

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590355

研究課題名(和文) 乳癌原因遺伝子BRCA2新規結合分子が中心体複製及びDNA修復に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Function of novel BRCA2-associating proteins in centrosomal regulation and DNA repair

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000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乳癌発癌を抑制している可能性を検証した。解析に当たり非常に多くの検体について高精度に中心体数を計数する必要があったため、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を試みた。本実験系で中心体複製制御に機能するBRCA2分子内領域の決定を目指した。当該領域を癌治療の標的として検討していく。

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. Even so, detail molecular mechanism is not yet uncovered. In the present study, we tried to locate a molecular region of BRCA2 responsible for this function. Series of BRCA2 fragments were exogenously expressed in human cultured cells. Numbers of centrosome in a cell are counted to see if an overexpression of a specific fragment 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：乳癌 BRCA 中心体 画像認識

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障する。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参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。

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。

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が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。

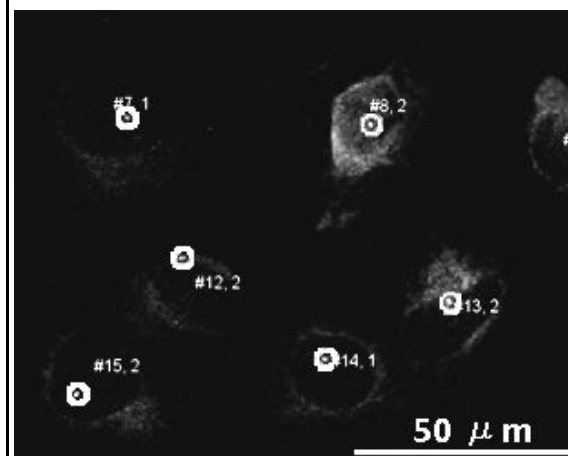
4. 研究成果

- (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なってきた。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

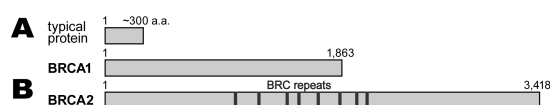
そこで非常に多くの検体について高精度解析を可能にするため、コンピューターによる画像認識技術を用いた自動計数系の開発に着手した。

当初は本学に新規導入された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。本研究課題終了時点では開発途上の状態ではあったが、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 (前頁図)。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。

本課題終了後、科研費の助成は遺憾にも得られていないが、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継続している。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目処が立った。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。

また本検出系の原理を応用し、これまでは定性的にのみ語られてきた、DNA 損傷修復の指標である核内 foci 形成の定量化も可能になった。

- (2) DNA 修復に関与する 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 (本頁図)。



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関与していることから、世界的に信頼されており、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を定量的に観測した。

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。

本課題終了後は、は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している。

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 2 件)

Miho Takaoka, Hiroko Saito, Katsuya Takenaka, Yoshio Miki, and Akira Nakanishi.

BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC.

Cancer Research, 74, 1518–1528.

(2014).

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0504.

査読有

Yuka Nakazawa, Kensaku Sasaki, Norisato Mitsutake, Michiko Matsuse, Mayuko Shimada, Tiziana Nardo, Yoshito Takahashi, Kaname Ohyama, Kosei Ito, Hiroyuki Mishima, Masayo Nomura, Akira Kinoshita, Shinji Ono, Katsuya Takenaka, Ritsuko

Masuyama, Takashi Kudo, Hanoch Slor, Atsushi Utani, Satoshi Tateishi, Shunichi Yamashita, Miria Stefanini, Alan R. Lehmann, Koh-ichiro Yoshiura, and Tomoo Ogi.

Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair.

Nature Genetics 44, 586–592. (2012).

DOI: 10.1038/ng.2229.

査読有

〔学会発表〕(計1件)

手代木翔太，三木義男，竹中克也．
中心体複製制御における乳癌原因遺伝子 BRCA2 とその結合分子の役割．
第 72 回日本癌学会学術総会．2013 年 10 月 3 日 5 日(横浜)．

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri>

6．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

萩 朋男 (OGI, Tomoo)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授
研究者番号：80508317