

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300328

研究課題名(和文) BRCAの機能解析と合成致死に基づく標的分子探索

研究課題名(英文) Functional analysis of BRCA genes and searching for molecular partner for synthetic lethality.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA2と合成致死効果を示す低分子化合物を見出すため、化合物ライブラリーを用いてスクリーニングし、BRCA2と微小管脱重合阻害剤が合成致死性を示すことを見出した。このメカニズムを明らかにするため、微小管重合アッセイを行った結果、BRCA2ノックダウン細胞にPaclitaxelを添加すると、Paclitaxel単剤に比べて重合微小管の割合は有意に増加し、これは、微小管の過重合による合成致死を示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：We have reported the potential synthetic lethality relationships between BRCA2 deficiency and paclitaxel (PTX). To date, PTX treatment of BRCA2-siRNA knockdown cells has been found to result in a significant increase in microtubule polymer mass. To investigate whether the BRCA2 protein forms the microtubule cytoskeleton complex, we performed immunoprecipitation experiments using anti-BRCA2 antibody. Analysis of the immunoprecipitate by mass spectrometry identified the microtubule-associated proteins (MAP2, MAP4, and Tau) that directly bind microtubules to promote microtubule stabilization. Furthermore, a cell-based tubulin polymerization assay following the treatment of the siRNA knockdown of BRCA2 revealed microtubule stabilization by the effect of MAP4. In this study, we identified MAP4 as a new binding partner of BRCA2, suggesting that a synergistic effect of PTX and MAP4 on tubulin assembly contributes to microtubule stabilization.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳がん BRCA2 合成致死 化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

乳がんのリスク因子として、まず、遺伝的因子が挙げられ、古くから常染色体優性遺伝性の乳がん家系が知られており、我々は1994年に遺伝性乳がん原因遺伝子 BRCA1 (Miki et al. Science 266: 66-71, 1994) を、1995年に Wooster R.らが BRCA2 を同定した。これまでの BRCA1/2 の DNA 損傷修復機能のみならず、中心体ダイナミクスの制御、染色体分配の制御、細胞質分裂の制御など、細胞周期の種々のフェーズで、また、細胞内の種々の場所で機能する BRCA の解析をさらに進め、それらの情報から細胞周期全体に及ぶ BRCA の「ゲノムの安定性維持機能」の系統的なネットワーク構築が重要である。加えて、これらの情報を駆使し、分子標的療法の有効性改善、または、新規分子標的の検出を目的として合成致死 (synthetic lethality) 理論に基づく新規パートナーの同定が必要である。これについては、BRCA の DNA 損傷修復機能のみならず、中心体制御機能、染色体分配制御機能、細胞質分裂 (cytokinesis) 制御機能にも合成致死理論を当てはめ新規標的分子の探索が可能である。また、Cdk1 は BRCA1 をリン酸化し、これは BRCA1 の DNA 修復能に必須である。Cdk1 を阻害すると BRCA1 機能が障害され、細胞の相同組換えによる DNA 修復能力を損なう。これは BRCA 活性型のがんに対する PARP 阻害剤の有用性を拡大する戦略を示唆すると同時に、標的を BRCA の DNA 修復機能から他の機能に広げることで BRCA 活性型のがんに対する新たな分子標的の検出の可能性を示すものである。

2. 研究の目的

乳がん発生の分子機構に関わる BRCA1、BRCA2 の「ゲノムの安定性維持機能」の解明を目的とする。これまで DNA 損傷修復機能に焦点が当てられてきたが、中心体ダイナミクスの制御、染色体分配の制御、細胞質分裂の制御など、種々のフェーズ、種々の場所で機能する BRCA の解析をさらに進め、それらの情報から細胞周期全体に及ぶ BRCA の「ゲノムの安定性維持機能」の系統的なネットワーク構築を目指す。加えて、これらの情報を駆使し、分子標的療法の有効性改善、または、新規分子標的の検出を目的として、合成致死 (synthetic lethality) 理論に基づくスクリーニングを行う。その結果、BRCA 変異陽性 (不活性型) 乳がんに対する新規分子標的の検出、BRCA 活性型乳癌に対する PARP 阻害剤併用療法の改善や新規分子標的の検出が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 「ゲノムの安定性維持」ネットワークの解明

中心体制御機構、染色体分配制御、cytokinesis において BRCA と協同で機能する分子の探索・同定

- 中心体における BRCA2 結合タンパク質の同定、および機能解析
HeLaS3 細胞から中心体を抽出して抗 BRCA2 抗体で免疫沈降を行い、質量分析装置 (現有機器) で網羅的に BRCA2 に結合するタンパク質を同定する (すでに 20 種の候補を同定済み)。
- siRNA による結合タンパク質の発現抑制後、中心体の観察
HeLaS3 細胞に対して、同定したタンパク質を siRNA によって発現抑制させる。その後、中心体の指標である抗 γ -Tubulin 抗体で免疫染色を行い、中心体の異常を観察し、中心体機能に影響を及ぼす分子を同定する。
- 中心体局在シグナル (Centrosomal Localization Signal; CLS) の中心体移行メカニズムについて、CLS 配列が直接モータータンパク質であるダイニンに結合して中心体へ移行することを明らかにした。詳細な機能解析を進める。
- M 期染色体に BRCA2 が存在することは確認しており、さらにその結合分子候補として HP-1 タンパクを同定し、染色体分配にかかわる機能を解析する。
- 細胞質分裂期の中体体に BRCA2 と NMHC IIC が局在し、協同で分裂完了に機能していることを見出している。この知見を基盤に細胞質分裂における BRCA 機能を解析する。
- ヒト細胞遺伝子改変法により不死化乳腺上皮細胞から BRCA1/2 ヘテロ欠失細胞クローンを作製し、網羅的遺伝子発現解析、定量的プロテオミクス解析により、BRCA1/2 ヘテロ欠失による下流分子発現の変化を調べる。ゲノム安定性維持に関わる分子の発現量の変化情報から、BRCA と関連分子の相互制御機構の探索、同定を行う。また、BRCA1/2 ヘテロ欠失細胞クローンに野生型 BRCA1/2 を発現させ情報の確認を行う。

(2) BRCA を中心とするネットワークの合成致死性スクリーニング

「ゲノムの安定性維持」ネットワークの解明から得られた情報を基にタンパク質ネットワークを開発し、新たに解明されたタンパク質ネットワークを構成するタンパク質を標的に低分子干渉 RNA スクリーニングを用いて BRCA 変異陽性 (不活性型) 細胞株、BRCA 活性型細胞株の検討を、精力的に推進する。

BRCA 変異陽性 (不活性型) 細胞株を用いて、中心体制御機構、染色体分配制御、cytokinesis において BRCA と協同で機能する新たに解明された分子を単独で抑制して、細胞の生存性を観察し低下するものを候補とする。

BRCA 活性型細胞株については、BRCA に関わる新たに解明されたキナーゼの情報を基に、それぞれのキナーゼの阻害剤との併

用で低分子干渉 RNA を用いたスクリーニングを行い、細胞の生存性を観察し低下するものを候補とする。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制スクリーニング

我々は、PARP1 阻害剤とは異なる機構で合成致死効果を示す低分子化合物を見出すため、東京医科歯科大学医療機能分子開発室所有の化合物ライブラリーを用いて、WST-1 試薬を用いた細胞増殖抑制効果のスクリーニングを行ってきた (図 1)。

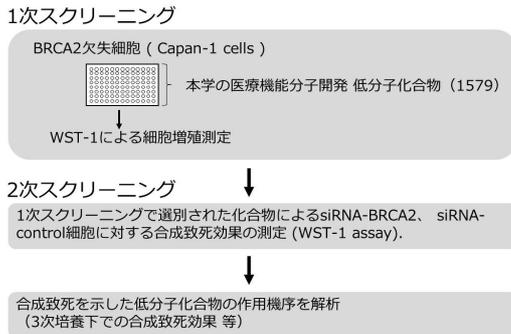


図 1、合成致死スクリーニングの流れ

(2) 1 次スクリーニング

これまでに BRCA2 欠失細胞 (Capan-1 細胞) に対して低分子既知化合物 1579 個の増殖抑制効果を測定した結果、53 化合物がヒットした。この 1 次スクリーニングでヒットした抗がん剤 (33%) は、以下の 3 つに分類された (図 2)。DNA 複製阻害剤、代謝拮抗剤、微小管機能阻害剤。

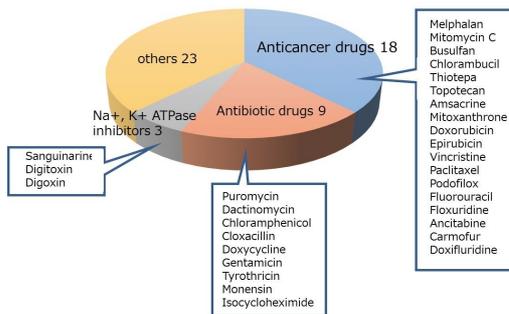


図 2、1 次スクリーニングでヒットした化合物

(3) パクリタキセルによる合成致死効果

2 次スクリーニングとして、各グループの代表的な抗がん剤である Doxorubicin (DNA 複製阻害剤)、Paclitaxel (微小管阻害剤)、Fluorouracil (代謝拮抗剤) に対して、BRCA2 との合成致死性を検討した結果、BRCA2 と Paclitaxel の組合せで合成致死性が観察された。さらに、Paclitaxel 以外の微小管阻害剤である Vincristine、Mebendazol、Albendazole、Epothilone A、Docetaxel でも細胞増殖抑制が見られるかを検討した結果、微小管脱重合

阻害剤の Epothilone A と Docetaxel は Paclitaxel と同様に細胞増殖抑制を示したが、微小管重合阻害剤の Vincristine と Mebendazol と Albendazole は細胞増殖抑制を示さなかった。このことから、BRCA2 と微小管脱重合阻害剤が合成致死性を示すことが示唆された。

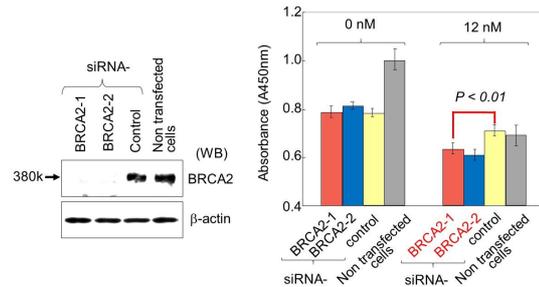


図 3、パクリタキセルによる合成致死効果

(4) 3 次元培養における合成致死性解析

次に、BRCA2 ノックダウン細胞の 3 次元 (3D) 培養に対して、パクリタキセルが合成致死を誘導するのかを検討した。スフェロイドを形成しやすい乳がん T-47D 細胞に対して、BRCA2 をノックダウンさせた後、パクリタキセルを添加した結果、パクリタキセル単剤に比べて 3D スフェロイド形成は有意に阻害された (図 4)。

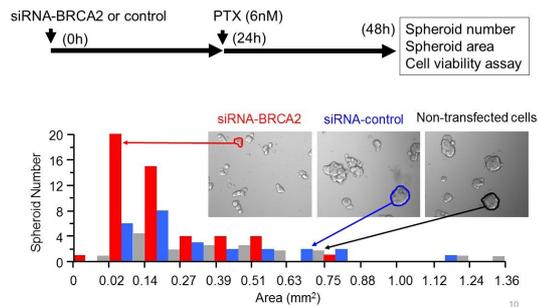


図 4、3 次元培養における合成致死性解析

(5) 微小管重合アッセイ

そこで、BRCA2 の欠失とパクリタキセルとの併用による合成致死性効果のメカニズムを明らかにするため、微小管重合アッセイを行った。その結果、BRCA2 ノックダウン細胞にパクリタキセルを添加すると、パクリタキセル単剤に比べて重合微小管の割合は有意に増加した (図 5)。

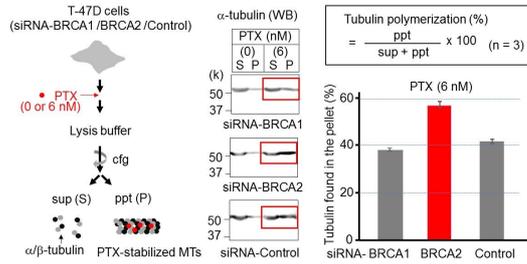


図 5、微小管重合アッセイ

そこで、このメカニズムを解析するため、抗 BRCA2 抗体を使って免疫沈降実験を行い BRCA2 タンパク質が微小管細胞骨格複合体を形成するかどうか調査した。質量分析装置による免疫沈降物の分析の結果、微小管安定化を促進するために微小管を直接結びつける微小管関連タンパク質 (MAP2、MAP4 と Tau) を特定した。さらに、BRCA2 の siRNA ノックダウン後の細胞による微小管重合分析法において、MAP4 の影響によって、微小管が安定化されることを明らかにした (図 6)。

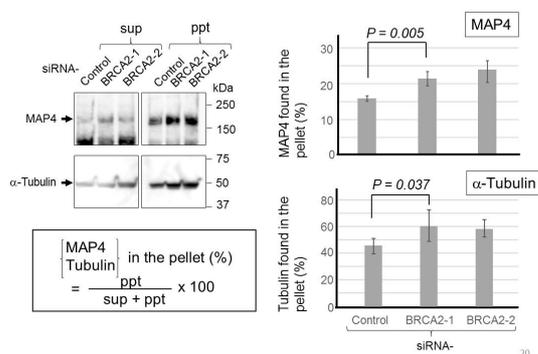


図 6、重合した微小管内の MAP4 存在量

これらの結果は、BRCA2 の欠失とパクリタキセルとの併用は、パクリタキセルと MAP4 の微小管重合に対する相乗的效果が、微小管の重合・脱重合の動的不安定性を過剰な重合安定性に向かわせていることで、合成致死効果を発揮する可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Wali N, Hosokawa K, Malik S, Saito H, Miyaguchi K, Imajoh-Ohmi S, Miki Y, Nakanishi A: Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 443(4):1148-1154. (査読有)

Takaoka M, Saito H, Takenaka K, Miki Y, Nakanishi A: BRCA2 phosphorylated by

PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. *Cancer Res* 2014, 74(5):1518-1528. (査読有)

Kimura H, Miki Y, Nakanishi A: Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. *Cell Cycle* 2014, 13(12):1928-1937. (査読有)

Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A: Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion. *Sci Rep* 2014, 4:7069. (査読有)

Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S *et al*: Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer* 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 29 件)

中西 啓, 三木 義男; BRCA2 の新規機能解明に基づく診断・治療法の開発. 第 73 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2014 年 9 月 25 日 27 日

高岡 美帆, ナディラ ワリ, 斎藤 広子, 中西 啓, 三木 義男; M 期中心体における MT1-MMP の BRCA2 タンパク分解. 第 73 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2014 年 9 月 25 日 27 日

宮口 健, 井元 清哉, 牛嶋 大, 松浦 正明, 玉田 嘉紀, 山口 類, 宮野 悟, 三木 義男; 乳がん患者のパクリタキセル応答性に関わる遺伝子ネットワーク解析. 第 73 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2014 年 9 月 25 日 27 日

大石 陽子, 黒田 一, 川村 雄大, 斎藤 賢将, 野谷 啓之, 川村 徹, 佐藤 康, 密田 亜希, 中嶋 昭, 三木 義男; 機能ネットワークからみた乳癌予測因子の探索. 第 22 回日本乳癌学会学術総会、大阪府大阪市、2014 年 7 月 10 日 12 日

三木 義男; 遺伝性乳がん卵巣がん症候群(HBOC)と遺伝カウンセリング 遺伝性乳がん原因遺伝子の発見から新しい治療開発への展望. 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、大阪府東大阪市、2014 年 6 月 26 日 29 日

石場 俊之, 中西 啓, 永原 誠, 中川 剛

土, 佐藤 隆宣, 円城寺 恩, 大野 玲, 飯田 聡, 植竹 宏之, 杉原 健一, 三木 義男; 葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いた periostin 欠乏による decorin の細胞外放出. 第 114 回日本外科学会定期学術集会、京都府京都市、2014 年 4 月 3 日 5 日

三木義男; 新規 BRCA 機能とそれに基づく合成致死療法の開発. 第 51 回日本癌治療学会学術集会、京都府京都市、2013 年 10 月 24 日 26 日

高岡美帆、齊藤広子、中西啓、三木義男 ; Identification of the clinical significance of a hereditary breast cancer-associated missense mutation (T77A) of BRCA2. 遺伝性乳癌患者でみられる BRCA2 遺伝子内の変異が細胞質分裂に与える影響. 第 72 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2013 年 10 月 3 日 5 日

中西啓、木村仁美、三木義男 ; The relevance of centrosomal maturation and genome stability. 中心体の成熟化とゲノム安定性との関連性. 第 72 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2013 年 10 月 3 日 5 日

石場俊之、中西啓、高木洋子、永原誠、中川剛士、佐藤隆宣、杉原健一、三木義男 ; Decorin secretion from cancer cells with periostin deficiency significantly decreased the cancer migration and invasion. ペリオスチン欠損によるデコリンの分泌は癌細胞の遊走・浸潤を抑制する. 第 72 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2013 年 10 月 3 日 5 日

三木義男 ; DNA repair and synthetic lethal approaches to cancer therapy. DNA 修復機能不全と合成致死療法. 第 72 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2013 年 10 月 3 日 5 日

三木 義男, 高岡 美穂, 中西 啓 ; 新規 BRCA 機能とその合成致死療法への展開. 第 19 回日本家族性腫瘍学会学術集会、大分県別府市、2013 年 7 月 26 日・27 日

〔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 : 10281594

(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・准教授

研究者番号 : 50321790

竹中 克也 (TAKENAKA Katsuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号 : 20378706