

課題番号 13

## 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：仲山 真弘

(東北大学加齢医学研究所)

原田 悠

(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)。さらにこれまでの本共同研究により、③BRCA1-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 Obg

-like ATPase 1 (OLA1) を同定した。これまでの解析で OLA1 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 および BAP1 による BRCA1 と OLA1 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 遺伝子変異が報告されている。我々は 28 例の食道癌切除標本を解析し、2 例に BAP1 遺伝子変異を同定した。1 例は、BAP1 の脱ユビキチン化酵素活性を担う領域の、種間で高度に保存されている残基の点突然変異が体細胞変異として同定された。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、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。そこで、この変異の網羅的な遺伝子発現調整への影響をマイクロアレイ法により検討した。その結果、多くの遺伝子発現に再現性を持って影響があることが分かった。特に変動が大きかった遺伝子に着目し、現在、Western blot 法でタンパク質レベルでの発現の変化について検討を行っているが、それらは apoptosis 誘導や上皮間葉転換に関与する遺伝子で、今後のさらなる解析により BAP1 の未解明な機能の解明に繋がると考えられる。

また、もう 1 例の BAP1 遺伝子変異は、イントロン領域に同定され、BAP1 の mRNA の splicing への影響について検討した結果、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。そこで、多数の食道癌症例と健常人の genomic DNA で、この遺伝子変異の有無を検討したところ食道癌患者 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 Gene project では報告されていない。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。

さらに、食道癌症例で MLPA 法による染色体欠失について、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。

## (2) AURKA による OLA1 の制御機構

これまでの研究により、OLA1 が BARD1 の C 末端に加えて、BRCA1 の N 末端、 $\gamma$ -tubulin と直接結合して、中心体の数を制御することと、OLA1 の乳癌細胞に存在する homozygous mutation をもつ OLA1 変異体 E168Q 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ていた (参考論文 3)。本年度の研究により、家族性乳癌由来の BRCA1 の N 末端に存在し、BRCA1 の中心体の数の制御能に異常を来す、I42V 変異により、OLA1 との結合が消失することが明らかになった。また、これまでは、OLA1 発現抑制により中心体数が増加することが明らかになっていたが、本年度の研究により OLA1 の過剰発現でも中心体が増加することが明らかになった。

さらに、これまで OLA1 が AURKA と結合することが明らかになっていたが、本年度の研究により、AURKA と結合できない OLA1 の変異体を同定した。興味深いことにこの変異体を過剰発現しても、中心体の数の増加は見られなかった。これは、正常な機能が亢進することにより、中心体の数が増加するが、AURKA と結合できない OLA1 の変異体では、過剰発現しても機能に異常があるために、中心体に異常を引き起こさないと考えられ、同時に、これらの結果より、OLA1 に機能に AURKA が深く関わることを示唆された。

## (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、BAP1 の新たな発癌抑制機構の解明や、AURKA による BRCA1 や OLA1 の制御機構も明らかになった。BAP1 遺伝子変異に関しては、さらに、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生のリスクを予測することが出来れば早期発見が可能となり、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、森は、科学研究費補助金 基盤研究(C) (380 万円、平成 27 年度まで) 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>st</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)
3. Mori T, Sumii M, Sato H, Emi M, Ishioka C, Chiba N. BAP1 mutation naturally occurred in an esophageal squamous cell carcinoma depletes deubiquitinase activity The 72<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2013 年 10 月 3 日, 横浜)
4. Chiba N, Yasui A, Ishioka C. Identification of a novel BRCA1-interacting protein that functions as a tumor suppressor. The 72<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2013 年 10 月 4 日, 横浜)

## 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
3. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 53,101-104: 2014