

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16519

研究課題名(和文) マイトファジーにおけるBRCA1の機能解明とBRCA1変異乳癌の新規治療開発

研究課題名(英文) Elucidation of BRCA1 function and development of new treatment for BRCA1 mutated breast cancer in mitophagy

研究代表者

宮原 かな (Miyahara, Kana)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90532391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は研究開始当初に予定していたマイトファジーにおけるBRCA1の機能解明を試みたが、BRCA1とマイトファジーの関連性を証明することはできなかった。しかしながら、本研究過程において、我々は、1) ミトコンドリアダメージがPINK1/Parkinを介してBRCA1をユビキチン・プロテアソーム系で分解する。2) 乳癌組織では正常乳腺組織に比べ、BRCA1高発現、PINK1、Parkin低発現である。3) BRCA1高発現、PINK1低発現が細胞増殖に有利に働き、乳癌患者のRFSを短縮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子産物であり遺伝子組み換え修復に関与するBRCA1と、ミトコンドリアにおけるオートファジーであるマイトファジーの中心的機能を果たすPINK1/Parkinという今まで交わることのなかった3つのタンパクが、直接的に相互作用していることが明らかになったことは学術的に意義深いと考える。さらに、乳癌組織においてBRCA1とPINK1/Parkinの発現が逆相関しており、BRCA1の発現が癌細胞増殖や患者予後にも関与していることは、臨床学的にも意義深く、今後治療のターゲットになりうると考える。

研究成果の概要(英文)：Although we tried to elucidate the function of BRCA1 in mitophagy that was planned at the start of the study, we could not prove the relationship between BRCA1 and mitophagy. However, in the course of research, we have revealed that 1) Mitochondrial damage promotes BRCA1 degradation via PINK1-Parkin pathway by ubiquitin-proteasome system. 2) In breast cancer tissues, BRCA1 expression is higher, and PINK1 and Parkin expressions are lower than normal tissues. 3) Higher BRCA1 expression with lower PINK1/Parkin expressions appears to be advantageous to tumor progression, which leads to shorter recurrence-free survival of breast cancer patients.

研究分野：乳癌

キーワード：BRCA1 Parkin PINK1 ミトコンドリアダメージ 乳癌 ユビキチン・プロテアソーム タンパク分解 オートファジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性における最も罹患率の高い癌であり、わが国における女性の乳癌罹患率は増加の一途を辿っている。中でも **BRCA1** 遺伝子変異が原因となる遺伝性乳癌卵巣癌症候群は、乳癌を **44-88%**と高率に発症し、発症した乳癌の増殖・転移能が高いという特徴を持つ。**BRCA1** の機能の更なる解明とそれを標的とした新規治療法開発が求められている。

また、近年、**BRCA1** 同様に癌抑制遺伝子である **p53** により誘導されるタンパクがミトコンドリアの品質管理において重要な役割を果たすことや (**Kitamura N, et al. Pros One 2011**)、ミトコンドリアにおける選択的オートファジーであるマイトファジーに **DNA** 修復タンパクである **Fanconi Anemia** タンパクが関与していることが報告された (**Sumpter R Jr, et al. Cell 2016**)。ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生を司るとともに、アポトーシスにも関与する重要なオルガネラであるため、不良ミトコンドリアのクリアランスによりミトコンドリアの質を維持することは、細胞全体の恒常性維持の上で重要な機構であり、逆にマイトファジーが機能不全に陥ると、ミトコンドリアのみならず細胞全体の **ROS** 増加により細胞死に陥ると考えられる。

BRCA1 変異乳癌がマイトファジー不全状態であるとすれば、ミトコンドリアダメージに対してナイーブであると考えられるため、人為的なミトコンドリアダメージや **mitROS** 増加により効率的な細胞死誘導が可能となることが予想される。このことから、**BRCA1** 変異乳癌に対するミトコンドリアを標的とした新規治療法開発を目的とし、**BRCA1** のマイトファジー誘導メカニズムの解明という本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの選択的オートファジーであるマイトファジーは、ミトコンドリアの恒常性維持に関わる重要な機構であり、マイトファジーの異常はゲノム毒性の蓄積や細胞死へと直結する。本研究の目的は、マイトファジーにおける **BRCA1** の詳細な機能解析を行うことで、難治性の **BRCA1** 変異乳癌に対するマイトファジーを標的とした新規治療法開発に向けた基盤形成である。

3. 研究の方法

乳癌細胞における BRCA1 のマイトファジー誘導能の検証

- BRCA1 ノックダウン MCF7 を用いたマイトファジー阻害の観察
- ミトコンドリアダメージによる BRCA1 分解の検証
- 乳癌細胞株、他癌種細胞株を用いたミトコンドリア阻害剤による BRCA1 減少の観察
- ユビキチン・プロテアソーム系による BRCA1 分解の観察
- BRCA1 分解への PINK1 の関与の検証
- マイトファジー関連遺伝子 PINK1 ノックアウト MCF7 を用いた BRCA1 分解の観察
- ミトコンドリアダメージによる DNA ダメージ誘導の検証
- ミトコンドリアダメージが生じた際の BRCA1 分解と ROS および DNA ダメージの観察
- 乳癌組織における BRCA1 と PINK1/Parkin 発現の相関性の検証
- TCGA データベースを用いた乳癌組織における BRCA1、PINK1、Parkin 発現の検証
- 乳癌患者の手術検体を用いた BRCA1、PINK1、Parkin 発現の観察
- BRCA1 発現と癌増殖能や患者生命予後との相関性の検証
- BRCA1 ノックダウン MCF7 細胞を用いた増殖およびコロニー形成の観察
- TCGA データベースを用いた BRCA1、PINK1、Parkin 発現と無再発生存率の相関性の検証
- Parkin による BRCA1 分解と相互作用の検証
- Myc-BRCA1, FLAG-Parkin 共発現 HEK293T を用いた共免疫沈降実験による Parkin による BRCA1 分解の直接的相互作用の検証
- ドメイン欠損 BRCA1 を用いた BRCA1 における Parkin 結合ドメインの同定
- ドメイン欠損 Parkin を用いた Parkin における BRCA1 結合ドメインの同定

4. 研究成果

乳癌細胞における BRCA1 のマイトファジー誘導能は証明されなかった。

本研究開始当初の目的である BRCA1 のマイトファジー誘導能を検証するため、Parkin 強制発現 BRCA1 ノックダウン MCF7 を用いて、ミトコンドリア阻害剤添加時にマイトファジーが阻害されるかどうか観察したが、BRCA1 の発現は、マイトファジーに影響しなかった。そのため、残念ながらこの時点で BRCA1 のマイトファジー誘導能は証明されないという結論に至った。しかし、この実験系の中で、ミトコンドリア阻害剤添加により BRCA1 が減少するという現象を偶然にも発見した。そのため、以降の方法で、この現象に関して深く検証していくこととなった。

ミトコンドリアダメージによりユビキチン・プロテアソーム系を介して BRCA1 分解された。

乳癌細胞株や他癌種細胞株を用いてミトコンドリア阻害剤 CCCP 添加による BRCA1 減少の観察したところ、癌種問わず全細胞株で BRCA1 減少が認められた。次に、BRCA1 減少にユビキチン・プロテアソーム系が関与しているかどうか検証するため、プロテアソーム阻害剤 MG132 添加による BRCA1 変化を観察したところ、MG132 添加により BRCA1 減少が阻害された。このことからミトコンドリアダメージにより、ユビキチン・プロテアソーム系を介して BRCA1 が分解されることが明らかになった。

PINK1 依存性に BRCA1 は分解された。

PINK1 ノックアウト MCF7 を用いて、PINK1 の BRCA1 分解への関与を検証したところ、PINK1 ノックアウトにより BRCA1 分解は阻害された。以上より、BRCA1 分解は PINK1 依存性であることが証明された。

ミトコンドリアダメージにより ROS および DNA ダメージが誘導された。

CCCp によりミトコンドリアダメージが生じると H2AX 及び ROS が増加し、MG132 でユビキチン・プロテアソーム系を阻害すると、この H2AX 及び ROS の増加は抑制された。

乳癌組織において BRCA1 と PINK1/Parkin の発現は逆相関していた。

TCGA データベースを用いて乳癌組織における BRCA1、PINK1、Parkin 発現を観察したところ、正常乳腺組織と比較し乳癌組織では、BRCA1 が高発現であり、逆に PINK1、Parkin は低発現であった。乳癌患者の手術検体を用いて BRCA1、PINK1、Parkin 発現を観察すると、TCGA データベース同様、乳癌組織において、BRCA1 高発現、PINK1、Parkin 低発現と逆相関の傾向を認めた。さらに、乳癌組織をサブタイプ別に比較すると、Luminal<Luminal-HER2<HER2<triple negative と、サブタイプによる癌悪性度と比例して BRCA1 発現が増加している傾向が認められた。

BRCA1 発現は癌増殖能や患者生命予後と相関性を認めた。

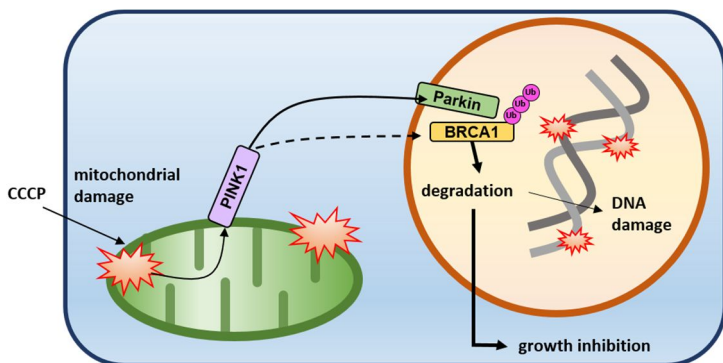
BRCA1 ノックダウン MCF7 細胞を用いた増殖およびコロニー形成の観察では、BRCA1 ノックダウンにより、細胞増殖およびコロニー形成は抑制された。さらに、TCGA データベースを用いて BRCA1、PINK1、Parkin 発現と無再発生存率 (RFS) を調べると、BRCA1 高発現、PINK1、Parkin 低発現の方が、RFS が短い傾向にあった。

Parkin は直接的に BRCA1 に結合しユビキチン化することで BRCA1 を分解した。

Myc-BRCA1、FLAG-Parkin 共発現 HEK293T を用いた共免疫沈降では、ユビキチン化された Myc-BRCA1 が FLAG-Parkin と共沈し、Parkin が BRCA1 と直接相互作用してユビキチン化することが示唆された。さらに、ドメイン欠損 BRCA1 およびドメイン欠損 Parkin を用いた共免疫沈降により、両者の直接結合には、BRCA1 の N 末端欠失 ($\Delta 1-167$)、Parkin の IBR ドメインと RINGO ドメインが重要であることが明らかになった。

【結論】

- ・ミトコンドリアダメージが PINK1、Parkin を介して BRCA1 をユビキチン・プロテアソーム系で分解する。
- ・乳癌組織では正常乳腺組織に比べ、BRCA1 高発現、PINK1、Parkin 低発現である。
- ・BRCA1 高発現、PINK1 低発現が細胞増殖に有利に働き、乳癌患者の RFS を短縮する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮原か奈、高野直治、石川孝、宮澤啓介
2. 発表標題 乳癌細胞におけるミトコンドリアダメージ応答性の新規BRCA1分解システム
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kana Miyahara, Hiromi Kazama, Takashi Ishikawa, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 BRCA1 degradation in response to mitochondrial damage in breast cancer cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoharu Takano, Kana Miyahara, Hiromi Kazama, Hirotsugu Hino, Masaki Hiramoto, Masahiko Kuroda, Takashi Ishikawa, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Mitochondrial damage induces BRCA1 degradation in breast cancer cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野直治、宮原か奈、山田裕美子、風間宏美、徳久真弓、日野浩嗣、藤田浩司、Edward Barroga、平本正樹、半田宏、黒田雅彦、石川孝、宮澤啓介
2. 発表標題 乳癌細胞におけるミトコンドリアダメージ応答性の新規BRCA1分解システム
3. 学会等名 第184回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野直治、宮原か奈、山田裕美子、風間宏美、徳久真弓、日野浩嗣、藤田浩司、 Edward Barroga, 平本正樹、半田宏、黒田雅彦、石川孝、宮澤啓介
2. 発表標題 乳がん細胞におけるミトコンドリアダメージによって誘導されるBRCA1の新規分解機構
3. 学会等名 第92回大会 生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮原か奈
2. 発表標題 再発乳癌に対する「小胞体ストレス負荷療法」の確立を目的としたMDA-MB-231-ERAI-venus システムの応用
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kana Miyahara
2. 発表標題 Designing effective drug combinations for targeting ER stress loading in cancer therapy using MDA-MB-231-ERAI-venus system
3. 学会等名 11th AACR-JCA joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮原 か奈
2. 発表標題 転移性乳癌に対するアグリソームを標的とする新規治療法の可能性
3. 学会等名 第26回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮原 か奈
2. 発表標題 乳癌細胞株におけるアグリソーム形成を標的としたボルテゾミブとピノレルピンの併用療法の有効性
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高野 直治 (Takano Naoharu)		
研究協力者	山田 裕美子 (Yamada Yumiko)		
研究協力者	風間 宏美 (Kazama Hiromi)		
研究協力者	徳久 真弓 (Tokuhisa Mayumi)		
研究協力者	日野 浩嗣 (Hino Hirotsugu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤田 浩司 (Fujita Koji)		
研究協力者	平本 正樹 (Hiramoto Masaki)		
研究協力者	半田 宏 (Handa Hiroshi)		
研究協力者	黒田 雅彦 (Kuroda Masahiko)		
研究協力者	石川 孝 (Ishikawa Takashi)		
研究協力者	宮澤 啓介 (Miyazawa Keisuke)		