

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15594

研究課題名(和文) 循環乳癌細胞を用いたDNA修復能測定系の樹立：PARP阻害剤適応決定へのカギ

研究課題名(英文) Establishment of a system to measure DNA repair activity using circulating tumor cells: the key to predict sensitivity to PARP inhibitors

研究代表者

光武 範吏 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：50404215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織より乳癌細胞を単離し、培養増殖させることができる手法を開発した。これを用い、家族性・遺伝性である可能性が高い乳癌症例より細胞を単離増殖させ、凍結保存を行った。いくつかの手法を試みたが、血中循環乳癌細胞の単離は可能なものの、培養増殖は困難であると考えられ、現時点では乳癌組織からの培養細胞を用いた研究を優先することとした。

細胞にDNA二重鎖切断を起こさせた後、核染色とリン酸化H2AXによる蛍光免疫染色を行い、細胞周期G2期における残存損傷を定量化することによって当該細胞における相同組み換えによるDNA修復能を測定する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)： We have developed a method to isolate and proliferate primary breast cancer cells from clinical tissue samples. Using this method, we have made frozen stocks of the cells isolated from cases with high probability of familial/hereditary breast cancers.

Although isolating circulating tumor cells (CTCs) was possible, it was unfortunately difficult to propagate them. Because of that, we focused on the study using cells isolated from cancer tissues.

We have developed a method by which DNA repair activity by homologous recombination can be measured. In this method, residual DNA damage was quantified at the G2 phase using nuclear and phospho-H2AX staining.

研究分野：内分泌腫瘍学

キーワード：乳癌 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

BRCA1/BRCA2 遺伝子変異による遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) とそれらに対する Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤であるオラパリブ等の使用が近年大きな注目を集めている。PARP は細胞内でもっとも高頻度に発生する塩基欠損由来の一本鎖 DNA 切断 (single strand break: SSB) 損傷の修復に関与し、ゲノムの恒常性を維持している。PARP 阻害剤を投与すると異常な SSB が蓄積し、それらは細胞周期が S 期に入ると複製フォークの崩壊と二重鎖切断を引き起こすが、正常細胞では相同組み換え (homologous recombination: HR) によって修復される。ところが BRCA1/BRCA2 遺伝子異常があると、この HR による修復が行えなくなり、細胞死を引き起こす。つまりオラパリブは、BRCA1/BRCA2 が機能している正常細胞には影響を与えず、それが無い癌細胞のみを標的にできると考えられ、現在有望視されている。

乳癌のおおよそ 5-10% が家族性とされるが、このうち半数程度が BRCA1/BRCA2 の変異によって生じるものとされている。ところが、現時点では下記のような問題点が挙げられる。

- (1) 家族性乳癌に対しての BRCA1/BRCA2 遺伝子検査だが、これら遺伝子は巨大で、しかも点突然変異だけでなく大きな欠失なども検査すべきであり、完全な遺伝子検査は簡単ではない。また、点突然変異が発見されても、それが病的なものか判断が難しいケースが存在する。
- (2) 散発性乳癌でも、BRCA1/BRCA2 異常が関与している場合があり、これらの癌には同様にオラパリブ等の PARP 阻害剤が有効である可能性がある。しかし、これはゲノム DNA の検査では判定できず、癌細胞自体を解析する必要がある。
- (3) BRCA1/BRCA2 遺伝子に異常が無くとも、プロモーターのメチル化やタンパク質レベルで機能が欠損している場合もあり、これらは通常の変異検査では検出できない。
- (4) BRCA1/BRCA2 に異常が無い家族性乳癌もあり (約半数) 多くは未だ原因遺伝子が同定されていない。この中にも HR 異常を示す症例があるはずで、同じく PARP 阻害剤が有効なはずである。

上述の問題点は、全て癌細胞における HR の活性を測定することによって解決できると考えた。

さらに近年、癌患者では、癌細胞は癌組織

にだけ存在するのではなく、非常に少数ながら、血液中を循環していることが分かってきた。さらに様々な技術革新により、この末梢血中の circulating tumor cell (CTC) の分離が可能となってきた。採血という侵襲が低い方法で検査が可能となれば、これを用いた予後予測や治療感受性判定への応用が期待されている。本研究では、CTC における DNA 修復能に着目し、この CTC における DNA 修復能の測定が可能となれば、上記の解析を低侵襲、また手術適応とならない患者にも応用できると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の主要な目的は、以下の 4 つであった。

- (1) 遺伝性・家族性が疑われる乳癌症例より試料を収集・保存すること。本研究遂行のために必要となるのみならず、これらの症例をバンキングすることによって、将来の研究に活かすことのできる研究基盤を確立する。
- (2) 乳癌組織、さらには血液中の CTC より癌細胞を分離培養できる実験系を確立すること。これには、以下の 3) の測定を行うために十分な数の細胞を確保することが含まれる。
- (3) 患者癌細胞における HR を対象とした DNA 修復能測定方法を確立すること。可能であれば、定量化できる方法を確立する。
- (4) HR による DNA 修復能と DNA の構造異常、遺伝子変異の相関を調べること。

3. 研究の方法

- (1) 乳癌症例の収集：長崎大学病院・福岡市の乳癌専門病院である及川病院において、インフォームドコンセントを得られた乳癌患者より検体を採取する。HR 不全を起こしている可能性が高い、家族性・遺伝性が疑われる症例、ホルモンレセプタートリプルネガティブ症例、多数の CTC が血液中出现していると考えられる進行症例を中心に選択する。
- (2) 乳癌細胞初代培養方法の確立：上記の手術検体より、様々な方法で乳癌細胞初代培養方法を確立する。様々な種類の培地や阻害剤、成長因子、血清を組合せ、線維芽細胞の増殖を抑え、癌細胞を選択的に増殖させる培養法を開発する。また、得られた細胞を凍結保存し、以降の研究に使用する。

- (3) CTC の分離培養方法の確立：多数の血液細胞中のごく少数の癌細胞を分離培養する方法を確立する。特殊なフィルターを使い、遠心分離により分取する方法、上皮細胞のマーカーに対する抗体を用い、セルソーターにより分取する方法等を試みる。分取した後は、上記 2) で確立した培養方法等を用い、癌細胞を選択的に、かつ様々な解析に用いることができる細胞数にまで増殖させる。
- (4) HR による DNA 修復能測定方法の確立：DNA 二重鎖切断修復には非相同末端結合 non-homologous end joining (NHEJ) と HR のふたつの修復機序があるが、本研究では、HR による修復能に着目し、可能な限りこれを反映するアッセイ系を確立する。HR は DNA 複製後の S-G2 期にのみ行われるとされており、細胞周期を測定しつつ、DNA 二重鎖切断、または HR を実行している際に特異的に集積するタンパク質への抗体を用いた蛍光染色方法等を試み、安定した手法を確立する。

4. 研究成果

- (1) 乳癌細胞初代培養方法の確立：手術によって摘出された癌組織を Miltenyi Biotech 社の gentleMACS Dissociator と Tumor Dissociation Kit を用いて処理し、組織を融解、細胞を遊離させた。引き続き、ES/iPS 細胞用培地 (ES)、ヒト間葉系幹細胞用培地 (MSCGM)、乳腺上皮細胞用培地 (MEGM) 放射線照射マウス線維芽細胞 (feeder)、ROCK 阻害剤 (Y27632)、TGF-beta 阻害剤 (SB431542) 等を組み合わせ、培養条件を最適化したところ、ES/MSCGM + Y27632 + SB431542 + feeder で単離後の初回培養を行った後、同じく ES/MSCGM + Y27632 + SB431542 + feeder 培地と MEGM + Y27632 + SB431542 + feeder の二群に分けて培養を継続する方法を確立し、乳癌細胞をある程度選択的に増殖させられることが分かった。症例によっては線維芽細胞が増殖してくるものもあったが、トリプシン処理にて線維芽細胞のみを剥離させ、上皮細胞の集団を優位に保つことができた。以降はこの方法を用いて培養を行った。同時に手術時の正常組織から ES/MSCGM + Y27632 + SB431542、もしくはケラチノサイト用培地 KGM + Y27632 + SB431542 によって正常線維芽細胞を増殖させ、正常コントロールとして用いた。以上より、乳癌組織からの初代培養方法はほぼ確立できたと考える。癌細胞といえども、初代培

養は難しいことが多く、本手法の開発によって、今後の研究にも活かすことができるものと考えられた。

- (2) 乳癌症例の収集：家族性・遺伝性の可能性が高い症例について、インフォームドコンセントを行って検体を採取した。乳癌組織より上記(1)にて確立した方法を用いて初代培養細胞を行い、細胞を増殖させた後に凍結保存を行った。20 例のストックを作成することができた。また、長崎大学病院にて保存されていた、同様に家族性・遺伝性の可能性が高い 15 症例の凍結保存組織を選び出し、DNA を抽出した。凍結組織からは生細胞を用いたバイオアッセイを行うことができず、DNA 修復能の測定はできないが、ゲノムの構造異常や原因遺伝子の同定には使用することが可能で、今後の研究にも活かすことができると考えられた。
- (3) CTC の分取・培養：まずは、樹立された癌細胞株を正常血液に混入し、分取・培養方法の予備実験を行った。遠心分離法、セルソーティング法などを試みたが、かなりの数の癌細胞を用いないと培養までは成功せず、通常の血液中に含まれているとされる数の CTC から培養が成功するのは非常に低確率であることが予想された。収集できる症例数も考慮に入れ、CTC の培養方法を追求するよりも、癌組織から培養した細胞における DNA 修復能測定から原因となる遺伝子を明らかにし、cell-free DNA を用いた遺伝子診断を行う方向へ研究をシフトするのが望ましいと考えられた。
- (4) HR による DNA 修復能測定方法の確立：培養細胞に放射線照射やオラパリブ処理を行い、S 期通過マーカーとして EdU 処理、G2 期マーカーとして CENPF、HR 実行マーカーとして RAD51 の免疫蛍光染色等を組合せ、HR による DNA 修復能の検討を行った。G2 期の RAD51 フォカス形成を指標として、樹立されたヒト正常線維芽細胞株では条件を最適化できたものの、引き続き乳腺細胞、乳癌細胞を用いると、細胞の種類によっては同様の染色条件では均一な染色結果が得られず、様々な症例における信頼性の高いフォーカス数の測定は難しいと考えられた。そこで方針を変更し、7-AAD による核染色とリン酸化 H2AX に対する免疫蛍光染色を用い、フローサイトメトリーで G2 期の残存切断を定量化する方法を確立した。研究期間終了時点では、乳腺細胞に対しても、蛍光量の分布の違いで判別を行っているが、今後もさらなる実験の最適化は必要と考えられる。

- (5) 収集した症例より、HR に異常を持つ可能性が高い症例を選択するために、DNA を抽出し、arrayCGH を施行した。15 Mbp 以上の LOH を持つということを HR 欠損の指標として、症例をさらに絞り込むことができた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

中沢 由華、ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索、日本分子生物学会年会、2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/drms/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

光武 範吏 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号 : 50404215

(2) 研究分担者

中沢 由華 (NAKAZAWA, Yuka)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号 : 00533902

(3) 研究協力者

田中 彩 (TANAKA, Aya)