

新規乳がん関連分子のがんの診断・治療の バイオマーカーとしての有用性の検討

東北大学加齢医学研究所 腫瘍生物学分野

教授 千葉 奈津子

(共同研究者)

東北大学加齢医学研究所 助教 吉野 優樹

はじめに

乳がんは女性の悪性新生物の罹患率第1位で、多くの中高年、高齢者女性の健康を脅かしている。発がんは、DNA修復の異常や細胞分裂時の染色体分配の異常による遺伝子変異の蓄積により、がんを引き起こされ、さらなる遺伝子により、その悪性度が高まると考えられている。BRCA1は、その遺伝子変異により、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすが、遺伝性腫瘍だけでなく、散発性がんの、特に難治性のトリプルネガティブ乳がんにも関与することが知られている。以前より、BRCA1のDNA二本鎖切断修復における役割が、そのがん抑制能に重要であるとされてきたが、一方、中心体制御にも関わることが明らかになっている。中心体は、L字型に配置した母中心小体と娘中心小体の2個の中心小体から構成される、核の近傍にある細胞内小器官で、微小管形成中心として機能し、分裂期には紡錘体極となり、娘細胞への染色体の均等な分配を担う(図1)⁽¹⁾。

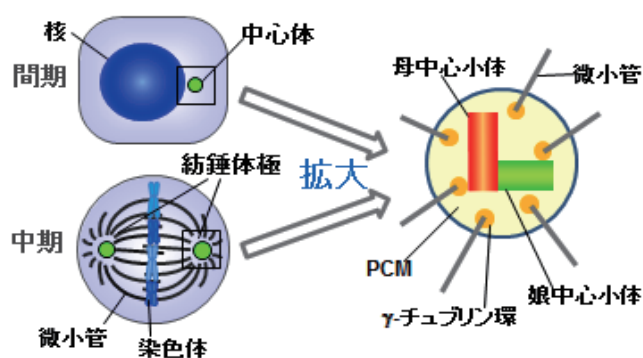


図1 中心体の構造

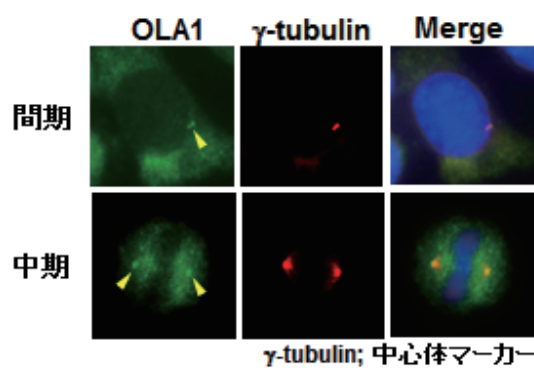


図2 内在性OLA1の細胞内局在

我々はプロテオーム解析により新規BRCA1結合分子、Obg-like ATPase 1 (OLA1)を同定し、その局在を解析し、OLA1が中心体や紡錘体極に局在し(図2)、BRCA1とともに中心体の複製や微小管形成能を制御することを明らかにした⁽²⁾。また、OLA1がBRCA1に加えて、BRCA1結合分子であるBARD1、中心体の主要構成因子であるγ-tubulinと直接結合し(図3A)、中心体の数や活性を制御することが明らかになった。また、がん由来のOLA1変異体では、BRCA1

との結合能が消失して(図3B)、中心体が増加し(図4)、家族性乳がん由来でDNA修復能は正常だが中心体数の制御能が異常なBRCA1変異体では^(3, 4)、OLA1との結合能が著しく低下した(図3C)⁽¹⁾。よって、このタンパク質複合体の形成が中心体数の制御に重要と考えられた。

本研究では、OLA1やさらに同定した新規OLA1結合分子BIP2などの中心体制御機構を解明するとともに、がん患者の臨床検体を用いて、OLA1の変異や発現量や発現パターンについて解析した。

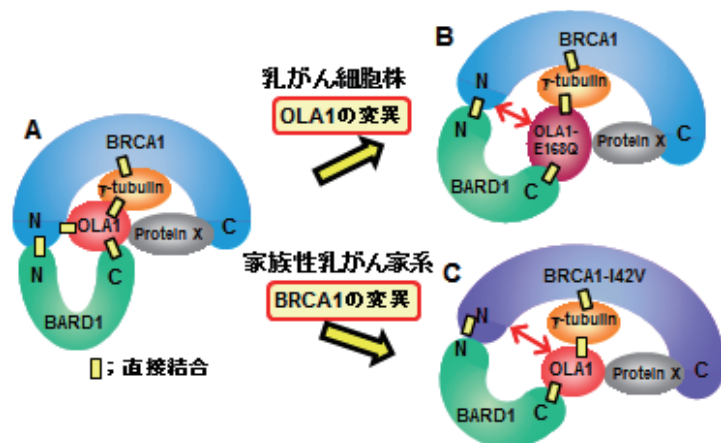


図3 OLA1/BRCA1/BARD1/γ-tubulin複合体

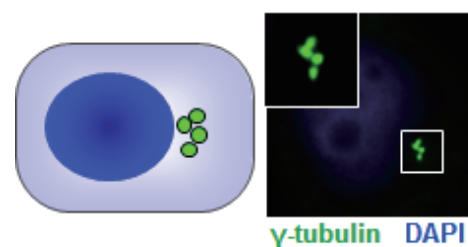


図4 中心体の増加

結 果

1. BRCA1 関連分子の中心体制御機構の解明。

1) 多くの悪性腫瘍でOLA1の変異や発現量の異常が報告されていたが、その意義は不明であった。そこで、HAタグを付加したOLA1を乳がん細胞に強制発現させ、抗HA抗体、抗γ-tubulin抗体で二重免疫染色を行い、抗HA抗体で染色される細胞において、中心体への共局在や中心体数を解析した。その結果、OLA1の過剰発現により、中心体数が増加することが明らかになった。

中心体はDNAと同様、1回の細胞周期で1度だけ複製される。G1期に母中心小体と娘中心小体が分離し、リンカーにより連結される中心小体解離が生じ、次の中心小体の複製が可能になる(ライセンス化)とされる。S期にそれぞれの中心小体に新しい娘中心小体が形成され、G2にリンカーが消失し、分裂期に2つの紡錘体極として染色体分配に働く(図5)⁽¹⁾。GFP-centrinを両中心小体のマーカーにし、母中心小体のマーカーとして抗Cep170抗体で免疫染色し、母中心小体と娘中心小体を区別して観察すると、OLA1の強制発現により、1つの母中心小体の周囲に多数の娘中心小体が観察され、中心小体の複製が過剰になることが明らかになった。

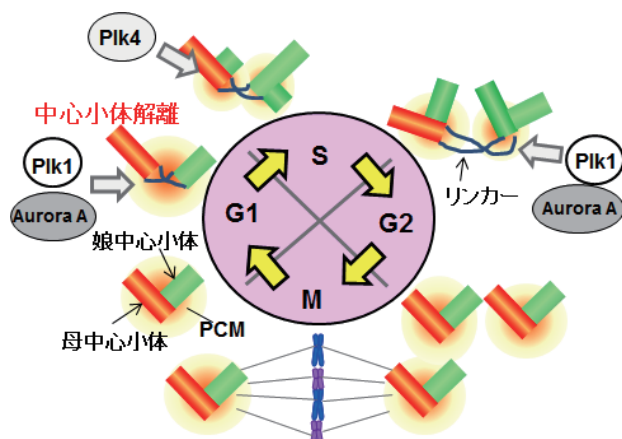


図5 中心体の複製

中心体の複製には、Aurora A、PLK1、PLK4の分裂期キナーゼの働きが重要であるとされている(図5)⁽¹⁾。免疫沈降法で、これらのキナーゼとOLA1の相互作用を解析したところ、OLA1はすべてのキナーゼと相互作用することが明らかになった。また、OLA1のリン酸化の候補部位の変異体と、ATP結合部位とされる変異体では、Aurora A、PLK1、PLK4のすべての相互作用が消失した。

- 2) 我々がOLA1の新規結合分子として同定したBIP2は、その発現量が高い乳がんで悪性度が高く、予後不良であるとされている。これまでの解析で、BIP2もOLA1同様中心体、紡錘体極に局在し、過剰発現で中心体数が増加することが明らかになっていた。BIP2の機能をさらに解析したところ、BIP2はOLA1に加え、BRCA1の中心体局在に重要なN末端領域に直接結合し、この領域の家族性乳がん由来の変異でその結合能が減弱することが明らかになった。さらにこのBRCA1の変異体では、中心体局在が野生型に比較して著しく減少した。

また、BIP2の中心体局在にはそのC末端領域が重要で、BRCA1との結合にはN末端領域が重要であることが明らかになった。

- 3) BARD1のBRCA1との結合に重要なN末端を欠くBARD1 β アイソフォームは、卵巣がんや大腸がんを高発現し、予後不良因子とされる。HAタグを付加したBARD1 β を乳がん細胞に強制発現させて、抗HA抗体、抗 γ -tubulin抗体で二重免疫染色を行い、抗HA抗体で染色される細胞において、中心体への共局在や中心体数を解析した。その結果、BARD1 β の過剰発現においても中心体数が増加し、また、GFP-centrinを両中心小体のマーカーにし、母中心小体のマーカーとして抗Cep170抗体で免疫染色した結果、BARD1 β の過剰発現においても、中心小体の複製が過剰になっていることが明らかになった。また、BARD1 β は野生型と同様に、中心体に局在することが明らかになった。

2. がん患者の臨床検体を用いたOLA1の解析

- 1) OLA1の遺伝子変異が家族性乳がんの原因となるかどうかを検討するため、23検体のBRCA1、BRCA2に変異のない家族性乳がんのgenomic DNAでOLA1遺伝子の変異の有無を解析したところ、OLA1遺伝子の変異は認められなかった⁽⁵⁾。
- 2) 我々は、食道がんでのBRCA1関連分子BAP1の発現に異常があることを既に明らかにしており⁽⁶⁾、BAP1もまた中心体を制御することが報告されている。そこで、食道がんでの臨床検体を抗OLA1抗体で免疫染色を行い、その発現について解析したところ、OLA1は細胞異型の少ない段階から発現量が多くなっていた。

考 察

近年はがんを含めたあらゆる疾患で個別化医療の確立が望まれている。現在、乳がんの化学療法では、エストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PgR)が内分泌療法の、HER2が増殖因子受容体の抗体薬のトラスツズマブのバイオマーカーとなり、治療効果をあ

げている。しかし、ER、PgR、HER2陰性のトリプルネガティブ乳がんは治療抵抗性で、乳がん治療において大きな課題となっている。トリプルネガティブ乳がんに関連の深いBasal-like乳がんとBRCA1変異による家族性乳がんの遺伝子発現プロファイルが酷似することが明らかになっており、BRCA1とその関連分子の機能解明は、トリプルネガティブ乳がんの治療法開発に貢献する可能性があり、OLA1やその関連分子は治療のバイオマーカーや標的分子として有望である。

これまで、BRCA1のDNA修復経路での機能が精力的に解析され、BRCA1のDNA修復経路での機能破綻が遺伝性乳がん・卵巣がん症候群を引き起こすと考えられてきた。しかし、OLA1がBRCA1とともに中心体を制御し、がん由来の変異でこれらの結合能が消失または低下することから(図3A, B, C)、BRCA1の中心体制御能も、BRCA1のがん抑制能に重要であることが示唆されている。

OLA1の強制発現により中心体が増加するが、これは中心小体の複製が過剰になるためであることが明らかになった。OLA1の発現抑制でも同様に中心小体の複製が過剰になることが明らかになっており⁽²⁾、OLA1は、その発現が減少しても過剰になっても中心小体の複製が過剰になることが明らかになった。これまでの解析により、中心体の複製を制御するAurora A、PLK1、PLK4の3つの分裂期キナーゼと相互作用が明らかになったことから、今後さらに解析を進めることにより、詳細なメカニズムが明らかになると考えられる。

我々が同定した新規OLA1結合分子BIP2は、BRCA1に直接結合して、BRCA1の中心体に局在に重要で、BRCA1のがん抑制能に関与することが示唆された。本分子の過剰発現は中心体数の増加をもたらし、本分子の高発現が乳がんの悪性度と関与することから、高発現による中心体増加が染色体不安定性をもたらし、がん化やその悪性度の上昇に関与する可能性がある。

さらに、BARD1 β アイソフォームの過剰発現でも中心小体の過剰複製が生じて、中心体数が増加することが明らかになった。BARD1 β は、BRCA1との結合能はないが、OLA1との結合能は保たれているため、この中心体数の増加にはOLA1が関与している可能性があると考えられた。

OLA1の機能の破綻が発がんを引き起こすことが示唆されたことより、OLA1もまた家族性乳がんの原因遺伝子である可能性があると考えた。そこで、BRCA1、BRCA2に変異のない家族性乳がんの検体で変異の有無を解析したが、OLA1の遺伝子変異は見られなかった。しかし、データベースではその他のがんで、遺伝子増幅、欠失、変異が同定されている。そこで、食道がんの臨床検体でOLA1の発現について解析したところ、OLA1は細胞異型の少ない段階から発現量が多くなっており、発がんの早い段階で異常が起きており、発がんを促進する因子として作用する可能性が示された。

以上より、さらにBRCA1、OLA1、BIP2、BARD1 β の機能を解析することで、中心体制御能の異常と発がんとの関連が解明されると考えられる。今後、OLA1やBIP2、その関連分子を治療標的やバイオマーカーにしたがんの治療法が開発されることにより、がん医療が向上し、中高年、高齢者の医学・医療に貢献できるとことが期待される。

要 約

遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の原因遺伝子産物であるBRCA1の新規結合分子OLA1とBIP2が、細胞分裂時の染色体分配において重要な中心体を制御し、その変異や発現量の異常により、複合体形成の異常が生じ、中心小体の複製が過剰になり、中心体の数の増加を引き起こすことが明らかになった。家族性乳がんにおけるOLA1の生殖細胞系列変異は同定されなかったが、データベースでは、遺伝子増幅、欠失、変異が報告されており、食道がんの臨床検体を用いた解析では、発現量の増加を認めた。さらに本研究を発展させることにより、中心体制御能の異常と発がんとの関連が解明され、OLA1やBIP2、その関連分子を治療標的やバイオマーカーにしたがんの治療法が開発され、がん医療が向上し、中高年、高齢者の医学・医療に貢献できると考えられる。

文 献

1. Fujita H, Yoshino Y, and Chiba N. Regulation of centrosome cycle. *Molecular & Cellular Oncology* 3 (2) e1075643 (2016)
2. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Shimaoka T, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell* 53 (1) , 101-114 (2014)
3. Ransburgh D*, Chiba N*, Ishioka C, and Parvin J D. (*co-first author) Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Research* 70 (3) ;988-995 (2010)
4. Kais Z, Chiba N, Ishioka C, Parvin J D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene* 31 (6) : 799-804 (2012)
5. Takahashi M*, Chiba N*, Shimodaira H, Yoshino Y, Mori T, Sumii M, Nomizu T, Ishioka C. (*co-first author) OLA1 gene sequencing in patients with BRCA1/2 mutation-negative suspected hereditary breast and ovarian cancer. *Breast Cancer* in press
6. Mori T, Sumii, M, Fujishima F, Ueno K, Emi M, Nagasaki M, Ishioka C, Chiba N, Somatic alteration and depleted nuclear expression of BAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 106 (9) :1118-1129 (2015)

謝 辞

最後に、本研究に助成頂きました、公益財団法人大和証券ヘルス財団に、心より感謝致しますとともに、貴財団のご発展を心よりお祈り申し上げます。