

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19473

研究課題名(和文)ミトコンドリア制御機能の変調による乳がん発症新規メカニズムの探究

研究課題名(英文) Study on novel mechanism of breast cancer development by modulation of mitochondrial control

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1、BRCA2を含む分子群が、マイトファジー経路で機能することが報告された。そこで、ミトコンドリア制御機能不全による乳がん発症の新規メカニズムを解析した。まず、ミトコンドリア外膜に存在するMfnとBRCA2の相互作用を見出した。Mfnはミトコンドリアダイナミクスにおいて融合を主導する。次に、ミトコンドリアの細胞内融合を観察する系を構築、BRCA2の発現及び発現抑制が融合機能に与える影響を解析した。さらに、Mfnと結合するBRCA2内のミトコンドリア制御機能ドメインを決定、その領域に存在する乳がん誘発BRCA2変異を導入し、ミトコンドリア制御機能の変調の観察を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア制御機構におけるBRCA2の機能解明は、新しい乳がん発症機構の発見に加え、新規治療ターゲットの提案という医学的にも社会的にも要求度の高い成果につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：A group of molecules including BRCA1 and BRCA2 was reported to function in the mitophagy pathway. Therefore, we analyzed a novel mechanism of breast cancer development by modulation of mitochondrial control. First, we discovered the interaction between BRCA2 and Mfn present in the outer mitochondrial membrane. Mfn drives fusion of mitochondria in mitochondrial dynamics. Next, we constructed a system for observing intracellular fusion of mitochondria and analyzed the effects of BRCA2 expression and suppression on the fusion function. Furthermore, we have determined the functional domain in BRCA2 that binds to Mfn and regulates the mitochondrial function. We have introduced a breast cancer inducing BRCA2 mutation in the region and are analyzing the modulation of mitochondrial regulation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミトコンドリア マイトファジー BRCA1, BRCA2 Mfn

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、動的制御機構により分裂・融合を繰返しダイナミックに形態を変化させながら、細胞内エネルギーの生産、酸化ストレスの発生源、細胞死の制御やカルシウム応答など多彩な機能を発揮している。また、その機能不全は、神経疾患や心疾患をはじめ種々の疾患の原因となる。近年、ファンコニ貧血の原因遺伝子産物として同定された一連の分子が、損傷ミトコンドリアをターゲットとしたマイトファジーに機能すると報告された (Cell. 165, 867-81 (2016))。FANCC や BRCA1、BRCA2 を含むファンコニ貧血の一連のタンパクをノックダウンすると、ミトコンドリア損傷時でもマイトファジーが抑制され細胞内に損傷ミトコンドリアが異常に蓄積するというものである。これは、BRCA がマイトファジーに関与するという初めての報告である。しかし、詳細なメカニズムは現段階では全く明らかにされていない。

この報告を受けて、遺伝的に乳がんを誘発する BRCA 遺伝子の変異が、マイトファジーを変調させミトコンドリア制御機能を障害させることを明らかにすれば、ミトコンドリア制御機能不全が乳がん発症の新規分子メカニズムである可能性を示すことになると考え、ミトコンドリア品質管理に着目した乳がん発症の新規メカニズム探究に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞のミトコンドリア制御機能、特にミトコンドリア損傷時における選択的オートファジーであるマイトファジーの変調が乳がんを発症させるという乳がん発症の新規分子機構の解明を目指す。遺伝性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1、BRCA2 を含む分子群が、マイトファジー経路で機能することが新しく報告された (Cell. 2016; 165: 867-81)。ミトコンドリアの分裂・融合の生理的機能は詳細にされているわけではないが、融合因子抑制による分裂亢進は神経変性疾患を引起し、融合によるミトコンドリアネットワーク形成は安定した細胞活動を維持するが、分裂因子阻害による融合亢進も神経細胞のシナプス形成を強く抑制するなど、ミトコンドリア制御は分裂・融合の動的バランスが鍵と考えられる。損傷ミトコンドリアの活性を相補するため、ミトコンドリアは正常体との融合により均質化を試みる。しかし、損傷が高度で融合によっても活性が維持されない場合、マイトファジーにより処理される。そこで、これらの知見を基軸に、BRCA によるミトコンドリア制御機構の解明に挑戦し、得られた情報を基に、BRCA 遺伝子の乳がん誘発変異の導入がこの経路に影響しミトコンドリア機能を変調させることを示す。細胞が必要とするエネルギーの大半を生産するミトコンドリアの機能不全によって、神経疾患や心疾患、代謝性疾患等が発症し、がんでは主に嫌気性解糖への代謝の変化 (Warburg 効果) が指摘されている。そこで、乳がん発症機構のこれまでに知られている ER シグナル・HER2 シグナルの活性化、DNA 修復機能障害等に加え、本研究により、ミトコンドリア品質管理不全、特にマイトファジーの変調による乳がん発症という新規乳がん機構が明らかになり、最終的に新規の作用機序に基づいた抗がん剤開発の可能性を提唱することを視野に入れている。

### 3. 研究の方法

#### 1) ミトコンドリア制御関連分子と BRCA1・2 の相互作用解析 |

培養細胞をミトコンドリア損傷剤で処理し、その細胞質内の BRCA1 または BRCA2 (BRCA1・2) に結合するミトコンドリア関連分子を、質量分析法を主とした解析により検出する。まず、BRCA1・2 の強制発現系を用い細胞質を分画、BRCA1・2 の免疫沈降物を質量分析法で解析し相互作用分子を探る。強制発現系や内在性タンパク解析を駆使して、ミトコンドリア領域の BRCA 結合タンパクを探索する。

#### (2) BRCA2-Mfn 複合体によるミトコンドリア融合制御機能の解析 |

ミトコンドリアは融合しミトコンドリアネットワークを形成することが、細胞の安定した活動の維持に必須である。一方、細胞分裂や移動等多くのエネルギーを必要とするとき、ミトコンドリアは分裂し独立した数を増やす。そこで、これらの情報から、次の二つの仮説を考えている。仮説 1: 平常時、細胞内ミトコンドリアの分裂・融合バランスを BRCA と Mfn が協同で融合傾向に制御して細胞活動の安定化に機能している。

仮説 2: ミトコンドリアの分裂・融合は、各々に関わる GTPase のバランスで調節されている。ミトコンドリアの高度損傷時、融合促進 GTPase (Mfn, MARF) を BRCA が抑制することで、損傷ミトコンドリアと正常体の融合を阻止し、損傷ミトコンドリアのオートファゴソーム膜による取込みを促進している。

仮説 1 を検証するために、GFP (緑) と RFP (赤) でミトコンドリアを標識し、ミトコンドリアの細胞内における融合 (黄色に変化) を観察・解析する系を構築し、この系を用いて BRCA2 の発現及び発現抑制が融合機能に与える影響を解析する。仮説 2 については、BRCA2 の発現及び発現抑制によりマイトファジーに及ぼす影響を、マイトファジー観察に適した発光型 Parkin 過剰発現の系を用いて検証する。ミトコンドリアがマイトファジーで分解される際に、損傷ミトコン

ドリアを取り込んで形成されたオートファゴソームがリソソームと融合して小胞内が中性から酸性に変化するが、この変化を励起波長の違いによりモニタリングするアッセイ系を用いて測定する。

(3) BRCA2 内のミトコンドリア制御機能ドメインの同定と変異導入によるミトコンドリア制御機能変調の検証 |

Mfn と結合する BRCA2 領域の検討により、BRCA2 内のミトコンドリア制御機能ドメインを決定し、その領域に存在する乳がん誘発 BRCA2 変異を Breast Cancer Information Core (BIC) database から検索、その変異を細胞内 BRCA2 に導入し、ミトコンドリア制御機能の変調を観察する。これにより、乳がんの新規発症メカニズムが検証される。

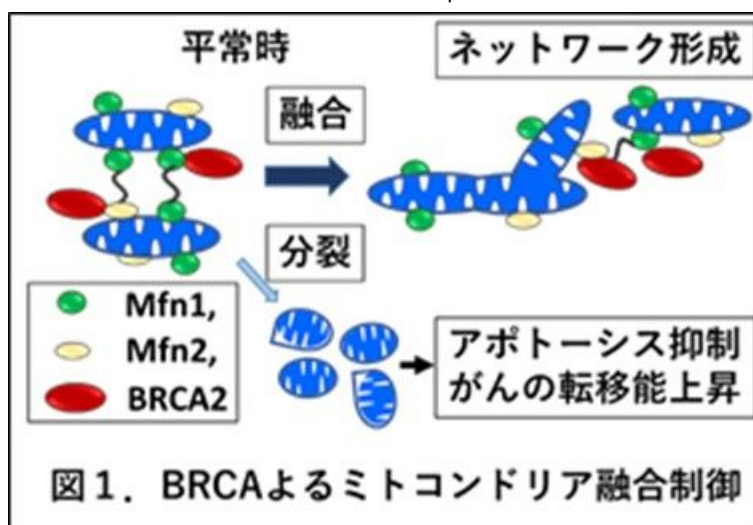
#### 4. 研究成果

(1) ミトコンドリア制御関連分子と BRCA2 の相互作用解析 |

BRCA2 とミトコンドリア制御に関わる重要な分子との相互作用を探索した。培養細胞をミトコンドリア損傷剤で処理し、その細胞質内の BRCA1 または BRCA2 に結合するミトコンドリア関連分子を、質量分析法を主とした解析により検出した。FLAG-BRCA1・2 の強制発現系を用い細胞質を分画、抗 FLAG 抗体による BRCA2 の免疫沈降物を質量分析法で解析し相互作用分子を探索した結果、ミトコンドリア外膜に存在する Mfn と BRCA2 との相互作用を確認した。Mfn は分裂と融合を繰り返すミトコンドリアダイナミクスにおいて融合を主導し、また、ミトコンドリア損傷時にマイトファジーの実行のため、ユビキチンリガーゼ Parkin により自身がユビキチン化されオートファゴソーム膜を誘導するマーカーとしても機能する。

(2) BRCA2-Mfn 複合体によるミトコンドリア融合制御機能の解析 |

細胞内ミトコンドリアの分裂・融合バランスを BRCA と Mfn が協同で融合傾向に制御していることを解析するため(図1)、GFP(緑)とRFP(赤)でミトコンドリアを標識し、ミトコンドリアの細胞内における融合(黄色に変化)を観察・解析する系を構築した。この系を用いて BRCA2 の過剰発現及び発現抑制が融合機能に与える影響の解析を進めた。



(3) BRCA2 内のミトコンドリア制御機能ドメインの同定と変異導入によるミトコンドリア制御機能変調の検証 |

現在、Mfn と結合する BRCA2 領域の検討により、BRCA2 内のミトコンドリア制御機能ドメインを決定し、その領域に存在する乳がん誘発 BRCA2 変異を BIC database から検索、その変異を細胞内 BRCA2 に導入し、ミトコンドリア制御機能の変調を観察を進めている。

#### <引用文献>

Sumpter R Jr, Sirasanagandla S, Fernández ÁF, Wei Y, Dong X, Franco L, Zou Z, Marchal C, Lee MY, Clapp DW, Hanenberg H, Levine B. Fanconi Anemia Proteins Function in Mitophagy and Immunity. Cell. 2016 May 5;165(4):867-81.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K, Miki Y, Hirata M, Matsuda K, Spurdle AB, Kubo M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 4083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06581-8.	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 該当する
1. 著者名 Osumi H, Shinozaki E, Mashima T, Wakatsuki T, Suenaga M, Ichimura T, Ogura M, Ota Y, Nakayama I, Takahari D, Chin K, Miki Y, Yamaguchi K	4. 巻 109
2. 論文標題 Phase II trial of biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy for pretreated KRAS exon 2 wild-type colorectal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2567-2575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13698	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 Sunada S, Nakanishi A, Miki Y.	4. 巻 109
2. 論文標題 Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 893-899.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13530.	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 Takaoka M, Miki Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 BRCA1 gene: function and deficiency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-017-1182-2	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂田 成章, 斉藤 広子, 三木 義男
2. 発表標題 細胞周期依存的なDNA修復機構を利用したがん特異的な放射線増感法の開発
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木 義男
2. 発表標題 遺伝子パネルによる乳がん発症危険度の遺伝学的検査
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Deng Yu, 中西 啓, 三木 義男
2. 発表標題 エストロゲンによる乳管及び基底膜崩壊機構の解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木 義男, 中西 啓
2. 発表標題 乳癌の治療戦略 DNA損傷応答を標的とした新たな乳がん治療戦略,
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木 義男
2. 発表標題 DNA損傷修復機構 がん抑制機能と新たながん治療への応用
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子遺伝分野  <a href="http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index.html">http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index.html</a></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	砂田 成章  (Sunada Shigeaki)  (70807677)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教    (12602)	