 研究の方法

- (1) BIP、*BARD1*、*BRCA1* の各種欠失変異体を用いて、これらの分子の結合様式を免疫沈降法や pull-down アッセイ法にて解析した。
- (2) BIP の抗体や発現ベクターを作製し、免疫染色で、BIP の細胞内の局在部位を解析した。
- (3) BIP の siRNA を用いて、その発現抑制による影響を解析した。
- (4) BIP の癌細胞株由来の変異体の機能の変化について解析した。
- (5) BIP の中心体制御能の分子メカニズムについて解析した。
- (6) プロテオミクス解析にて BIP に相互作用する分子を同定し、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1) BIP はその C 末端で、*BARD1* の BRCT ドメインに直接結合した。また BIP は、*BARD1* 非依存性に *BRCA1* の N 末端、C 末端と相互作用した。BIP と *BRCA1* の直接結合は認められなかった。また、第 2 の家族性乳癌原因遺伝子産物 *BRCA2*、分裂期キナーゼ Aurora A とも相互作用することが明らかになった。

(2) BIP に対する抗体を作製し、その細胞内局在を免疫染色にて解析したところ、BIP は間期で細胞質と中心体に局在した。分裂期では、その C 末端依存性に紡錘体極と細胞質分裂におけるミッドボディーに局在した。これらの結果は、GFP を付加した BIP や HA タグを付加した BIP を細胞に強制発現して、その局在を観察した結果と同様であった。

(3) BIP の siRNA を作製して、BIP の発現抑制による影響を解析したところ、中心体数の増加した細胞と多核細胞が増加していた。また、*BRCA1* の発現を抑制すると、中心体依存性の微小管の伸長が促進されることが知られているため、これについても解析したところ、*BRCA1* の発現抑制の結果と同様に、BIP の発現抑制により、中心体依存性の微小管の伸長が促進された。

また、BIP の shRNA を安定発現する細胞株を樹立した。タイムラプス観察で細胞分裂の状態を観察したところ、細胞質分裂の障害が観察された。また、この細胞株を用いて、細胞増殖能について検討したところ、BIP の発現抑制により、細胞増殖能が著しく低下していた。以上より、BIP が、中心体制御と細胞質分裂において機能し、細胞の癌化と細胞増殖能に関与している可能性が示唆された。

(4) 既に乳癌細胞株で BIP の homozygous 変異が同定されている。この変異体の発現ベクターを作製して細胞に導入し、その局在について、野生型の BIP を強制発現した場合と比較して解析した。内因性 BIP の影響を排除するため、BIP の 3' UTR を標的とした siRNA を同時に導入した。BIP の癌由来の変異体を導入した細胞では、中心体数の増加が認められ、また、中心体依存性の微小管の伸長も促進された。

(5) *BRCA1* は、中心体の重要な構成要素である γ -tubulin と直接結合し、*BRCA1/BARD1* の複合体で γ -tubulin をユビキチン化し、中心体を制御することが既に報告されている。

そこで、BIP と γ -tubulin との関係について解析したところ、BIP は γ -tubulin と

直接結合し、BRCA1 依存性に γ -tubulin を安定化する機能があることが分かった。この BRCA1 依存性の γ -tubulin の安定化能は、上記の乳癌細胞株由来の BIP の変異体では、消失していた。

- (6) プロテオミクス解析で BIP に相互作用する分子を同定し、その 1 つについて解析を進めた。この分子と BIP の直接結合は認められなかったが、相互作用が認められた。また、BIP と同様に中心体、紡錘体極、ミッドボディーに局在していた。この分子の siRNA を作製し、その発現抑制の影響を観察したところ、BIP と同様に、多核細胞が増加していた。また、強制発現すると、中心体数の増加と多核細胞の増加が認められた。よって、この分子が BIP とともに、中心体制御や細胞質分裂に関与している可能性が示唆された。この分子は、その発現量の高い乳癌ほど、高転移性で予後不良であることが報告されており、興味深い結果となった。

(7) 研究成果のまとめ

以上の結果より、BIP が中心体制御と細胞質分裂に関与することが明らかになり、中心体制御能に関してはその分子メカニズムも明らかにすることができた。興味深いことに、乳癌細胞株由来の変異体では、中心体制御能が低下し、BRCA1 依存性の γ -tubulin の安定化能の消失していた。よって、BIP が BRCA1 と関連した癌抑制効果を持つことが強く示唆された。

今後は、他の癌細胞株や臨床検体を用いた解析に発展させ、BIP やその関連分子が癌抑制分子として機能しているかどうかをさらに検討し、診断や治療の分子マーカーや治療のための分子標的となるかどうかをさらに検討していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Kais Z, Chiba N, Ishioka C, Parvin J D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene*, 査読有 9;31(6):799-804 2012 doi: 10.1038/onc.2011.271.
- ② Wei L, Lan L, Yasui A, Tanaka K, Saijo M, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Maseki E, Hu Y, Parvin J D, Ishioka C and Chiba N. BRCA1 contributes to transcription-coupled repair of DNA damage through polyubiquitination and degradation of Cockayne syndrome B protein. *Cancer Science* 査読有 102(10):1840-7, 2011 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02037.x.

- ③ Parvin J D, Chiba N, and Ransburgh D. Identifying the effect of BRCA1 mutations on homologous recombination using cells that express endogenous wild-type BRCA1. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2468> J. Vis. Exp. 査読有 48:e2468, 2011 doi: 10.3791/2468.

- ④ Ransburgh D, Chiba N, Ishioka C, Toland A, and Parvin J D. Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Research* 査読有 70(3):988-95, 2010 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103620>

[学会発表] (計 23 件)

- ① Chiba N, Furukawa Y, Shibata S, Kato K, Mochiduki H, Shiono M, Maseki E, and Matsuzawa A. Analysis of Tumor Suppressor BRCA1 using Molecular Imaging. The 18th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region March 6 2012 (Sendai, Japan)
- ② Matsuzawa A, Shibata S, Mochiduki H, Maseki E, , Furukawa Y, Kato K, Shiono M, and Chiba N. A novel BARD1-interacting protein regulates centrosome and cytokinesis. 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering (National University of Singapore, Singapore, Singapore) December 12, 2011
- ③ Maseki E, Shiono M, Matsuzawa A, Furukawa Y, Shibata S, Mochiduki H, Kato K, and Chiba N. Regulation of the level of BRCA1/BARD1 expression. 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, December 12 2011 (National University of Singapore, Singapore, Singapore)
- ④ Matsuzawa A, Mori T, Mochiduki H, Chiba N. SNPs of Aurora-A are involved in the centrosome regulation of BRCA1 and malignant potential of esophageal cancer. Aurora-A の一塩基多型は BRCA1 による中心体制御と食道癌の悪性度に関与する。第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3 日, 名古屋)
- ⑤ Chiba N, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Maseki E, Kanno S, Wei L, Furukawa Y, Shibata S, Ishioka C, and Yasui A. Function of BRCA1 in DNA damage repair and centrosome regulation. The 6th

- International Symposium of Institute Network, June 9 2011 (Tokyo, Japan)
- ⑥ Matsuzawa A, Kanno S, Wei L, Kashiwagi R, Maseki E, Shibata S, Furukawa Y, Ishioka C, Yasui A, and Chiba N. Identification of a novel BARD1-interacting protein and analyses of its function. 4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering (National University of Singapore, Singapore, Singapore) December 16, 2010
- ⑦ Maseki E, Kanno S, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Furukawa Y, Shibata S, Yasui A, and Chiba N. Regulatory mechanism of the level of BRCA1/BARD1 expression following DNA damage. 4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, December 16 2010 (National University of Singapore, Singapore, Singapore)
- ⑧ 柏木梨佐、古川裕美子、宇井彩子、松澤綾子、柵木絵美子、柴田峻、石岡千加史、安井明、千葉奈津子：BRCA1はDNA単鎖切断修復に関与する 第33回日本分子生物学会年会 (2010年12月8日, 神戸)
- ⑨ Maseki E, Kanno S, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Shibata S, Furukawa Y, Wei L, Ishioka C, Yasui A, and Chiba N：Regulatory mechanism of the level of BRCA1/BARD1 expression following DNA damage 第33回日本分子生物学会年会 (2010年12月8日, 神戸)
- ⑩ Matsuzawa A, Wei L, Kashiwagi R, Maseki E, Ishioka C, Yasui A, and Chiba N：Identification of a novel BARD1-interacting protein that regulates centrosome and cytokinesis 中心体と細胞質分裂を制御する新規BARD1結合分子の同定 第69回日本癌学会学術総会 (2010年9月24日, 大阪)
- ⑪ Chiba N, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Maseki E and Ishioka C：The effect of *BRCA1* missense mutations on homology directed recombination, *BRCA1*の点突然変異の相同組み換えへの影響 第69回日本癌学会学術総会 (2010年9月22日, 大阪)
- ⑫ Matsuzawa A, Kanno S, Wei L, Kashiwagi R, Maseki E, Ishioka C, Yasui A, and Chiba N. A novel BARD1-interacting protein functions at cell cycle regulation. 6th World Congress of Biomechanics, August 3 2010 (Suntec City, Singapore, Singapore)
- ⑬ Maseki E, Kanno S, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Wei L, Ishioka C, Yasui A, and Chiba N. Regulation of BRCA1/BARD1 expression after DNA damage. 6th World Congress of Biomechanics, August 3 2010 (Suntec City, Singapore, Singapore)
- ⑭ Chiba N, Kashiwagi R, Maseki E, and Matsuzawa A. Analysis of tumor suppressor gene using Molecular imaging technique for personalized medicine. The 12th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region March 26 2010 (Sendai, Japan)
- ⑮ 松澤綾子、菅野新一郎、魏雷震、柏木梨佐、柵木絵美子、石岡千加史、安井明、千葉奈津子 A novel BARD1-interacting protein functions at spindle poles and midbody to regulate mitosis and cytokinesis. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月11日, 横浜)
- ⑯ 千葉奈津子、魏雷震、田中亀代次、石岡千加史、安井明：BRCA1のコケイン症候群CSB蛋白のユビキチン化と転写共役修復への影響 第20回DNA複製・組み換え・修復ワークショップ (2009年11月1日, 滋賀県彦根市)
- ⑰ 柏木梨佐、魏雷震、松澤綾子、柵木絵美子、石岡千加史、安井明、千葉奈津子：BRCA1のDNA単鎖切断修復能における機能 第20回DNA複製・組み換え・修復ワークショップ (2009年11月1日, 滋賀県彦根市)
- ⑱ 千葉奈津子、魏雷震、田中亀代次、安井明、石岡千加史：BRCA1 polyubiquitinates CSB protein in transcription-coupled repair of UV damage、転写と共役したDNA修復においてBRCA1がコケイン症候群CSB蛋白をユビキチン化する 第68回日本癌学会学術総会 (2009年10月3日, 名古屋)
- ⑲ Chiba N, Matsuzawa A, Wei L, Kashiwagi R, Maseki E, Yasui A, and Kanno S. Identification of a new target of cancer therapy by a proteomic study. The 10th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region April 16 2009 (Christchurch, New Zealand)

[図書] (計6件)

- ① Chiba N and Wei L. BRCA1 is involved in the transcription-coupled repair of UV lesions. Nano-Biomedical Engineering 2011, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical

- Engineering Education and Research Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p509-519, 2012
- ② Maseki E, Shiono M, Matsuzawa A, Wei L, Kashiwagi R, Furukawa Y, Shibata S, Mochiduki H, Kato K, and Chiba N. Regulation of BRCA1 and BARD1 expression levels in Response to DNA damage Nano-Biomedical Engineering 2011, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p613-618, 2012
- ③ Matsuzawa A, Wei L, Kashiwagi R, Shibata S, Mochiduki H, Maseki E, Furukawa Y, Kato K, Shiono M, and Chiba N. Identification of a novel BARD1-interacting protein and an analysis of its function in the regulation of mitosis. Nano-Biomedical Engineering 2011, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p619-624, 2012
- ④ Wei L, Kashiwagi R, Furukawa Y, Kato K, and Chiba N. BRCA1 responds to DNA damage induced by laser-irradiation. Nano-Biomedical Engineering 2011, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p655-660, 2012
- ⑤ Chiba N and Wei L, Analysis of Tumor Suppressor Gene Using Molecular Imaging for Personalized Medicine, Nano-Biomedical Engineering 2009, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p339-349, 2009
- ⑥ Wei L and Chiba N. Analysis of BRCA1 Accumulation at DNA Double-Strand Breaks Using a Molecular Imaging technique, Nano-Biomedical Engineering 2009, Proceeding of the Tohoku University Global Centre of Excellence Programme, Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research

Network Centre, Editor Takami Yamaguchi, Imperial College Press, p459-465, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/field_list/neurogenetics/ts_nchiba

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 奈津子 (CHIBA NATSUKO)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号：50361192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菅野 新一郎 (KANNO SHIN-ICHIRO)
(東北大学・加齢医学研究所・講師)
研究者番号：10400417