

分裂期キナーゼによる BRCA1 関連分子の制御機構と その破綻による発癌メカニズムの解明

[1] 組織

代表者：森 隆弘
 (東北大学大学院医学系研究科)
 対応者：千葉 奈津子
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：松澤 綾子
 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

近年、腫瘍における細胞分裂制御因子の異常の解析による、それらを標的とした悪性腫瘍の治療法の開発が注目されている。AURKA (Aurora キナーゼ A) は、細胞分裂期に中心体や紡錘体上に局在し、分裂期の進行を制御するキナーゼで、乳癌、大腸癌など多くの癌でその過剰発現が報告され、既に Aurora キナーゼを標的とした癌治療薬(Aurora キナーゼ阻害薬)の開発が進められている。

申請者は食道癌での癌患者群と非患者群でのアレル頻度を検討し、食道癌患者で有意に多い SNP (single nucleotide polymorphism;一塩基多型)を解析してきた。AURKA 遺伝子内に存在する 2 つの SNPs のうち、169 塩基(以下、AURKA169)の A/A、あるいは 91 塩基(以下、AURKA91)の T/T 多型と AURKA169 の A/A 多型の組み合わせが食道癌患者において有意に多いことが明らかになり、risk allele である 169A allele の homo でキナーゼ活性が極めて低いことが確かめられている(図1) (参考文献1)。

また、申請者は、生殖細胞系列変異により乳癌、卵巣癌を引き起こす癌抑制遺伝子である家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 の locus が食道癌で高頻度に欠失することも報告している (参考文献2)。Aurora キナーゼ阻害薬は、微小管の中心体依存性の過剰な伸長を抑制するが、これは BRCA1 依存性である。

よって申請者は、AURKA による BRCA1 の制御が中心体制御に重要で、これらの分子機構の破綻が食道癌の発症や治療感受性に関与するのではないかと考えた。

一方、共同研究者の千葉は、BARD1 は BRCA1

とヘテロダイマーを形成し、BRCA1 の癌抑制機能を制御するとされている BARD1 に結合する新規分子 BARD1-interacting protein (BIP)をプロテオミクス解析によりを同定した。これまでの解析で BIP が BRCA1 とともに中心体を制御し、AURKA と結合することを明らかにしている。

本研究は AURKA による BIP と BRCA1 の制御機構と発癌メカニズムとの関連を明らかにし、癌の個別化医療のために Aurora キナーゼ阻害剤などの細胞分裂制御因子を標的とした治療法開発や効果予測を可能にするための分子基盤を確立することを目的とした。

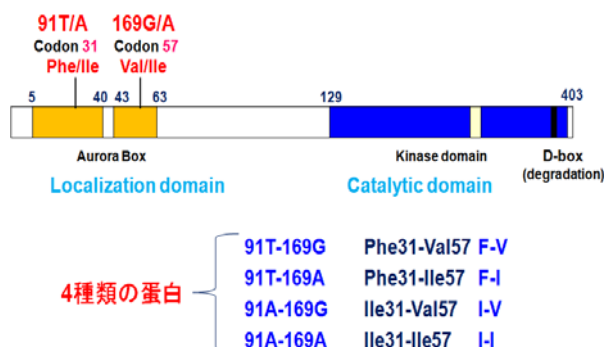


図1. AURKA遺伝子内の2箇所の一塩基多型

申請者と共同研究者の千葉、松澤、主に加齢医学研究所にて、これまでの実験データをもとに、議論を重ね、電話、メールでも連絡をとり、共同研究を遂行した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. AURKA による BIP の制御機構

これまでの研究により BIP の発現抑制実験で BIP が中心体制御に重要であることと、BIP が AURKA と結合することが明らかになってきたが、その後の本共同研究により、BIP の中心体制御機構の分子メカニズムが明らかになってきた。BIP が BARD1 と直接結合することが分かっていたが、その後、1) BIP が BRCA1 と BARD1 非依存性に相互作用すること、2) BIP が γ -tubulin と直接結合す

ること、3) BIP が BRCA1 とともに γ -tubulin を安定化する作用があることが明らかになった。

さらに、最近、AURKA と結合できない BIP の変異体の同定に成功した。興味深いことに、この AURKA と結合できない変異体や、BIP の癌細胞由来の変異体は、BRCA1 の γ -tubulin を安定化する機能が消失していた。さらに、BIP の癌由来の変異体を導入した細胞で、中心体数の著しい増加が観察された。よって、AURKA、BIP、BRCA1 が関与する分子機構が、癌抑制において重要である可能性がさらに高まった。

2. AURKA の SNPs による BIP と BRCA1 の制御機構への影響の検討

2つの SNP による計4種類の AURKA について(図1)、過剰発現による中心体依存性の微小管の伸長に及ぼす影響について解析したところ、AURKA169A の SNP を持つ AURKA (FI または II) で中心体依存性の微小管の伸長 (Large aster の形成) の抑制が IV や FV に比べ減少していた(図2)。この結果は IV または II による、BRCA1 の機能抑制が IV や FV より強いことを示唆している。また、AURKA の SNP による BIP と BRCA1 のリン酸化について検討するため、AURKA、BIP、BRCA1 の精製タンパク質を作製した。

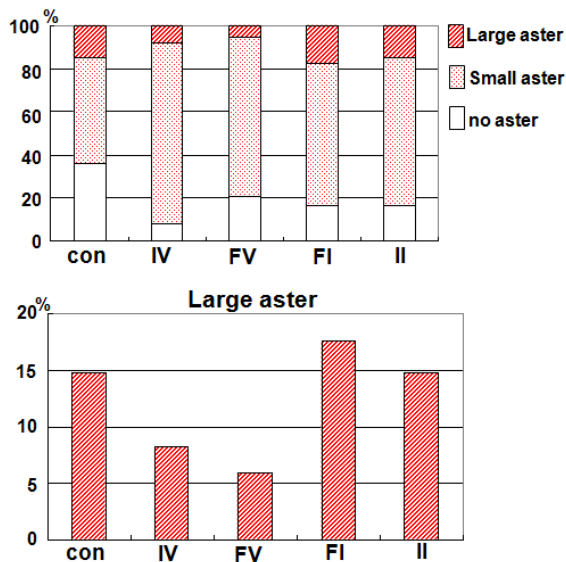


図2. 異なるSNPsを含む4種類のAURKAの強制発現による微小管核形成アッセイ。中心体からの微小管の伸長の程度によりLarge aster、Small aster、no asterと分類した。

3. 食道癌切除標本を用いた、AURKA、BRCA1、BIP の発癌機構への影響の検討

食道癌切除標本での BIP の発現について、免疫組

織化学的に解析したところ、BIP は正常組織でも癌組織も発現していたが、その発現パターンが異なっていた。癌組織では、細胞質が染色されていたが、正常組織では核が染色されている細胞が多かった。

今後さらに、これまでに行った AURKA、BRCA1 の発現解析との比較検討を行う予定である。

また、BRCA1 の機能を制御する遺伝子 X(仮名)が、いくつかの腫瘍で極めて高率に遺伝子変異があることが報告された。申請者の食道癌切除標本を用いた塩基配列の解析により、アミノ酸置換を伴う変異が認められた。この変異アミノ酸部位は、構造的にその酵素活性を発揮するのに重要な部位であり、種間でも高度に保存されている。この分子についても、食道癌切除標本で免疫組織化学的に解析したところ、癌組織のほとんどで強発現していた。よって、BRCA1 が関与する分子機構の破綻と食道癌との関わりがさらに明らかになった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、学際科学国際高等研究センター領域創成研究(研究代表 森 隆弘・400万円)平成22-23年度を獲得し、研究が進展した。

[4] 成果資料

現在、論文作成のためにさらに研究を進めている。また、以下の学会発表を行った。

Matsuzawa A, Mori T, Mochiduki H, Chiba N. SNPs of Aurora-A are involved in the centrosome regulation of BRCA1 and malignant potential of esophageal cancer. Aurora-A の一塩基多型は BRCA1 による中心体制御と食道癌の悪性度に関与する。第70回日本癌学会学術総会(2011年10月3日,名古屋)

参考文献

- Kimura MT, Mori T, Conroy J, Nowak NJ, Satomi S, Tamai K, Nagase H. Two functional coding single nucleotide polymorphisms in STK15 (Aurora-A) coordinately increase esophageal cancer risk. *Cancer Res.* 65(9):3548-54. 2005
- Mori T, Aoki T, Matsubara T, Iida F, Du X, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent loss of heterozygosity in the region including BRCA1 on chromosome 17q in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Cancer Res.* 54(7):1638-40, 1994