

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16869

研究課題名(和文) 乳癌におけるDNA損傷応答機構を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting DNA damage response in breast cancer

研究代表者

茂地 智子(高居智子)(Shigechi, Tomoko)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：10818090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PARP阻害剤は、BRCA1/2遺伝子変異を有するがんの分子標的薬であるが、その耐性獲得の克服は重要な課題である。BRCA1は相同組み換え修復以外にも、DNA損傷チェックポイント機構のセンサータンパクのATRによりリン酸化され、細胞周期チェックポイント制御にも重要な役割を果たす。本研究では、BRCA1変異を有するPARP阻害剤耐性乳がん細胞株の樹立を試みた。また、BRCA1変異を有するde novoにPARP阻害剤耐性乳がん細胞株が、ATR阻害剤に感受性を示すという結果を得た。よって、ATRシグナル活性の阻害によりBRCA1変異陽性乳がんのPARP阻害剤耐性を克服できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦でもBRCA変異陽性乳がんに対するPARP阻害剤(olaparib)の適応拡大が承認され、この薬剤の有効性に期待が高まる一方で、近い将来に耐性の問題が実臨床での大きな障害となることが予想される。本研究は、BRCAを中心とする相同組み換え修復とDNA損傷チェックポイント機構を含むDNA損傷応答修復経路を標的とする乳がんの新規治療法の確立を目指しており、最終的には、BRCA遺伝子変異陽性乳がんのPARP阻害剤耐性克服に限らず、その他の相同組み換え修復遺伝子異常を有する乳がん治療法の開発への応用も可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：PARP inhibitors (PARPis) are a type of targeted therapy for BRCA1/2-deficient cancers, but their efficacy is limited by drug resistance. Therefore, overcoming this problem is paramount importance for improving treatment efficacy. BRCA1 is crucial for multiple biological processes, including homologous recombination repair. ATR directly phosphorylates BRCA1 in response to damaged DNA which is required for cell-cycle checkpoints. Here, we tried to establish of PARPi-resistant cell line from BRCA1-deficient breast cancer cell line to investigate the mechanisms of PARPi resistance. The BRCA1-deficient breast cancer cell line with pre-existing PARPi-resistant was sensitive to ATRi. Thus, it is suggested that ATR inhibition is a unique strategy to overcome the PARPi resistance of BRCA1-deficient cancers.

研究分野：乳癌

キーワード：PARP BRCA1変異陽性乳がん 相同組み換え修復 PARP阻害剤耐性 DNA損傷チェックポイント機構 RCA遺伝子変異 B

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳がんは本邦の女性において最も罹患率の高い癌種であり、罹患率及び死亡率は増加傾向にある。全乳がんの 5-10% を占める遺伝性乳がん卵巣がん症候群 (hereditary breast and ovarian cancer: HBOC) は、*BRCA1/2* 遺伝子の変異を原因とする常染色体優性遺伝性疾患で、乳がんの 70 歳までの累積罹患リスクは、*BRCA1* 変異で 57%、*BRCA2* 変異で 49% とされ [1]、HBOC 関連乳がんは、生物学的悪性度が散発性乳がんよりも高いことが知られている。

(2) 2005 年の Farmer らの報告 [2] 以降、*BRCA1/2* 遺伝子変異を持つがんの治療標的として、DNA 修復に關与する酵素のポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (poly ADP-ribose polymerase: PARP) が注目されてきた。損傷した DNA は、PARP によって塩基除去修復 (base excision repair: BER) されるが、細胞内の PARP の活性低下により、産生された SSB が S 期の複製フォークで二本鎖切断となり、これを基質とする *BRCA1/2* によって相同組み換え修復される。しかし、*BRCA1/2* が正常に機能しない細胞では HR による DNA 修復機構も働かないためゲノム不安定性が生じて、アポトーシスが誘導される [3]。このように、単独の機能不全では細胞死に至らないが双方の機構が同時に障害されることにより誘導される細胞死を合成致死 (synthetic lethality) と呼ぶ。

(3) 合成致死の作用機序を利用した PARP 阻害剤は、*BRCA1/2* 遺伝子変異を有するがんへの高い特異性をもつ毒性の少ない新規分子標的薬として、数々の臨床試験でその有効性が示され、本邦でも PARP 阻害剤の一つである olaparib の乳がんへの適応が承認された。その一方で、PARP 阻害剤の継続投与によって薬剤耐性が生じることも明らかになってきている。耐性獲得の機序として、*BRCA1/2* 遺伝子の reading frame の回復 [4]、*53BP1* 遺伝子、*RIF1* 遺伝子、*REV7* 遺伝子などの発現抑制による相同組み換え修復の回復 [5]、efflux pump の失活 [6] などが報告されている。しかし、これらの機序の解明を基盤とするような PARP 阻害剤耐性 *BRCA1/2* 変異陽性乳がんに対する治療法の有効性については、明らかになっていない。

(4) *BRCA1* は相同組み換え修復以外にも細胞生存の維持に多機能を有し、DNA 損傷チェックポイント機構のセンサータンパクである ATM (ataxia telangiectasia Mutated) や ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) のリン酸化にも重要な役割を果たして細胞周期を制御する [7]。2017 年に *BRCA1* 変異を有する PARP 阻害剤耐性卵巣がん細胞株において、ATR 阻害剤投与により、*BRCA1* とは独立した相同組み換え修復と複製フォークの安定性が減少することによって PARP 阻害剤への感受性が回復するといった報告がなされた [8]。よって、*BRCA1* 変異陽性乳がんにおいても、DNA 損傷チェックポイント機構を標的とすることが PARP 阻害剤耐性を克服する新たな治療戦略となる可能性が示唆されるものの、未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、*BRCA1* 変異陽性乳がんにおける PARP 阻害剤耐性獲得と DNA 損傷チェックポイント機構の関連性を明らかにし、DNA 損傷チェックポイント機構を標的とすることが PARP 阻害剤耐性を克服する新規治療戦略となり得るのかを検証して、新規治療としての最適化も目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

BRCA1 変異を有するトリプルネガティブ乳がん細胞株 2 種類のうち、MDA-MB-436 は DMEM、HCC1937 は RPMI 1640 の培地を用いた。*BRCA1* 野生型のトリプルネガティブ乳がん細胞株である MDA-MB-231 は DMEM の培地を用いた。細胞培養は全て 37℃、5%CO₂ の条件下で行った。

(2) *BRCA1* 変異を有する PARP 阻害剤耐性トリプルネガティブ乳がん細胞株の樹立

BRCA1 変異を有するトリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-436 を用い、PARP 阻害剤 (AZD2281) を段階的に増量することにより、PARP 阻害剤耐性株の樹立を試みた。培地交換を 4-7 日毎に行い、持続的に添加した DMEM 培地にて培養した。添加した PARP 阻害剤 (AZD2281) の濃度を順次増加させ、confluent になった状態で継代を行った。

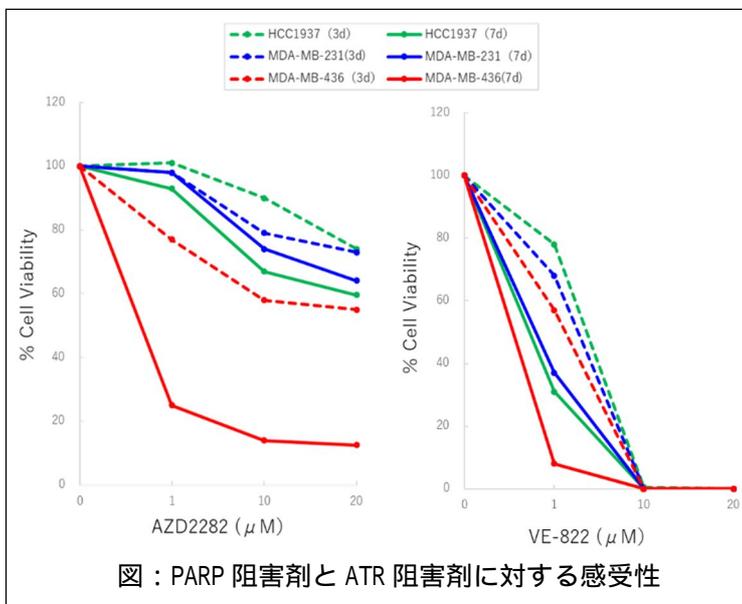
(3) 薬剤感受性試験

細胞株を PARP 阻害剤 (AZD2281) または ATR 阻害剤 (VE-822) を添加した培地で、3 日間または 7 日間暴露した。その後、CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay (Promega) を用いて生細胞数を計測した。

4. 研究成果

BRCA1変異を有するトリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-436 を用いて、PARP 阻害剤耐性乳がん細胞株の樹立を試みたが、未だに樹立に至っておらず現在も条件検討中である。

そこで、当初は予定していなかったが、BRCA1野生株 (MDA-MB-231) と2種類のBRCA1変異を有する株 (HCC1937、MDA-MB-436) の3種類のトリプルネガティブ乳がん細胞株を用いた実験を開始することにした。それぞれの細胞株の培地に PARP 阻害剤 (AZD2281) 及び ATR 阻害剤 (VE-822) を 0, 1, 10, 20 μM の濃度で投与し、3日間または7日間暴露した。その結果、



図：PARP 阻害剤と ATR 阻害剤に対する感受性

BRCA1変異を有する細胞株2種類を比較すると、MDA-MB-436はPARP阻害剤に対して感受性を示したが、HCC1937は耐性を示した。HCC1937については、*de novo*のPARP阻害剤耐性を示唆する報告がある[9]ため、それが再現されたといえる。

また、ATR阻害剤に対しては、MDA-MB-436の感受性が最も高かったことに加え、HCC1937も比較的高い感受性を示していた。このことから、治療に難渋するBRCA1変異を有するトリプルネガティブタイプの乳癌において、PARP阻害剤抵抗性のある場合でもATR阻害剤の効果が期待できる可能性が示唆された。今後、BRCA1変異を有する乳癌のPARP阻害剤抵抗性を克服する治療戦略として、DNA損傷チェックポイント機構の中核を担うATR活性化シグナルを治療標的とすることが有効である可能性が期待される。

< 引用文献 >

1. Chen S, Parmigiani G.: Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol. 2007; 25:1392-1333
2. Farmer H, et al.: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature 2005 ;434:917-921
3. Sonnenblick A, de Azambuja E, et al.: An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12(1):27-41
4. Edwards SL, Brough R, et al.: Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. Nature 2008;451: 1111-1115.
5. Cao L, Xu X, et al.: A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. Mol Cell 2009 ; 35 : 534-541.
6. Rottenberg S, Jaspers JE, et al.: High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. Proc Natl Acad Sci USA 2008 ; 105 : 17079-17084.
7. Gudmundsdottir K and Ashworth A: The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene 2006 25, 5864-5874
8. Yazinski SA, Comaills V, et al: ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. Genes Dev. 2017;31(3):318-332.
9. Johnson N, Johnson SF, et al: Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. Proc Natl Acad Sci. 2013;110:17041-17046.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------