

## 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 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590331

研究課題名（和文）オーロラキナーゼの細胞分裂における機能とがんにおける異常の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of Aurora kinases in mitosis and its dysregulation in cancer

研究代表者 木村 正志（KIMURA MASASHI）  
岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40260575

研究成果の概要（和文）：阻害剤を用いた解析により、オーロラが細胞分裂や生存に必要であることを明らかにした。また、オーロラによって制御されるいくつかのタンパク質が細胞分裂に必要であることも明らかにした。オーロラ A などの中心体タンパク質の RNA 干渉により、紡錘体の異常と細胞死がみられるが、その細胞死にはチェックポイントタンパク質が必要であった。また、がん細胞においてオーロラ A や Plk1 の発現上昇とそれらの分解酵素の発現抑制が起こっていた。

研究成果の概要（英文）：Our study using Aurora inhibitor indicate that Aurora is essential for cell division and survival. Several proteins, which are regulated by Aurora kinases, play important roles in mitosis. RNA interference of centrosomal proteins including Aurora A induced cell death, which depended on the checkpoint proteins. The expression of Aurora A and Plk1 were upregulated in cancer cells, but those of the enzymes which degrade them were downregulated.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん、オーロラキナーゼ、細胞分裂、細胞死、転写制御

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂における中心体、動原体、中央体の機能解析は非常に重要な分野であり、激しい競争のもとで研究がなされている。真核生物

において、染色体分配、染色体凝縮、細胞質分裂などを制御する Aurora キナーゼファミリーも国内外で多くのグループが研究を行っている。私たちは、ヒト Aurora-A, -B, -C

遺伝子を世界で初めて単離し、遺伝子産物の解析を行ってきた。Aurora-A タンパク質は細胞分裂期に発現し、中心体において機能するが、Aurora-B 遺伝子産物は動原体および中央体における機能を持つ。Aurora-A と Aurora-B はヒト癌由来の培養細胞および組織において、高い頻度で過剰発現が観察されることを私達を含むいくつかのグループが報告している。さらに、Aurora-A タンパク質の過剰発現によって、NIH3T3 細胞が形質転換し、ヌードマウスにおいても腫瘍の形成がみられることから、Aurora-A は oncogene であると考えられている。また、マウスの低浸透性がん遺伝子が Aurora-A であること、ヒトのがんにおいても Aurora-A の遺伝子多型とがんの発生に相関がみられることが報告されている。最近、Aurora-C が精子形成に必要であり、ヒトの遺伝子変異やノックアウトマウスで異常な形態の精子が形成されることが報告された。また最近、ショウジョウバエの研究から Aurora-A が神経幹細胞の不均等分裂を制御していることが報告された。哺乳動物における幹細胞や iPS 細胞における中心体の位置決定が細胞極性の決定と組織分化において重要な役割を果たしているかについては不明であるが、大いに可能性が有ると考えられる。

## 2. 研究の目的

Aurora-A 等の細胞周期制御タンパク質の機能を明らかにする。また、がんにおけるそれらの異常の有無も明らかにする。以下の各テーマに沿って研究を行う。

- (1) Aurora-A などの中心体タンパク質の機能阻害による細胞死について、関与する分子間のシグナル伝達を明らかにする。
- (2) Aurora などの RNA 干渉によって細胞内局在の変化するタンパク質の制御機構について、相互作用とリン酸化について明らかにする。また、リン酸化状態に変化のみられるタンパク質も明らかにする。
- (3) 淡明細胞肉腫の原因遺伝子 EWS-ATF1 および滑膜肉腫の原因遺伝子 SYT-SSX による Aurora-A および Aurora-B の転写制御機構を明らかにする。
- (4) ヒト Aurora-A 過剰発現マウスを用いて、種々の組織での発がんと精巣における減数分裂における役割を明らかにする。また、他の中心体タンパク質のノックアウトマウスを作製し、減数分裂と体細胞分裂における機能を明らかにする。

- (5) 幹細胞、極性を有する細胞の不均等分裂への中心体および Aurora-A の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 中心体タンパク質の機能阻害による細胞死機構の解析---Aurora などいくつかの中心体タンパク質の RNA 干渉により、紡錘体形成の異常が起こり、細胞死が高頻度で起こることを観察している。細胞死の起こるステージの決定、紡錘体形態、核の形態、アネキシン V 染色の有無、関与する分子 (p53, Caspase, Bub1, BubR1, Mad2 など) についても検討を行う。さらに、他のチェックポイントタンパク質の関与についても解析を行う。HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクトし、CHK1, CHK2, AKT, MAPK などのリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討する。また、細胞分裂停止後の細胞死過程における核膜、微小管の変化を EGFP-LaminB1, EGFP- $\alpha$ -Tubulin を発現する細胞に siRNA をトランスフェクトし time lapse 顕微鏡で解析する。現在までに、EGFP-LaminB1 および EGFP- $\alpha$ -Tubulin を HeLa 細胞にトランスフェクトし、stable transformant を得ている。
- (2) Aurora と関連タンパク質の機能解析---Aurora などいくつかの細胞分裂関連タンパク質の RNA 干渉を行い、細胞内局在の変化する新たなタンパク質を見いだした。これらの相互作用を、免疫沈降法と GST-pulldown 法により検討する。また、リン酸化についても、全長および欠失変異体、点突然変異体を用いた in vitro でのキナーゼアッセイによって解析する。Aurora の量の低下により細胞内の局在に変化が見られるが、Aurora との結合が検出できない場合については、間に入るタンパク質が想定されるので、いくつかの候補について解析する。
- (3) Aurora など細胞周期関連タンパク質の M 期特異的発現と癌での異常発現の原因の解析---Aurora など細胞周期関連タンパク質の転写活性制御について、がん関連の転写因子の影響を解析する。現在までに、EWS-FLI1 の Aurora-A と Aurora-B のプロモーター活性の関与に関して報告を行った。滑膜肉腫の原因遺伝子 SYT-SSX について解析を行っており、ルシフェラーゼアッセイにより、ある細胞周期関連タンパク質の転写にこれらの融合遺伝子が関与していることを見いだした。SYT-SSX の量を RNA 干

渉法により低下させると、この細胞周期関連タンパク質の量とRNA量が減少することをWestern blotting法とRT-PCR法により確認する。また逆に、SYT-SSXを過剰発現した場合にこの細胞周期関連タンパク質が増加するかを検討する。この細胞周期関連タンパク質のプロモーター活性に対するSYT-SSXの関与に関して、欠失変異/点変異を導入したプロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、転写制御領域を同定する。さらに、SYT-SSXがこの細胞周期関連タンパク質のプロモーターへ結合することを、クロマチン免疫沈降法により検討する。

(4) Aurora-A遺伝子改変マウスの解析---現在までに、cre-loxpシステムによるヒトAurora-A過剰発現マウスを作製している。これらのジェノタイピングは済んでおり、プロモーターが機能しているマウスを数ライン得ている。現在までに、F1マウスとcreマウスを掛け合わせて、loxpサイトの組み替えが起こることを確認している。今後、ヒトAurora-A過剰発現マウスの発がんも減数分裂の異常について検討を始める。また、また、Aurora-Aを含む中心体タンパク質のコンディショナルノックアウトマウスを作製する。

(5) 幹細胞、極性を有する細胞の不均等分裂におけるAurora-Aの機能の解析---極性を有する細胞としては、NMuMG良性腫瘍細胞を用いる。この細胞は、TGF- $\beta$ 添加により上皮系細胞から間葉系細胞に性質が変化する。上皮系細胞の状態EGFP-Aurora-A、EGFP-DN-Aurora-AやAurora-AのsiRNAをトランスフェクトし、アクチンやZO-1などの接着結合構成タンパク質の局在を蛍光顕微鏡で観察する。さらに、紡錘体の方向、Par3の局在、Par6とaPKCへの影響を検討する。実験がうまく行かない場合は、用いる細胞またはノックダウンするタンパク質を他の中心体キナーゼに変える

#### 4. 研究成果

Aurora AおよびPlk1とその関連タンパク質の細胞周期とがんにおける機能の解析を中心に論文を発表した。また、新たな細胞周期制御タンパク質の機能は現在解析中であるが、それらによる細胞分裂制御機構に関するデータが徐々に得られている。論文として発表済みの論文の内容を以下に記載した。

(1) Aurora Aのユビキチン化に関与するCHFRのプロモーターのメチル化とAurora Aの

発現量について、ヒト口腔扁平上皮がん組織を用いて検討した。CHFRのプロモーターのメチル化がヒト口腔扁平上皮がんを高率で検出された。また、Aurora Aの過剰発現ががん組織で高頻度に検出されたが、CHFRのプロモーターのメチル化とは相関がみられなかった (Oncology Reports, 2009)。

(2) CHFRと相同性のあるRNF8の細胞周期制御における機能を解析した。RNF8のノックダウンにより、S期とG2/M期の進行に異常がみられた。RNF8の過剰発現によりPlk1タンパク質が減少し、RNF8のノックダウンによりPlk1の増加がみられた。また、RNF8は、がん細胞では発現抑制がみられたが、Plk1は逆にがん細胞で発現が上昇していた (Biochem Biophys Res Commun, 2011)

(3) AuroraとCDKの阻害剤であるJNJ-7706621の細胞分裂とチェックポイントへの影響を解析した。JNJ-7706621は、低濃度では細胞周期をG2期で停止させるが、高濃度ではG1とG2期で停止させ、細胞死も引き起こした。JNJ-7706621は、Aurora Aの中心体への局在を阻害しなかったが、TOG、Nek2、TACC3の中心体への局在を阻害した。またJNJ-7706621は、Aurora Bの動原体への局在を阻害しなかったが、SurvivinやINCENPの局在を阻害した。JNJ-7706621を作用させると、ノコダゾールによる紡錘体チェックポイントが解除され、細胞質分裂を行わずにG1期に移行する。この時、チェックポイントタンパク質、Plk1、細胞質分裂制御タンパク質Pre1の細胞内局在に異常がみられた (Curr Cancer Drug Targets, 2012)。

(4) Aurora Bの選択的阻害剤AZD1152のバキトリリンパ腫およびホジキンリンパ腫への影響を検討した。AZD1152は細胞増殖を阻害し、4n以上のDNAを持つ細胞が見られ、細胞死が誘導された。マウスモデルにおいてもがん細胞の増殖抑制が観察された (Biochemical Pharmacology, 2011)。

(5) Aurora-Aなどの中心体タンパク質のRNA干渉により、紡錘体の異常と細胞死が起こるが、その細胞死過程の紡錘体形態やシグナル伝達(p53, Caspase, BubR1, Mad2など)を解析した。Aurora-A, TOG, Nineinなどのノックダウンにより細胞死は誘導されたが、gamma-tubulinやPCM-1のノックダウンは細胞死を引き起こさな

かった。この細胞死は p53 存在の有無には関係が無く、アポトーシスの特徴を示した。また、この細胞死には分裂停止や CHK2 が必要であると考えられた (Cell Death and Disease, 2013)。

- (6) FLJ00018/PLEKHG2 は Rho ファミリーの低分子量 GTPase の GEF であり、三量体 G タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニットで直接活性化される。酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、FLJ00018 と結合するタンパク質として、アクチンを同定した。FLJ00018 はアクチン結合部位を 2 カ所持っていた。アクチンの過剰発現により、FLJ00018 による SRE 依存性の転写が抑制された (Cell signal, 2012)。

Aurora は、細胞周期と発がんの重要な制御タンパク質であり、多くの阻害剤が抗がん剤として開発中である。今回の阻害剤を用いた結果は、細胞分裂のメカニズムの解明と将来のがん治療において重要な意味を持つと考えられる。Aurora、Plk1 と CHFR、RNF8 との関係の解析はがんにおける Aurora や Plk1 の過剰発現機構の解明に役立つと考えられる。また、RNA 干渉法や阻害剤による細胞死機構の解析は細胞死、細胞分裂、チェックポイントなどのメカニズムの解明と将来のがん治療において重要な意味を持つと考えられる。

## 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 6 件)

- ① Kimura, M., Yoshioka, T., Saio, M., Banno, Y., Nagaoka, H., and Okano, Y. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. Cell Death Dis. 4: e603 (2013). doi: 10.1038/cddis.2013.108. (査読有)
- ② Sato, K., Handa, H., Kimura, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Sugiyama, T., Kitade, Y., and Ueda, H. Identification of a Rho family specific guanine nucleotide exchange factor FLJ00018, as a novel actin-binding protein. Cell. Signal., 25: 41-49. (2013). doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.015. (査読有)
- ③ Matsushashi, A., Ohno, T., Kimura, M., Hara, A., Saio, M., Nagano, A., Kawai, G., Saitou, M., Takigami, I., Yamada, K., Okano, Y., and Shimizu, K. Growth

suppression and mitotic defect induced by JNJ-7706621, an inhibitor of cyclin-dependent kinases and aurora kinases. Curr. Cancer. Drug. Targets., 12: 625-639 (2012).

<http://www.eurekaselect.com/98883/article> (査読有)

- ④ Yoshioka, T., Kimura, M., Saio, M., Era, S., and Okano, Y. Plk1 is negatively regulated by RNF8. Biochem. Biophys. Res. Commun., 410: 57-6 (2011). doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.104. (査読有)
- ⑤ Mori, N., Ishikawa, C., Senba, M., Kimura, M., and Okano, Y. Effects of AZD1152, a selective Aurora B kinase inhibitor, on Burkitt's and Hodgkin's lymphomas. Biochem. Pharmacol., 81: 1106-1115 (2011). doi: 10.1016/j.bcp.2011.02.010. (査読有)
- ⑥ Baba, S., Hara, A., Kato, K., Long, N. K., Hatano, Y., Kimura, M., Okano, Y., Yamada, Y., and Shibata, T. Aberrant promoter hypermethylation of the CHFR gene in oral squamous cell carcinomas. Oncol. Rep., 22: 1173-1179 (2009). <http://www.spandidos-publications.com/or/22/5/1173> (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 正志 (KIMURA MASASHI)  
岐阜大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40260575

### (2) 研究分担者

岡野 幸雄 (OKANO YUKIO)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：10177066  
(H21 年度)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：