

令和元年6月17日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06833

研究課題名(和文) DNA修復と中心体複製異常を指標にしたBRCAの分子内発癌抑制責任部位の特定

研究課題名(英文) Molecular regions of BRCA proteins responsible for cancer suppression

研究代表者

竹中 克也 (Takenaka, Katsuya)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・技師・研究員

研究者番号：20378706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌原因遺伝子BRCA2は二重鎖切断DNAの相同組換え修復に関与するとともに、中心体複製制御にも役割を果たしている。中心体数の異常は癌化過程に特徴的な染色体の異常分配や多核形成を引き起こす。超巨大分子であるBRCA2と他分子の相互作用が中心体数を正確に制御し発癌を抑制している可能性を検証した。非常に多くの顕微鏡像から高精度に中心体数を計数する必要があったため、画像認識技術を用いた自動計数系を開発し人力では困難な検体数の解析を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

比較的小型で発現量も多い分子については多種多様な生化学・細胞生物学的手法によって解析が進んできたが、BRCAのような発現量の少ない超巨大分子については実験手法の制約により分子機構が臨床応用可能なレベルにまで解明されていない。そのため画期的な解析手法の導入と独創的な定量法の開発により、これまで解析が回避されてきた超巨大分子についても効率良く高精度なスクリーニングを可能にした。治療につながる開発標的を見出す標準の確立により癌診断・治療に強く波及し得ることから国民の要請に応えられる。

研究成果の概要(英文)：BRCA2 germline mutations account for the majority of heredity breast and ovarian cancer. A major function of BRCA2 is known as a regulator of homologous recombination in DNA damage repair. In addition, BRCA2 also plays an important role in centrosomal regulation, whose dysfunction might be involved in the tumorigenesis of breast cancer. Though, detail molecular mechanism was not uncovered. In the present study, we tried to locate a molecular region of BRCA2 responsible for this function. Numbers of centrosome in a cell are counted to see if an overexpression of a specific fragment of BRCA proteins could impair a numerical integrity of centrosomes. For this purpose we developed an automated centrosome-counting system based on image recognition, which allows us to judge a large number of transfected cells without human bias.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：中心体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌原因遺伝子 BRCA1/2 (BRCA) については、その機能欠損が乳癌発癌の大きな要因であることは遺伝学的解析より明らかであった。正常細胞においては概してゲノムの安定維持に貢献していると考えられ、詳細には少なくとも以下の2つの機能を持っていると考えられてきた。

- (1) DNA 損傷修復：放射線等による DNA 二重鎖切断の相同組換え修復における機能
- (2) 中心体複製制御：細胞周期の S 期に一度だけ複製される中心体の個数を制御し、M 期に異常な中心体数にならないようにする機能。これにより細胞分裂時における染色体の均等な分配を保証する。癌細胞に特徴的な、無核や多核の細胞の出現を防ぐ

このように BRCA は発癌抑制の複数の経路それぞれで重要な鍵となる分子である。そのため BRCA を臨床開発の標的とすることによって発癌の抑制あるいは癌治療に最大の効果が得られる可能性が高いと考えられた。しかしそのためには、当分子のみに留まらず相互作用する分子を含めた関連分子の系統的な機能ネットワーク全体像の解明が必要であった。

我々は早くから BRCA の重要性に着目し、その機能を明確にするために相互作用分子の同定に注力してきた。まず BRCA2 についてツーハイブリッド法を用いた結合分子の探索を行なった。成果の一つとして BJ-HCC-20A を新規に BRCA2 と細胞内で相互作用する分子として特定した。BJHCC-20A は癌 精巢抗原の一つで、二重鎖切断によるアポトーシス誘導時に強発現すると細胞死を抑制したことから、BRCA2 と協調して DNA 損傷修復時の情報伝達に関与しており乳癌治療の標的になり得ると考えられた。

このように一定の成果を得た一方、この探索法には以下の非効率な点が見られた。

- (1) BRCA2 は巨大分子 (3,418 アミノ酸) であるため部分的にしか bait にできない
- (2) 酵母内で結合が見られてもヒト培養細胞内では結合の見られないものが非常に多かった
- (3) BRCA2 との相互作用が機能的なものであるかどうかの判別が定量化できておらず判断が困難だった

そのため次の試みとして、抗 BRCA2 抗体により内在性 BRCA2 を免疫沈降し、その共免疫沈降物を質量分析によって明らかにしようと試みた。本手法の優位性として以下の点が挙げられる。

- (1) in vitro ではなく培養細胞内天然環境下で既に結合している分子が確実に得られる
- (2) 強制発現ではなく天然量の全長 BRCA2 と結合する分子が同定できる
- (3) BRCA2 の機能に応じて中心体画分や放射線照射核画分を出発材料とすることにより時間的空間的に限定された相互作用の検出が可能になる

我々は BRCA2 が中心体に局在しその正常な複製に関与していることを明らかにしたことから、ヒト培養細胞の中心体画分を出発材料に本解析を行ない、数十個の BRCA2 相互作用分子候補を得ることができた。この候補に、既に中心体複製に関与することが報告されていた nucleophosmin/B23 (NPM) と Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) が含まれていたため両分子との相互作用について解析を行ない、BRCA2 が NPM との結合を通じて中心体複製を制御している分子内領域を絞り込むことができた。

さらに BRCA2 の新しい機能として、BRCA2 ノックダウン表現型を細胞生物学的に詳細に観察することにより、細胞質分裂制御に関与していることを発見した。この機能は Polo キナーゼとミオシンを含む分子ネットワークから構成されることを証明した。この機能についても分子内責任領域は未知であり、特に既知の機能との相違が評価される必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、各機構別に BRCA 分子内の責任領域をより厳密に特定することを目指した。機能特異的分子間相互作用を明らかにすることにより、発癌抑制機構の分子的基盤を明確にできる。既に得ている、他の相互作用分子候補についても、

- (1) BRCA2 との細胞内における結合の確認
- (2) 当該分子の中心体への局在の確認
- (3) ノックダウンによる中心体複製異常の検証
- (4) BRCA2 及び当該分子内結合領域の同定
- (5) 結合領域内の乳癌における点変異の結合への関与の検証、

を目標とした。また BRCA2 の別の機能である DNA 損傷修復に関しても、相互作用分子候補を網羅的に相同組換え効率定量系で解析し、真に DNA 修復に関与している機能的 BRCA2 結合分子の

選抜を目指した。本実験系で数値化できることにより各分子の関与度の差異を明らかにできるため、以後の解析に当たって優先度を明確にできると考えた。

さらに新規に発見した細胞質分裂制御機能に関しては確立された定量的評価法が樹立されていないことから、他の分子機能との定量的な比較を可能にする精度の高い評価系を構築することを当面の目的とする。

本研究は BRCA を主眼として、それら関連・結合遺伝子産物が構成する機能ネットワークによる発癌抑制機構を明らかにすることから学術的重要性が高い。研究手法の多くを既に研究室内で確立し実績を挙げており十分な遂行能力を有していた。得られる新規相互作用及び分子の機能に関する知見は理学的基礎医学的興味に留まることなく、臨床的な診断・治療法開発に強く波及するものである。そのため適切な倫理手続を経て病理組織を用いた解析を行なうなどして、これら臨床医療への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) BRCA2 が機能する細胞内画分からの共免疫沈降物の質量分析により解析候補群を取得
ヒト培養細胞の中心体画分から BRCA2 を免疫沈降し、共免疫沈降物を質量分析によって同定した。免疫前血清を沈降に用いた結果と比較することにより BRCA2 結合特異的な解析対象となる沈降物候補を得た。

(2) 【中心体複製制御】ノックダウンにより中心体複製異常の有無を検証し次解析群を選出

上記で得た解析候補群のそれぞれを siRNA によりノックダウンし、 α -tubulin と centrin を免疫染色し中心体の数と形状を蛍光顕微鏡で観察した。1つの細胞内に3つ以上の α -tubulin 染色の見られる細胞 (centrin の有無で中心体過剰複製か断片化かを判別できる) がノックダウンによって出現する BRCA2 結合分子を選出した。中心体の異常な複製は発癌過程に特徴的な多核細胞の出現を引き起こし得るので、DNA 染色によって核の形状を観察することも判定根拠として、中心体複製制御への関与を判定した。

(3) 【DNA 修復】相同組換え効率定量系により修復への関与を数値化し次解析群を選出
DR-GFP 基質が組み込まれたヒト U2OS 細胞 (Nakanishi et al., 2005) を用いた。質量分析によって得た相互作用分子候補群のそれぞれを siRNA によりノックダウンした後、相同組換え修復効率の測定を行なった。これにより相同組換えへの関与程度が定量化でき、修復に機能している分子を効率的に選別することができた。定量値によって以降の解析に進める分子の優先度を明確にした。我々はそれまでに、BRCA1/2 をはじめとする、相同組換え修復に関与している遺伝子群を効率良くノックダウンし、その環境下で相同組換え効率の低下を定量化する系の運用を開始してきた。そのため新規 BRCA2 相互作用分子についても、この実験系を用いて相同組換えへの関与を明らかにできた。

(4) 機能的結合分子と BRCA2 との分子内結合領域を部分配列共発現により決定
この段階までに得られた解析優先度の高い機能的 BRCA2 結合分子について、その分子内結合領域の決定を試みた。BRCA2 と結合分子それぞれの部分配列をヒト培養細胞に共発現して共免疫沈降を行なった。BRCA2 部分配列、あるいは結合分子部分配列のいずれかで免疫沈降を行ない、他方に対する抗体でイムノプロットすることによって、それぞれの分子のいずれの領域で分子間相互作用が担われているかを明らかにした。

(5) 結合が表現形に与える影響を部分配列強発現により検証

(4) で決定された部分配列の強発現により内在性 BRCA2 と当該新規結合分子の結合が阻害されるかどうかを検討した。また、この部分配列強発現時に (2) と (3) で用いた手法で表現形を解析した。

(6) 結合領域内の乳癌検体における点変異の探索と同一の点変異導入細胞株の表現形解析

(5) で明らかにした 表現形を呈する相互作用領域についてゲノム解析データベースと照合した。特に BRCA2 については乳癌検体での点変異情報が充実している。既知の点変異が BRCA2 と新規結合分子の結合を喪失させている可能性について検討した。我々は標的組換えを活用し高等動物細胞ゲノム上に点変異を導入し、その表現形解析に成功している。この手法を用いて癌検体と同一の点変異を導入した細胞株を樹立し、(2) または (3) の表現形解析を行ない、どの点変異が表現形を呈し得るかを明確に決定することを目標とした。

4. 研究成果

(1) 中心体数自動検出系の開発

中心体複製制御機構については、中心体を構成する α -tubulin を免疫染色し、蛍光顕微鏡像か

ら中心体数を計数することにより評価を行ってきた。中心体は正常な細胞内には1個(G1/S期)または2個(S/G2/M期)存在するため、複製数異常である3個以上の α -tubulin染色点が見られる細胞の割合を定量化することにより制御機構の異常を検出することができる。

従来中心体数の計数は国内外問わず、蛍光顕微鏡写真を研究者が自分の目で見て細胞毎に数えていた。しかしこの手法には以下の欠点があり、中心体複製制御機構について多数の検体を定量的に解析する必要があった本計画にそのまま採用することは不適切であった。

統計的解析に耐える細胞数についてヒトの目で数えるには多過ぎる(例:100細胞 \times 3回 \times 15検体=4500細胞)
数人で分担すると計数者毎の中心体判定基準が異なり公正に比較できない
独りでも計数期間内で基準を維持できずバイアスが生じ得る

そこで非常に多くの検体について高精度解析を可能にするため、コンピューターによる画像認識技術を用いた自動計数系の開発に着手した。

当初はハイコンテンツアナリシス(ArrayScan[®])を用いて開発を行なった。しかし避け難い染色ムラなどのバックグラウンド存在下では機器の性質上期待する精度が得られないことが判明した。そのため国外の専門家の協力を得て汎用の画像解析ソフトを利用して開発を開始した。本研究課題開始時点では開発途上の状態であり、その段階でも相当効率良く中心体のみを認識し計数できていた。開発途上版においても、S期複製直後の相当に近接した中心体であっても2個と認識する一方、複製直前の中心体は形状が真円でなくとも正しく1個と認識した。この1個と2個の認識境界は定数の設定により、ヒトの目で計数する場合はこの認識を計数者別や経時的に一定させることが難しい。しかし、本画像認識手法では設定した定数で全実験を公正に計数することが可能になった。

本研究期間では前版に積極的な改良を加え、実用可能な水準にまでさらに精度を高めることができた。判断基準としては光学原理を根拠とした数値演算と統計学的解析を用いた。今後はさらに顕微鏡の自動制御による画像取得と機種に応じた変数調整を検討する。機械化により高スループット解析が可能になるだけでなく、バイアスを排除し統計的信頼性の高い結果が得られる。そのため今後の研究課題において多数の検体を用いた研究で中心体数への影響を非常に高精度に統計的に解析できる。

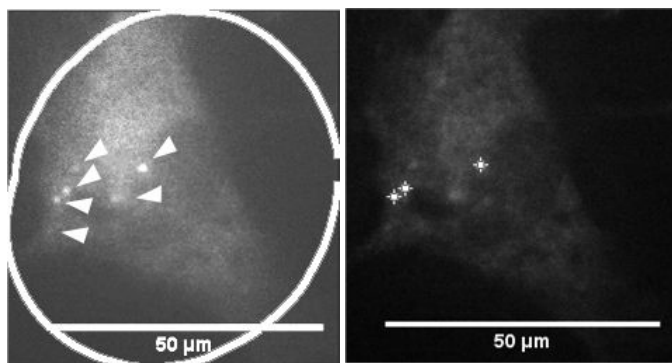


図1 開発版による中心体計数例
左、従来肉眼での計数に用いていた α -tubulin染色像では、計数する人や時によりどの輝点(白矢頭)を中心体と判定するか異なり得る。開発プログラムでは各細胞を認識しROIとする(白丸)。右、設定されたROIについて画像処理を行ない光学アルゴリズムに基づいた数値演算を行なった結果3点を中心体と判断した(白十字)。適切な定数を与えることで全検体を精確に計数でき統計的信頼性の高い結果が得られる。また全自動で計数されるため省力化効果も高い。

(2) DNA修復に關与するBRCA部分領域同定

本研究ではBRCAを解析の対象としたが、BRCA1/2産物は典型的タンパク質の5~10倍も大きいために実験手法上の制約が厳しく、それがこれまで十分な解析が進んでいない理由であった。

そこで典型的実験手法の応用が可能になるように、BRCA1/2遺伝子を小断片に分割し強制発現する系を構築した。BRCAは相同組換え修復に關与していることから、世界的に信賴されており、我々も研究室内で確立し稼働させている、DR-GFP基質を用いた相同組換え効率測定系によって組換え効率への影響の定量的な観測を試みた。

本研究ではさらに検出感度を向上させる工夫を行なった。小断片ライブラリ発現に用いるタグを利用した蛍光染色を行ない、FACSでの計測時に適切なゲートを適用することによって、従来に比べ数倍の感度で相同組換え修復効率の変動を検出できるようになった。これによって統計的に強固な結論を導くことが可能になった。

その結果 BRCA2 についてはN端領域と中央部 BRC リピート領域が相同組換えに機能していることが明らかとなった。これら両領域はそれぞれ修復への関与が知られる PALB2 と Rad51 結合部位を含んでいることから、従前の研究より強く推察されていた通り、BRCA2 がこれらの分子と相互作用することが相同組換え修復機能に重要であると考えられた。

さらにこれまでに関与の報告の無い領域についても相同組換え修復に役割を果たしている可能性が予備的実験により示唆されている。今後試行回数を増やして有意性を検証したい。

また、より細分化した小断片を用いて検討するとともに、BRCA1 や他の分子についても同様の手法で相同組換え修復の分子機構を明らかにする準備を進めている。

(3) 中心体複製制御に関与する BRCA 部分領域と新規関連遺伝子同定

上記で確立した中心体数自動検出系と BRCA 部分領域発現系を組み合わせることにより、中心体複製制御に関与する部分領域を明らかにできる。本研究期間内には予備的な実験までを行なった。また siRNA ライブラリを用いて多様な遺伝子をノックダウンし、中心体数を自動計数することにより、中心体複製制御に関与している可能性のある新規遺伝子のスクリーニングを行なった。その結果少なくとも数個の新規関連遺伝子候補を得た。今後多様なノックダウン/ノックアウト手法によって精密な検証を行ないたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shiro Koizume, Tomoko Takahashi, Mitsuyo Yoshihara, Yoshiyasu Nakamura, Wolfram Ruf, Katsuya Takenaka, Etsuko Miyagi, Yohei Miyagi.
Cholesterol starvation and hypoxia activate the FVII gene via the SREBP1-GILZ pathway in ovarian cancer cells to produce procoagulant microvesicles.
Thrombosis and Haemostasis *in press* (2019).
DOI: 10.1055/s-0039-1687876.

〔学会発表〕(計2件)

低酸素で発現誘導される ATP-grasp スーパーファミリー酵素(Expression of an ATP-grasp superfamily enzyme under hypoxia)
竹中 克也, 小森 由香子, 中村 圭靖, 小井詰 史朗, 宮城 洋平
第77回日本癌学会学術総会. 2018年9月.

異所性 CD69 発現は卵巣明細胞がん細胞の腹腔内生存に重要である(Ectopic synthesis of CD69 is important for intra-peritoneal survival of ovarian clear cell carcinoma cells)
小井詰 史朗, 中村 圭靖, 吉原 光代, 竹中 克也, 宮城 悦子, 宮城 洋平
第77回日本癌学会学術総会. 2018年9月.

〔その他〕

ホームページ等
researchmap
https://researchmap.jp/takenaka_k/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 克也 (TAKENAKA, Katsuya)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・任期付研究員
研究者番号: 20378706

(2) 研究分担者

荻 朋男 (OGI, Tomoo)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 80508317

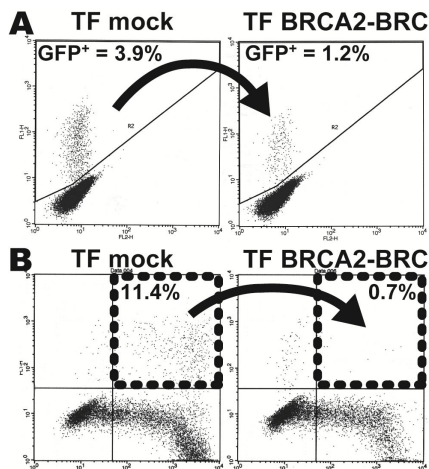


図2 修復効率定量系の改善 A,従来は全細胞を対象に、修復により生じた GFP 蛍光を測定計測していた。B, 今回のスクリーニング用にトランスフェクトされた細胞だけを対象に測定する方法を樹立した。BRC リピート強発現による修復能競合阻害をより鋭敏に検出できるようになった。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。