

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08605

研究課題名(和文) PARP阻害剤感受性を亢進するmicroRNAを用いたTNBC治療法の開発

研究課題名(英文) Novel approaches for triple-negative breast cancer using microRNAs that enhance PARP inhibitor sensitivity

研究代表者

奥井 理予 (Okui, Michiyo)

桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師

研究者番号：20327654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1) は、一本鎖DNAの修復に重要な役割を果たす酵素であり、BRCA1/2遺伝子に変異を有する細胞はPARP阻害剤 (olaparib) に対して高感受性を示す。しかし、olaparibの薬剤耐性機構については不明な点も多い。

本研究課題では、これまでに同定したolaparib感受性を亢進するmiR-X、miR-Y、miR-Zについて機能解析を行った。その結果、ヒト乳癌細胞株にmiR-X、miR-Y、miR-Zをトランスフェクションすると、BRCA1タンパク質のリン酸化が著しく抑制され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

近年、microRNA (miRNA) が癌抑制因子や癌促進因子として働くことが報告され、そのメカニズムを解明することは新しい治療法を確立する上で欠かすことのできない研究テーマとなっている。olaparib (商品名：Lynparza) はPARP阻害剤の経口薬として期待される一方、耐性獲得などの課題が残されている。申請者は、olaparib感受性を亢進するmiRNA (miR-X、miR-Y、miR-Z) を同定し、これらがヒト乳癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。今後、この細胞増殖抑制メカニズムを解明し、治療の難しいTNBCやHBOCに対して有効なolaparib併用療法の確立に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) effectively kill homologous recombination deficient tumor cells through the concept of synthetic lethality. However, PARPi resistance frequently occurs, and therefore additional strategies that synergize with PARPi to enhance anti-tumor activity are necessary. To develop approaches for enhancing the effectiveness of PARPi, we have identified the microRNAs (miR-X, miR-Y and miR-Z) and found that the up-regulation of miR-X, miR-Y and miR-Z suppressed the BRCA1 phosphorylation in human breast cancer cells. These results suggest that miR-X, miR-Y, and miR-Z may improve the chemotherapeutic efficacy of olaparib in BRCA-proficient cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：PARP阻害剤 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

BRCA1/2は、二本鎖DNAの修復に重要な役割を果たす遺伝子である。BRCA1/2遺伝子に変異を有する患者は、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) や遺伝性乳癌卵巣癌 (HBOC) を発症するが、明らかなターゲットが存在しないため、治療が難しい。PARP阻害剤は一本鎖DNAを修復するPARPの機能を阻害するが、BRCA1/2遺伝子が正常な細胞では、PARP阻害剤を加えても相同組換えによってDNAが修復され、生き延びることができる。一方、BRCA1/2遺伝子が機能しない細胞にPARP阻害剤を加えると、DNA修復ができず、細胞死 (アポトーシス) を引き起こす (合成致死)。BRCA1/2遺伝子以外の相同組換え関連遺伝子 (ATM, ATR, CHK1,CHK2, NBS, RAD51, RAD54, FANCA, FANCC, FANCD2など) に変異を持つ癌細胞も、olaparibに対して高感受性を示す (BRCAness) ことから、PARP阻害剤の適応拡大やテーラーメイド医療への発展が期待される。しかし、BRCAnessである症例を適切に判定する方法は未だ確立されておらず、PARP阻害剤に対して耐性を獲得する症例の報告など課題も残されている。また、olaparibを用いた併用療法についても様々な組合せが考えられ、未だ確立されていない。

*Brca1* 遺伝子と *Brca2* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスは、いずれも胎生致死であるため解析が難しい。そこで申請者らの研究グループは、*Brca2* 遺伝子の発現を脳特異的に抑制したコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、この *Brca2* cKOマウスが高頻度に髄芽腫を発症することを報告した (Frapaart et al. 2007 EMBO J, Kimura H et al, 2005 Oncogene)。また、申請者は、*Brca2* cKOマウス (*Brca2*<sup>Nes-cre</sup>; *p53*<sup>-/-</sup>) や *Ptch1* KOマウス (*Ptch1*<sup>+/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup>) の髄芽腫から独自に細胞株を樹立し、TaqMan microRNA Array による発現解析を行った。その結果、*Brca2* cKOマウスから樹立した髄芽腫細胞では、olaparibに対して高感受性を示すとともに、miR-X、miR-Y、miR-Zの発現量が増加していた。一方、DNA修復機構が正常な *Ptch1* KOマウス由来髄芽腫細胞では、olaparib感受性が低く、olaparib添加後もmiR-X、miR-Y、miR-Zの発現量は変わらなかった。

次に、マウス髄芽腫細胞を用いた実験により、miR-X、miR-Y、miR-Zの発現を誘導する薬剤として、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) を同定し、olaparibとTSAの併用により細胞増殖が抑制されることが分かった。また、miR-X、miR-Y、miR-Zの塩基配列は、ヒトとマウスで100%の相同性を示し、ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) にmiR-X、miR-Y、miR-Zの混合液 (miR-Mix) をtransfectionすると、細胞増殖が抑制された。本研究では、miR-X、miR-Y、miR-Zがolaparib感受性を亢進するメカニズムを明らかにし、TNBCやHBOCに有効な新規治療法の開発に繋げたい。

## 2. 研究の目的

TNBCやHBOCは予後が悪く、早期に再発する。TNBC患者の予後を改善すべく数多くの研究が行われているが、TNBCには明確な治療標的が存在しないため、新規分子標的薬を用いた臨床試験においても良い結果が得られていない。申請者は、ヒト乳癌細胞株にmiR-Mixを導入すると増殖が抑制されることを見出した。本研究課題では、miR-X、miR-Y、miR-Zの機能を調べ、治療が難しいTNBCやHBOCに有効なolaparib併用療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1) miR-X、miR-Y、miR-Z の導入による細胞増殖実験

ヒト乳癌細胞株 (MCF-7、MDA-MB-453) にmiR-X、miR-Y、miR-Zを同時にトランスフェクションした後、olaparibを加え、細胞増殖実験を行った。

#### 2) miR-X、miR-Y、miR-Z の発現を誘導する薬剤のスクリーニング

ヒト乳癌細胞株を用い、miR-X、miR-Y、miR-Zの発現を誘導する薬剤のスクリーニングを行った。具体的には、MDA-MB-231細胞とMDA-MB-453細胞に各種抗癌剤を加え、48時間後にRNAを回収し、TaqManアッセイによるmiRNA定量PCRを行った。

#### 3) miR-X、miR-Y、miR-Z の機能解析

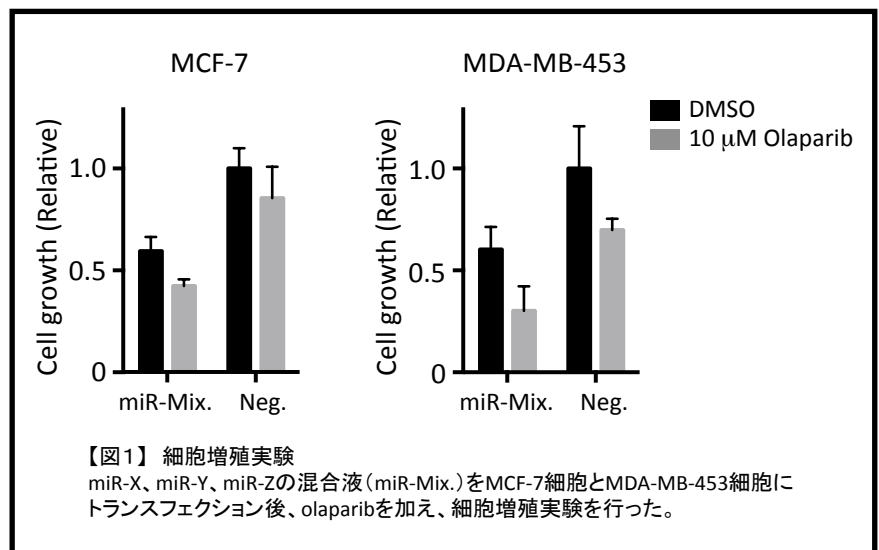
ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) にmiR-X、miR-Y、miR-Zをトランスフェクションし、phospho-BRCA1や $\gamma$ -H2AXなどDNA修復経路に関与するタンパク質の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) miR-X、miR-Y、miR-Z

##### の導入による細胞増殖実験

miR-X、miR-Y、miR-Zの混合液 (miR-Mix.) を MCF-7 細胞と MDA-MB-453 細胞にトランスフェクション後、olaparib を加え、細胞増殖実験を行った。その結果、miR-Mix. をトランスフェクションした細胞では細胞増殖が抑制されることが分かった (図 1)。

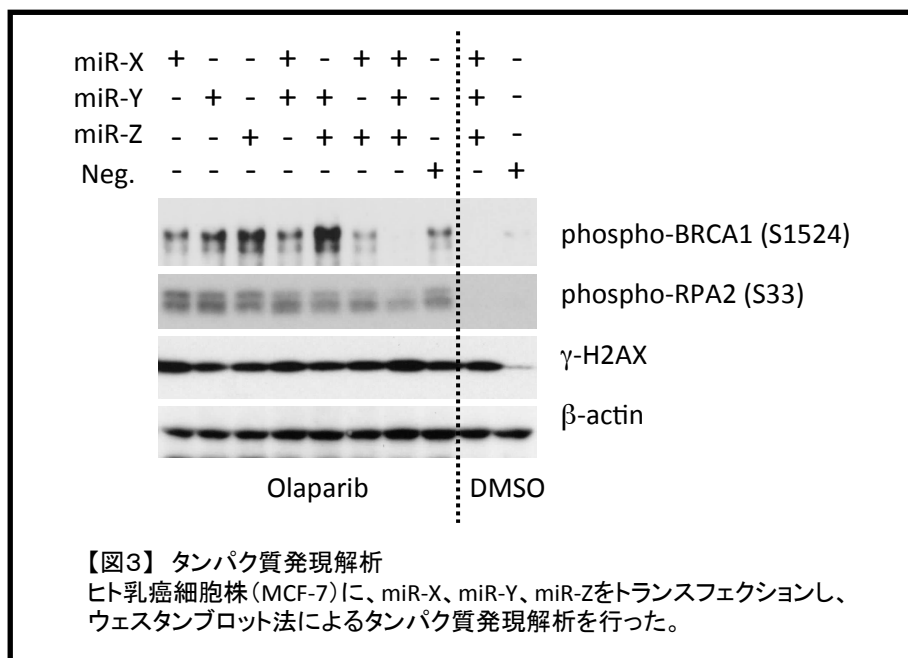
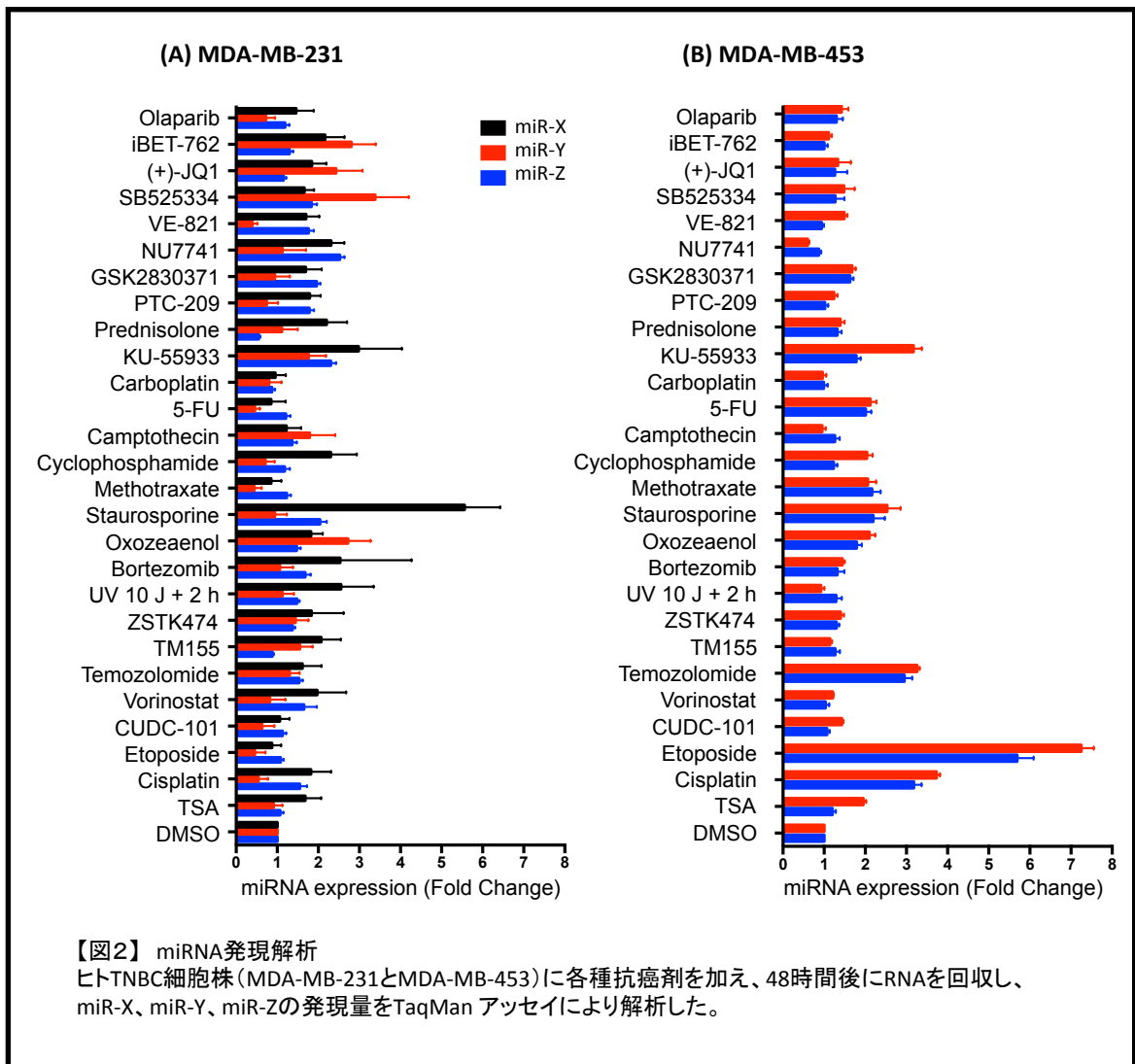


#### 2) miR-X、miR-Y、miR-Z の発現を誘導する薬剤のスクリーニング

MDA-MB-231 細胞と MDA-MB-453 細胞に各種抗癌剤を加え、48 時間後に RNA を回収し、定量 PCR による miRNA 発現解析を行った (図 2)。26 種類の薬剤を用い、miR-X、miR-Y、miR-Z の発現量を TaqMan アッセイを用いて調べた結果、MDA-MB-231 細胞では、miR-X、miR-Y、miR-Z の発現を誘導する薬剤は見つからなかった。MDA-MB-453 細胞では miR-X の発現量が非常に低く、発現量を解析することができなかった。

#### 3) miR-X、miR-Y、miR-Z の機能解析

MCF-7 細胞に miR-Mix. をトランスフェクションし、DNA 修復経路に関与するタンパク質の発現解析を行った (図 3)。MCF-7 細胞に olaparib を加えると、BRCA1 タンパク質がリン酸化されるとともに、DNA 損傷マーカーである $\gamma$ -H2AX の発現量が増加した。一方、MCF-7 細胞に miR-Mix. をトランスフェクションしてから olaparib を加えると、BRCA1 タンパク質のリン酸化が著しく抑制されることを明らかにした。以上の結果から、miR-X、miR-Y、miR-Z は DNA 修復経路を阻害し、細胞増殖を抑制する働きがあると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥井理予、Helen R. Russell、Peter J. McKinnon
2. 発表標題 microRNAを用いたPARP阻害剤併用療法の探索
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥井理予、Helen R. Russell、Peter J. McKinnon
2. 発表標題 PARP阻害剤感受性を亢進するmicroRNAの同定と機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥井理予、Helen R. Russell、Peter J. McKinnon
2. 発表標題 PARP阻害剤感受性を亢進するmicroRNAの同定
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------