

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) M期染色体動態異常を標的とした新規がん治療法の開発
(英語) Development of a novel chemotherapeutics targeting chromosomal instability in cancers
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 公益財団法人がん研究会がん研究所実験病理部・部長・広田 亨
(英語) Division of Experimental Pathology, Cancer Institute
Japanese Foundation for Cancer Research, Chief, Dr. Toru Hirota
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 研究全体の統括、推進、進捗管理、HP1-CPC の相互作用を
検出するアッセイ系の構築
(英語) Directing the research project, Generating assay for HP1-CPC
interaction
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん研究所実験病理部・部長・広田 亨
(英語) Division of Experimental Pathology, Cancer Institute
Japanese Foundation for Cancer Research, Chief, Dr. Toru Hirota
- 分担研究
開発課題名： (日本語) HP1 と CPC の相互作用を阻害する化合物のスクリーニング
(英語) Searching for compounds affecting interaction of HP1 with CPC
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん研究所実験病理部・研究助手・加藤詩子
(英語) Division of Experimental Pathology, Cancer Institute
Japanese Foundation for Cancer Research, Technical staff,
Dr. Utako Kato

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

がん細胞の異数体化は、進行癌の腫瘍内多様性、治療抵抗性と関連していると指摘されている。従って、細胞分裂のたびに異数体細胞を作り出してしまう「染色体不安定性」の原因や分子背景に基づいた治療法ができれば、進行癌の制御に大きく貢献することが期待される。われわれは、がん細胞と正常細胞の細胞分裂にどのような違いがあるのかを追究し続けてきた。そのなかで最近、正確な染色体分配のために中心的な役割をもつ Aurora B の複合体（染色体パセンジャー複合体 Chromosomal Passenger Complex, CPC）のはたらきが、広くがん細胞で脆弱であることを見出した。この複合体の脆弱化は染色体の分配異常に直結するため、がん細胞が染色体不安定性を獲得する背景として重要な役割を持つことが推察された。

こうした知見に基づいて、本研究開発では、CPC 機能を標的とした治療法の開発を進める。がん細胞における Aurora B の活性化機構にある分子間相互作用を狙ったシーズを取得することによって、脆弱化した染色体分配機能にピンポイントに負荷をかけるという治療戦略である。具体的には Aurora B のアロステリック効果のある HP1 が、CPC と結合するのを阻害する効果のある化合物の探索を目的とした。がん細胞における HP1 と CPC の結合は、正常細胞と比較して、不安定になっていることから、その差異を狙った介入方法を目指す。

平成28年度は、HP1 が CPC の相互作用を検出するアッセイ系の構築を行った。具体的には、それぞれのリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* プルダウン・アッセイを行い、結合に関与するドメインを特定した。次いで両者の結合ドメインを、Alpha アッセイ用のアクセプター及びドナービーズに結合してアッセイ系を構築した。担体であるビーズや付与するタグの組み合わせによって、相互作用の検出感度が大きく影響されたが、可能な限りを検討して最適な組み合わせを絞り込んだ。さらに、大規模スクリーニングに向けて、バッファー条件等の最適化を進めてスモールスケールで十分なシグナルを再現性よく得られる条件を決定した。これらのアッセイ系を用いて、技術支援班と連携をとりながら、次年度に化合物スクリーニングを進める計画である。

さらに技術支援についてのマッチング会議において、細胞レベルで Aurora B 複合体と HP1 の結合を検出する細胞アッセイ系の構築の提案があり、スプリット・ルシフェラーゼ法の構築を進めた。これは二次スクリーニングで活用できるばかりではなく、これ自体を細胞アッセイ系としてスクリーニングに用いることを次の展開で検討する。

英文

Targeting mitosis has been expected to be a promising strategy to suppress cancer progression. Molecules controlling mitotic machinery, including mitotic kinases and motors, are potential targets for intervention and a number of agents have been exploited. However, their clinical trials are regrettably overall unsuccessful. Targeting mitosis is indeed challenging mainly because its disruption in normal proliferating cells often causes serious side effects. To overcome this, we need to elucidate the mechanistic difference of mitotic control between normal and cancer cells. A number of studies point out that merotelic attachment of microtubules is the leading cause of chromosome missegregation found in CIN cancer cells. Aurora B-mediated correction function plays central role in removing those erroneous merotelic attachments.

The subunits of the Aurora B complex or chromosomal passenger complex (CPC) is overexpressed in many solid tumors and a corollary is that hyper-activity of Aurora B may interfere with the correction function. As opposed to these assumptions, however, we recently found that cancer cells indeed contain lower Aurora B activity, a condition that directly leads cells to CIN. These findings are based on our finding that HP1 is an allosteric activator of Aurora B and that HP1 binding to the CPC is particularly important when Aurora B phosphorylates kinetochore substrates to eliminate erroneous microtubule attachments (Abe et al., Dev Cell 2016). Remarkably, a wide-range of cancer cells reveals consistent reduction of HP1-bound CPC, which causes impairment in Aurora B activity.

These findings allow a prediction that the impaired function of Aurora B is an appealing candidate for drug target. We reasoned that further inhibition of Aurora B activity, which is already weakened in cancer cells, must give rise to lethal-levels of chromosome segregation failure. Along with this concept, we aimed to set up an assay to search for small molecules that can interfere the interaction of HP1 with the CPC. In 2016FY, we first identified the protein domains that mediate the interaction. We then used these domains for the Amplified Luminescence Proximity Homogeneous (Alpha) assay, and optimized the assay conditions for upcoming large-scale screen.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Takahashi, M., Wakai, T., and Hirota, T. (2016) Condensin I-mediated mitotic chromosome assembly requires association with chromokinesin KIF4A. *Genes Dev.* 30: 1931-1936. doi: 10.1101/gad.282855.116.
2. Uchida, KSK and Hirota, T. (2016) Spindle assembly checkpoint: its control and aberration (Chapter 17). F. Hanaoka and K. Sugawara (eds.), DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology, DOI: 10.1007/978-4-431-55873-6_17

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hirota, T. “Molecular imaging reveals dynamic structure of kinetochores.” The 57th annual meeting of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry (Tokyo) September 2016, 国内.
2. Hirota, T. “Kinetic control of the M/A transition in failsafe mitosis.” SKKU International symposium on biomedical science. (Suwon) October 2016, 海外.
3. 広田 亨. 「分子イメージングによって見えてきたキネトコアの動的構造」第 68 回日本細胞生物学会大会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会・合同大会 (京都) 2016 年 6 月, 国内.
4. 広田 亨. 「分子イメージング顕微鏡解析法が見出した動原体のストレッチング」. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、共催ワークショップ「広がる超解像顕微鏡の世界」(東京) 2016 年 9 月, 国内.
5. 広田 亨. 「クロマチン分子 HP1 による Aurora B キナーゼの活性化：明かされつつあるがん染色体動態の分子背景。」第 89 回日本生化学会大会、シンポジウム「疾患における細胞核・クロマチンの動態変動」(仙台) 2016 年 9 月, 国内.

6. 広田 亨「がんにおける染色体不安定性の分子背景の解明」第4回 Joint Nature Conference of Respiriology. 特別講演（東京）2016年11月，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 広田 亨「知っておこう、がんのこと」 小山市穂積公民館講演会、2016年10月、国内

(4) 特許出願

PCT/JP2017/7444