

課題番号 11

## 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

(東北大学病院)

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)

望月 寛徳

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 30 万円，旅費 0 円

### [2] 研究経過

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ている。

森は、①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、AURKA 遺伝子の SNP が risk allele として働いている可能性を報告した (参考文献 1)。また、②Germline mutation 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た (参考文献 2)。さらに前年度の本共同研究により、③ BRCA1-associated Protein 1 (BAP1) 遺伝子の変異を食道癌で、初めて同定した (Mori et al. The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of JCA)。BAP1 は BRCA1 の N 末端に結合して BRCA1 のユビキチンリガーゼ活性を制御する因子である。AURKA も BRCA1 をリン酸化して、BRCA1 のユビキチンリガーゼ活性を制御する。Aurora キナーゼ阻害薬は、中心体依存性の過剰な微小管重合を抑制するが、これは BRCA1 依存性である。よって AURKA や BAP1 による BRCA1 の制御が中心体制御に重要で、これらの破綻が食道癌の発症や治療感受性に関与する可能性がある。

共同研究者の千葉は、BRCA1 とヘテロダイマーを形成する BARD1 に結合する新規分子

BARD1-interacting protein (BIP) 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 と直接結合することを明らかにしている。

本研究は AURKA および BAP1 による BRCA1 と BIP の制御機構と発癌メカニズムとの関連を明らかにすることを目的とした。

我々は、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) 食道癌における BAP1 遺伝子変異の解析

悪性黒色腫や悪性中皮腫で高率に BAP1 遺伝子変異が同定されることが報告されている。我々は 28 例の食道癌切除標本(正常部および腫瘍部)を解析し、このうち 2 例に BAP1 遺伝子変異を同定した。いずれも、これまでに報告された SNPs とは一致しない。1 例においては、BAP1 の脱ユビキチン化酵素活性を担う領域の、種間で極めて高度に保存されている残基であるフェニルアラニンがイソロイシンに置換する点突然変異が体細胞変異として同定された。このため、既に、BAP1 によって脱ユビキチン化されることが明らかになっている Host Cell Factor C1 (HCF1) を基質として、この BAP1 変異体の脱ユビキチン化酵素活性を検討したところ、野生型と比較して、脱ユビキチン化酵素活性が著しく低下していることが明らかになった。悪性黒色腫や悪性中皮腫などでも、BAP1 の脱ユビキチン化酵素活性の活性部位の変異が既に同定されており、この BAP1 変異は、病的な変異であると考えられた。

また、もう 1 例の BAP1 遺伝子変異は、BAP1 遺伝子のイントロン領域に同定された。この遺伝子変異は、正常食道粘膜由来の genomic DNA においても同定され、SNPs または germline mutation である可能性が示唆された。

そこでまず、この変異による BAP1 の mRNA の splicing への影響について検討した。その結果、この変異により、エクソン 10 の転写効率が低下する

ことが明らかになった。

また、この遺伝子変異が、SNPsなのか、あるいは、食道癌に関連するgermline mutationであるのかを明らかにするため、多数の食道癌症例と健常人の血清由来のgenomic DNAで、この遺伝子変異の有無を検討することにした。そこで、この遺伝子変異または多型に特異的なPCRプライマーを作成し、Real time PCRの手法による大量サンプルでのスクリーニング法を確立した。この方法により、一般の食道癌患者286例中4例にこの遺伝子変異を同定した。この遺伝子変異あるいは多型はNCBI (National Center for Biotechnology Information) の検索サイトあるいは1000 Genome projectでは報告されていない。すなわち、この変異あるいは多型の報告は正常人1089名では見られず、この情報から統計学的解析を行うとChi二乗検定では $p < 0.001$ 、Fisherの正確法検定では $p = 0.002$ で有意に食道扁平上皮癌患者と相関があった。今後、日本人の健常人においてもスクリーニングを行う予定であるが、興味深い結果と思われる。

さらに、食道癌症例で MLPA 法による染色体欠失について、これまでに 32 例の食道扁平上皮癌について正常粘膜および腫瘍部の凍結標本から抽出した genomic DNA を使用し、解析した。その結果、15 例にBAP1のエクソンのいずれかの欠失を示唆する結果が得られた。今後、さらに triplicate で実験を行い、実験結果を確認する予定である。また、食道癌組織のパラフィン包埋切片で免疫組織化学的な解析を40例に行い、4例でBAP1の発現の低下または消失を認めたことから、今後、さらに多くの症例でMLPA法によりBAP1領域の染色体欠失の詳細な検討を行う予定である。

#### (2) 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いたが、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さらに明らかになった。BIPがBARD1のC末端に加えて、BRCA1のN末端、 $\alpha$ -tubulinと直接結合することが明らかになった。また、BIPの乳癌細胞由来のhomozygous mutationをもつBIP変異体では、BRCA1のN末端との結合能が消失することが明らかになった。さらに、家族性乳癌由来のBRCA1のN末端の変異で、BIPとの結合が消失することも明らかになった。これらの成果については現在、投稿準備中である。また、AURKAと結合できないBIPの変異体の同定し、この変異により、BIPのBRCA1の $\alpha$ -tubulinの中心体数の増加をもたらすことも明らかになった。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、BAP1遺伝子変異(あるいは多型)が少なくとも一部の食道癌発癌に関与していることを明らかにすることができた。さらに今後は、迅速かつ簡便なスクリーニング方法で、血清genomic DNAでの変異あるいは多型を検出することにより、将来の食道扁平上皮癌発癌のリスクを予測することが出来ると考えている。高リスクと診断されれば、内視鏡検査などによる早期発見が可能となり、その結果、リスクが高く、また術後の愁訴も極めて多い食道切除術の回避、あるいは副作用のリスクも高く、そのための支持療法も必要になる抗癌薬や分子標的薬に代表される高額医薬品による医療費の高騰に繋がる放射線化学療法の抑制も可能となる。よって、本共同研究は、個人および社会にとって、極めて意義の大きいと考える。

また、本共同研究により、千葉は、科学研究費補助金 基盤研究(B) (1,110万円、平成27年度まで継続)を、千葉、森は、東北大学学際科学国際高等研究センタープログラム研究(平成24年度は300万円、平成26年度まで継続)の研究資金を獲得し、さらに研究が進展すると期待される。

#### [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。

1. 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. . The 70<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2011年10月3日, 名古屋)
2. Mori T, Sumii M, Chiba N, Matsuzawa A, Ishioka C. *BRCA1-associated Protein 1 (BAP1) gene is mutated in esophageal squamous cell carcinoma.* The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2012年9月19日, 札幌)

#### 参考文献

1. 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
2. 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