

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650592

研究課題名（和文）MT1 - MMPの中心体制御を介した新規がん形質転換機構の解明

研究課題名（英文）Analysis for a new mechanism of neoplastic cell transformation through the centrosome control with MT1-MMP

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）：BRCA2はDNA修復、複製、中心体増幅、および細胞分裂において重要な多機能の腫瘍抑制タンパク質である。我々はヒト乳がん細胞株MCF7において、野生型BRCA2（分子量：384 kDa）の他に分子量250 kDaのBRCA2フラグメントを見出した。これは他の乳がん細胞株SK-BR-3や子宮頸がん由来のHeLaS3でも同様に観察されが、良性乳腺繊維嚢胞症由来のMCF10Aや正常乳腺上皮由来のHMECでは検出されなかった。我々は多重反応モニタリング法（MRM）によりこの250 kDaのタンパク質がBRCA2であることを確認した。次にBRCA2を切断する可能性のあるプロテアーゼとして細胞膜結合型マトリクスメタロプロテアーゼMT1-MMPを考え、BRCA2のN末から約250 kDaの位置にMT1-MMPによる切断部位を見出し、この推定切断部位を含むリコンビナントタンパクを基質とした *in vitro* 解析で、MT1-MMPによるリコンビナントタンパクの切断を確認した。この切断は、MT1-MMPの阻害剤によって抑制された。そこで、切断型BRCA2の機能を明らかにするために、BRCA2の切断端に対する抗体を作成し、各々N端側BRCA2フラグメント（N-BRCA2）、C端側BRCA2フラグメント（C-BRCA2）を特異的に認識することを確認した。これを用いて、C-BRCA2が核fociを形成すること、10Gyの放射線照射後、野生型BRCA2の核fociは核中心部から核膜に向かい蛍光強度が増加するのに対しC-BRCA2の核fociの蛍光強度は核内均一であった。以上より、我々はBRCA2がMT1-MMPの基質であり、切断型C-BRCA2が組換え修復や乳がん発生に重要な役割を果たす可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：BRCA2 is a multifunctional tumor suppressor protein with critical roles in DNA repair, replication, centrosome amplification, and cytokinesis. We previously identified the complexes of BRCA2 and membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). In addition, we found the cleaved BRCA2 by MT1-MMP in cancer cells. To examine the role of the cleaved BRCA2 fragments, we generated cleavage-site-directed antibodies, which specifically recognize each of the fragments of BRCA2 (N-BRCA2 or C-BRCA2). Immunofluorescence analysis revealed that C-BRCA2 localizes to discrete nuclear foci. We measured the fluorescence intensity of the wild-type BRCA2 and C-BRCA2 nuclear foci in HeLa cells exposed to 10 Gy of ionizing radiation at several time points after irradiation. Interestingly, the intensity of wild-type BRCA2 foci was stronger near the

nuclear envelope compared with the central part, but the intensity of cleaved C-BRCA2 foci was distributed evenly in the nucleus after irradiation. We suggest that BRCA2 is a cleavage target of MT1-MMP and that cleaved C-BRCA2 may play an important role in HR and breast oncogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：ゲノム安定性・発がん・がん抑制遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

MT1-MMP の生理的機能は、細胞外マトリックス (ECM) 成分の破壊や膜タンパク質のプロセッシングを介して細胞の遊走・浸潤を促進させることである。これまで MT1-MMP の基質は、ECM 成分や細胞表面分子が報告されてきたが、近年、MT1-MMP が中心体に局在して、中心体の構成タンパク質であるペリセントリンを切断することが報告されたことは、非常に驚きである。このような背景のもと、申請者らはこれまでの研究から、中心体に局在する BRCA2 タンパク質が、MT1-MMP によって切断され、約 250kD の切断型 BRCA2 を乳癌細胞株 MCF7 と SK-BR3 細胞において検出した。興味深いことに、正常ヒト乳腺上皮細胞の HMEK から切断型 BRCA2 は検出されなかった。MMP は、多くの癌細胞で発現亢進が見られることから、この切断システムは中心体で癌細胞特異的に作用している可能性がある。中心体における MT1-MMP の活性を調べることは、新しい MT1-MMP の細胞制御機能とその機能破綻による中心体制御異常、延いては発癌メカニズムの解明に繋がる

### 2. 研究の目的

近年、細胞膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼの MT1-MMP は細胞膜以外に中心体にも局在することが報告されており、MT1-MMP の機能は、細胞外マトリックス成

分の分解にとどまらず、中心体という新たな作用機序の場が示された。申請者らもこれまでに、中心体に局在する遺伝性乳癌原因遺伝子産物の BRCA2 タンパク質が、MT1-MMP によって切断されることから、MT1-MMP の中心体局在を見出していた。本研究では、これまでに報告されてきた MT1-MMP の細胞外マトリックス成分を基質とした細胞浸潤・転移、血管新生での作用機構に加え、全く新しい中心体での細胞制御機構に焦点をあてその機能解明を目的とする。MT1-MMP の制御因子である BRCA2 を 1 つのモデルケースと考えた場合、次のような問題が考えられる。1) 切断型 BRCA2 は野生型の BRCA2 に比べて生理的機能に違いはあるのか、この点について現段階で明確な答えはないが、遺伝性乳癌患者の中には、遺伝子の変異で C 末端が欠損したタイプの BRCA2 が検出されていることから、C 末端切断型 BRCA2 が乳癌の発癌形質転換に関与している可能性は十分考えられる。また、2) 細胞膜結合型のメタロプロテアーゼである MT1-MMP は、どのようなメカニズムで中心体に移動するのか、この点に関しては、エンドサイトーシスによって取り込まれた MT1-MMP が細胞内を移動すると考えられているが、詳細は明らかではない。現時点で本研究は、多くの未解決問題を含んでいるが、中心体における MT1-MMP の新しい基質の発見が、中心体制御機構を明らかにして、MT1-MMP の新

しい発癌形質転換機構を解明する大きなチャンスである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 切断型 BRCA2 の同定

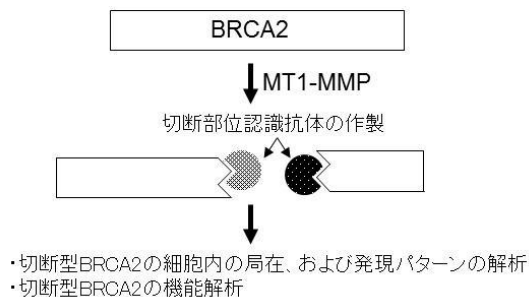
切断型 BRCA2 の生理的機能を調べるため、MT1-MMP による BRCA2 の切断パターンを解析して切断部位を同定する。

- a. MT1-MMP による BRCA2 の切断パターンを調べる。

現時点で BRCA2 の切断は、N 末端から約 250k 付近が切断されることを見出した。切断箇所がこの 1 点だけなのか、他の箇所でも切断されているのか調べるため、HA-BRCA2 に活性型 MT1-MMP を反応させて HA 抗体で免疫沈降した沈降物を質量分析計で解析する。

- b. BRCA2 の切断部位の同定

切断付近の情報から、10 アミノ酸程度の合成ペプチドを作製して、これを直接活性型 MT1-MMP と反応させて、質量分析計で切断部位を同定する。



#### (2) 切断型 BRCA2 の細胞内の局在、および発現パターンの解析

切断型 BRCA2 認識抗体を用いて、以下の項目を明らかにする。

- a. 切断型 BRCA2 特異的認識抗体の作製  
切断型 BRCA2 の発現、および機能解析のため、切断型認識抗体を作製する。切断部位のペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作製する。
- b. 正常、および乳癌組織での切断型 BRCA2 の発現の比較  
組織アレイを用いて、正常と乳癌組織で

の切断型 BRCA2 の発現比較を行うため組織免疫染色を行う

- c. 切断型 BRCA2 の細胞内の局在および機能解析

野生型を BRCA2 と切断型 BRCA2 の局在の比較を行うため間接蛍光抗体法を用いて乳癌細胞株でその局在を観察し、また癌の浸潤に切断型 BRCA2 が影響を及ぼすのかを明らかにする。

- d. 切断型 BRCA2 の細胞周期での切断時期の解析

切断型 BRCA2 が細胞周期依存的に起きるのかを調べるため、S 期に同調させた MCF7 細胞を経時的にサンプリングして、免疫ブロットにて切断型の検出を行う

- e. 切断型 BRCA2 と結合するタンパク質の同定

切断型 BRCA2 の生理的機能を調べるため、これらのポリペプチドと結合するタンパク質を同定する。切断部位を決定後、切断型 BRCA2 発現系を構築し、細胞内で発現して免疫沈降法で沈降物を質量分析計で同定する。

- f. 切断型 BRCA2 を細胞内で過剰発現させて、細胞の浸潤性への影響を調べる

浸潤性の MCF7 と非浸潤性の MDA-MB231 細胞での切断型 BRCA2 の発現を比較する。さらに切断型 BRCA2 を過剰発現させた時に細胞の遊走、および浸潤能に影響を及ぼすのかを調べる。

#### (3) 中心体における MT1-MMP の新しい基質を探索

- a. 中心体における MT1-MMP の基質の探索として、プロテアーゼ活性を阻害した細胞から中心体を調製する。その後、MT1-MMP 抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析計で網羅的にタンパク質を同定する。

- b. 同定した新規基質タンパク質に関し、BRCA2 をモデルとした解析方針と同様に、切断型タンパク質の確認とその中心

体ダイナミクスにおける制御機構および機能を解析し、さらに複数の候補基質タンパク質を系統的に解析して得られた情報を統合し、MT1-MMPの中心体ダイナミクスにおける制御機構の全容の解明を目指す。

#### 4. 研究成果

BRCA2はDNA修復、複製、中心体増幅、細胞質分裂における重要な役割を持つ多機能な癌抑制タンパク質である。我々はこれまでにBRCA2とmembrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)との複合体を確認した。さらに我々は癌細胞においてBRCA2がMT1-MMPにより切断されることをみいだした。切断されたBRCA2断片の機能を解析するために、我々は切断されたBRCA2のそれぞれの切断点を特異的に認識する抗体を作製した。それらの抗体を使用した免疫染色解析により、BRCA2のC端側断片タンパクが、核内fociを形成することを明らかにした。さらに10Gyの放射線照射後、正常型BRCA2とC端BRCA2の核内fociの蛍光強度を測定した結果、正常型BRCA2は、核の中心部に比べ核膜近傍のfociの蛍光強度が強く、C端BRCA2は変化が認められないことが確認された。以上より、BRCA2はMT1-MMPの基質であり、C端BRCA2断片タンパクはDNA損傷の組換え修復、及びそれに基づく乳癌発癌に重要な役割を果たしている可能性を示した。

#### 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12件)

1. Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y.L. and Mano, H. (2013) Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 3029-34.
2. Wang, L., Tsutsumi, S., Kawaguchi, T., Nagasaki, K., Tatsuno, K., Yamamoto, S., Sang, F., Sonoda, K., Sugawara, M., Saiura, A., Hirono, S., Yamaue, H., Miki, Y., Isomura, M., Totoki, Y., Nagae, G., Isagawa, T., Ueda, H., Murayama-Hosokawa, S., Shibata, T., Sakamoto, H., Kanai, Y., Kaneda, A., Noda, T. and Aburatani, H. (2012) Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*, **22**, 208-19.
3. Taira, N., Mimoto, R., Kurata, M., Yamaguchi, T., Kitagawa, M., Miki, Y. and Yoshida, K. (2012) DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin Invest*, **122**, 859-72.
4. Suzuki, K., Dashzeveg, N., Lu, Z.G., Taira, N., Miki, Y. and Yoshida, K. (2012) Programmed cell death 6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Sci*, **103**, 1788-94.
5. Satoh, Y., Sugai, S., Uehara, H., Mun, M., Sakao, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., Miki, Y. and Miyata, S. (2012) Clinical impact of intraoperative detection of carcinoembryonic antigen mRNA in pleural lavage specimens from nonsmall cell lung cancer patients. *Thorac Cardiovasc Surg*, **60**,

- 533-40.
6. Sakamoto, K., Fujii, T., Kawachi, H., Miki, Y., Omura, K., Morita, K., Kayamori, K., Katsube, K. and Yamaguchi, A. (2012) Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest*, **92**, 688-702.
  7. Khanom, R., Sakamoto, K., Pal, S.K., Shimada, Y., Morita, K., Omura, K., Miki, Y. and Yamaguchi, A. (2012) Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse pathophysiologies. *Histol Histopathol*, **27**, 949-59.
  8. Iyevleva, A.G., Kuligina, E., Mitiushkina, N.V., Togo, A.V., Miki, Y. and Imyanitov, E.N. (2012) High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, **131**, 1049-59.
  9. Elgazzar, S., Zembutsu, H., Takahashi, A., Kubo, M., Aki, F., Hirata, K., Takatsuka, Y., Okazaki, M., Ohsumi, S., Yamakawa, T., Sasa, M., Katagiri, T., Miki, Y. and Nakamura, Y. (2012) A genome-wide association study identifies a genetic variant in the SIAH2 locus associated with hormonal receptor-positive breast cancer in Japanese. *J Hum Genet*, **57**, 766-71.
  10. 三木 義男; [がん種別の個別化治療の最前線] BRCA 遺伝子と個別化治療. がん分子標的治療 10 巻 1 号, 13-18, (2012)
  11. 三木 義男; [遺伝性乳癌卵巣癌診療の新時代] BRCA1 と BRCA2 遺伝子産物の機能 基礎から臨床. 癌と化学療法 39 巻 4 号, 498-501, (2012)
  12. 齊藤 広子, 三木 義男; [乳癌(第2版)-基礎と臨床の最新研究動向-] 乳癌の分子生物学と発癌機序 発癌機序 乳癌の発癌機序 概論(分子機構、多段階発癌機序を含めて). 日本臨床 70 巻増刊 7 乳癌, 92-96, (2012)
- [学会発表] (計 8 件)
1. 三木 義男, 中西 啓; BRCA2 の新規機能と合成致死理論に基づく新規乳癌治療法開発の可能性. 第 20 回日本乳癌学会学術総会、熊本市、2012 年 6 月 28-30 日
  2. 三木 義男, 中西 啓; Hereditary breast/ovarian cancer -New development of the molecular diagnosis and treatment- 遺伝性乳がん・卵巣がん症候群-分子診断・治療の新たな展開-. 第 71 回日本癌学会学術総会シンポジウム、札幌市、2012 年 9 月 19 日-21 日
  3. 宮口 健, 郭 甜甜, 三木 義男, 中西 啓; Phosphorylation of BRCA2 by Akt is involved in BRCA2-14-3-3 gamma interaction related to centrosome dynamics 中心体制御に関わる BRCA2 - 14-3-3 $\gamma$  複合体形成には Akt による BRCA2 のリン酸化が関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日-21 日
  4. 木村 仁美, 中西 啓, 三木 義男; Proteasome activity affects cancerous centrosome hypertrophy プロテアソームの活性は癌細胞における中心体の肥大化に影響する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日-21 日
  5. 高岡 美帆, 齊藤 広子, 中西 啓, 三木 義男; BRCA2 contributes success of cytokinesis through regulation of

non-muscle myosin IIC ATPase activity 乳癌原因遺伝子産物 BRCA2 は II 型ミオシン IIC の ATPase 活性の制御を通して細胞質分裂に働く。第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日-21 日

6. 石場 俊之, 中西 啓, 高木 洋子, 笠原 舞, 杉本 斉, 永原 誠, 中川 剛士, 佐藤 隆宣, 杉原 健一, 三木 義男; The correlation of decorin and periostin indicated by the proteomics of phyllodes 葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いた decorin と periostin の関連性. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日-21 日
7. 中西 啓, Nadila Wali, 斉藤 広子, 大海 忍, 三木 義男; 切断型 BRCA2 の形成機序および機能解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会、新宿区、10 月 25 日-27 日
8. Miyaguchi K, Miki Y, Nakanishi A; Phosphorylation of BRCA2 by Akt is involved in BRCA2-14-3-3 gamma interaction related to centrosome dynamics. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer、Kanazawa、2012/11/15-17

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/genomics/mg/index.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: 1 0 2 8 1 5 9 4

(2)研究分担者

中西 啓 (NAKANISHI AKIRA)

東京医科歯科大学難治疾患研究所・特任准教授

研究者番号: 5 0 3 2 1 7 9 0

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: