

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300358

研究課題名(和文) DNA損傷修復経路における合成致死性を応用した乳癌の化学療法に関する研究

研究課題名(英文) Research on the breast cancer chemotherapy targeting synthetic lethality caused by the factors in the DNA damage repair pathways.

研究代表者

太田 智彦(OHTA, Tomohiko)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60233136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円、(間接経費) 5,070,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復経路における合成致死性を利用した治療に応用可能な基礎的な知見として、乳癌において相同組換え修復経路の遺伝子プロモーターのメチル化と化学療法感受性が関連すること、PLK1の過剰発現はBRCA1のユビキチンリガーゼ活性を阻害し、CPT11とPARP阻害剤に対する感受性を亢進させることを明らかにした。さらにBARD1がヘテロクオマチンプロテイン1(HP1)を介してDNA損傷依存的にLys9ジメチル化ヒストンH3(H3K9me2)に結合することを解明した。

研究成果の概要(英文)：In this project we studied the DNA damage repair pathways to employ the synthetic lethality caused by the factors in the pathway for breast cancer therapy. We found that promoter methylation of genes implicating in the homology-directed DNA repair are associated with chemosensitivity. We also discovered that overexpression of PLK1 causes cellular hypersensitivity to CPT-11 and PARP inhibitor through suppression of the E3 ubiquitin ligase activity of BRCA1, and that BARD1 interacts with Lys9-dimethylated Histone H3 through heterochromatin protein 1 (HP1) gamma in response to DNA damage.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：DNA修復 合成致死性 癌化学療法 乳癌 非癌遺伝子依存性

1. 研究開始当初の背景

= 国内外の研究動向と本研究の位置づけ = 遺伝子発現プロファイルによって分類された乳癌のサブタイプのうち、Luminal 型および HER2 型の予後は改善したが、全乳癌の約 15% を占める basal-like 型は依然として予後不良で治療の向上が急務である。一方、乳癌の約 7 割をしめる Luminal A 型はホルモン療法感受性で予後がよく、化学療法の奏率が低いにもかかわらず、一部に感受性群が存在するために、ほとんどの症例に化学療法が施行されている。予後良好な Luminal A 乳癌を化学療法から回避する意味でも化学療法感受性マーカーの同定が急がれる。

遺伝子発現プロファイル解析を含む臨床乳癌検体の解析や(Proc Natl Acad Sci U S A 100:8418-23, 2003, Oncogene 26:2126-32, 2007) *BRCA1* や *BARD1* を欠失させたマウスモデルの解析 (Proc Natl Acad Sci U S A 104:12111-6, 2007, Proc Natl Acad Sci U S A 105:7040-5, 2008) から basal-like 乳癌の主な原因が *BRCA1* 機能不全であることが明らかとなった。一方、*BRCA2* 変異による家族性乳癌の多くが Luminal A 型を発症することから (J Clin Oncol 20:2310-8, 2002) Luminal A の散発性乳癌の中に *BRCA2* の機能不全に起因するものが含まれると考えられる。Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤が *BRCA1/2* 変異のある家族性乳癌に著効を示すことから (N Engl J Med., 361:123-34, 2009) これらの散発性乳癌に対しても PARP 阻害剤や他の DNA 損傷性化学療法剤が奏功する可能性が注目されている。さらに、*BRCA1/2* に変異のある癌において抗癌剤に起因する 2 度目の変異による reading frame の回復が、これらの抗癌剤に対する耐性獲得のメカニズムとして報告され (Nature, 451:1116, 2008, Cancer Res., 68:2581, 2008)、DNA 修復機構と薬剤感受性の相関関係が明らかとなった。*BRCA1* と *BRCA2* の主な機能は DNA 相同組換え修復 (homologous recombination:HR) であり、おもしろいことに HR 経路に関わる多くの遺伝子の変異が家族性乳癌ないし乳癌の易罹患性を起因することから、*BRCA1/2* の機能不全以外に、この経路の他の 1 個あるいは複数の因子が原因で乳癌が生じていると考えられる。

PARP 阻害剤の作用機序として DNA 一本鎖損傷修復 (PARP による) と、DNA 二本鎖切断に対する HR (*BRCA* による) の、補完し合う 2 経路の機能不全による合成致死性が、副作用を最小限に抑え癌のみに優位に作用しうる点から注目されており (Nature, 434:913, 2005)、癌において損傷を補完する因子の機能不全が感受性のバイオマーカーとなることが予想される。しかし、DNA 損傷修復は多岐にわたり、薬剤の種類によってその経路が微妙に異なることから、散発性乳癌においてこのマーカーを同定することは容

易ではない。本研究はこの問題に取り組む。

2. 研究の目的

PARP 阻害剤が *BRCA1/2* 変異乳癌に著効を示すことから DNA 一本鎖損傷修復と DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復 HR の、補完し合う 2 経路ないし 2 因子の機能不全による合成致死性が注目されている。DNA 修復には複数の経路が存在し、理論的に合成致死を来す組み合わせが多数存在する。本研究では DNA 損傷性薬剤に対してそれを補完する因子の機能不全を同定するためのマーカーを解析する。大多数の Basal-like と少数の Luminal A 乳癌が DNA 修復不全を有すると予想される。Basal-like 乳癌のみならず Luminal A 乳癌においてこの群を同定することは他の非感受性乳癌を化学療法から回避する意味でも臨床的にきわめて重要である。また、従来奏率が低いと考えられていた低薬価の既存の薬剤に対する感受性群が同定できれば患者にとって有益なだけでなく、社会的な医療コストを下げる意味で重要である。

3. 研究の方法

本研究では各種 DNA 損傷性化学療法剤に対して合成致死性を生じ得る遺伝子機能不全のバイオマーカーを同定する為に以下の解析を行う。各種スクリーニング法にて候補因子あるいは候補となる翻訳後修飾を同定。同定した候補因子の欠損細胞における薬剤感受性を解析。これと平行して同定した因子の分子生物学的機能解析を行い、合成致死を起こしうる DNA 修復経路での機能について解析する。臨床検体における候補遺伝子の発現、エピジェネティクス解析、奏効率との相関を解析する。マウスモデルを用いて合成致死の組み合わせによる副作用と主作用の解析をする。

4. 研究成果

(1) DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復に必須な遺伝子のプロモーターメチル化について検討を行った。Epirubicin を含む術前化学療法を施行した原発性乳癌のうち、Luminal A 乳癌の病理学的完全奏功 (pCR) 症例、非奏功 (SD) 症例、および Triple negative (TN) 乳癌の pCR 症例および SD 症例、各 15 症例 (計 60 症例) の癌部分を microdissection にて採取し、HR に必須な 16 遺伝子、*BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *MDC1*, *RNF8*, *RNF168*, *UBC13*, *ABRA1*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51C*, *MRE11*, *NBS1*, *CtIP* および *ATM* 遺伝子プロモーターのメチル化を Bisulfite-pyrosequencing 法にて解析した。その結果、*BRCA1* と *RNF8* のメチル化は TN 乳癌に有意に高頻度に認められた。治療効果との

関係では TN 乳癌において BRCA1 のメチル化は pCR 症例に高頻度に認められる傾向にあった。一方、RNF8 と ATM のメチル化は非奏功例に有意に高頻度に認められた。以上より TN 乳癌において BRCA1 プロモーターのメチル化は化学療法高感受性のマーカーとなる可能性が示唆された。一方、Luminal A 乳癌にも相同組換え修復遺伝子のメチル化によって化学療法感受性が生じる症例が一部存在すると考えられる。

(2) BRCA1 のユビキチンリガーゼ (E3) 活性が欠損すると CPT11 および PARP 阻害剤による DNA 損傷時に Chk1 のリン酸化が起こらず、DNA 相同組換えが阻害される。そのメカニズムとして BRCA1 による Claspin のユビキチン化によって Claspin がクロマチンに誘導されることが必須であることがわかった。さらに PLK1 高発現癌細胞では BRCA1 のユビキチンリガーゼ活性が抑制されているために、CPT11 と PARP 阻害剤に対する感受性が亢進していることが判明した。PLK1 の一過性過剰発現は in vivo にて BRCA1 の自己ユビキチン化を阻害し、この阻害効果は PLK1 阻害剤で消失した。20 種類の細胞株の PLK1 発現をウェスタンブロットにて解析し、PLK1 高発現および低発現群に分け、CPT-11、PARP 阻害剤、マイトマイシン C およびシスプラチンに対する感受性を IC50 にて解析し、代表的な細胞を選び、ヌードマウスの皮下腫瘍を作成し、in vivo における感受性の解析を行ったところ、PLK1 高発現癌細胞においては CPT11 と PARP 阻害剤に対する感受性が亢進するが、マイトマイシン C に対する感受性には変化がいと、BRCA1 E3 活性欠損細胞と同様の表現型を示した。さらに EGFR が非相同末端連結に必要なことからこれを阻害するエルロチニブの作用を解析したところ、BRCA1 欠損細胞では感受性が亢進することが判明した。

(3) 平成 25 年度は DNA 二本鎖切断損傷 (DSB) 局所への BRCA1 の安定維持に必要な、BARD1 と Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) の結合を介した新規メカニズムを発見した。放射線照射した HeLa 細胞のクロマチンを Benzonase にて可溶化、BARD1 抗体にて免疫沈降し、これに結合するヒストン修飾のうち、DNA 損傷修復およびヘテロクロマチン形成に関連するものをウェスタンブロットにてスクリーニングしたところ、Lys9 ジメチル化ヒストン H3(H3K9me2)を同定した。この結合は H3K9me2 と結合するヘテロクロマチンプロテイン 1(HP1) を介しており、HP1 の発現を siRNA にて抑制すると BARD1 と H3K9me2 の結合は阻害された。蛍光蛋白質である Venus を N 末端と C 末端に 2 分割してそれぞれ BARD1 と HP1 に連結した蛋白質を細胞内に強制発現させたところ、レーザーマイクロ照射にて生じた DNA 二本鎖切断部位で Venus の蛍光を発し、この部位で BARD1 と HP1 が結合する

ことが証明された。また、大腸菌より BARD1 と HP1 のリコンビナント蛋白質を精製し、in vitro にて直接結合していることを GST-pull down 法と Biacore 解析にて確認した。さらに、結合部位のマッピングを行ったところ、BARD1 の BRCT ドメインに存在する PxVxL モチーフと HP1 の Chromoshadow ドメインの結合が明らかとなった。HP1 との結合を阻害する BARD1 のミスセンス変異体は DNA 損傷局所への集積が阻害された。このことより、BARD1 と HP1 の結合はがん治療において標的となり得ることが示唆された。

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 11 件)

Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. *Mol Cell*. 査読有, 53(4), 2014, 617-30, DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.030.

Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K, Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to Cells*. 査読有, 18(12), 2013, 1120-1130, DOI: 10.1111/gtc.12100

Hironaka S, Ueda S, Yasui H, Nishina T, Tsuda M, Tsumura T, Sugimoto N, Shimodaira H, Tokunaga S, Moriwaki T, Esaki T, Nagase M, Fujitani K, Yamaguchi K, Ura T, Hamamoto Y, Morita S, Okamoto I, Boku N, Hyodo I. Randomized, open-label, phase III study comparing irinotecan with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer without severe peritoneal metastasis after failure of prior combination chemotherapy using fluoropyrimidine plus platinum: WJOG 4007 trial. *J Clin Oncol*. 査読有, 31(35), 2013, 4438-44, DOI: 10.1200/JCO.2012.48.5805

Nakada S, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res*. 査読有, 72(19), 2012, 4974-83, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1057.

Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. A DNA-Damage

Selective Role for BRCA1 E3 Ligase in Claspin Ubiquitylation, CHK1 Activation, and DNA Repair. *Curr Biol.* 査読有, 22, 2012, 1659-66, DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.034.
佐藤 工、太田 智彦、乳癌治療におけるユビキチン修飾、医学のあゆみ、査読有、243(6)、2012、520-524。
福田 貴代、セドキーナ アンナ、太田 智彦、乳癌 基礎と臨床の最新研究動向「乳癌の分子生物学と発癌機序」
1. 分子生物学 (2) 癌遺伝子と癌抑制遺伝子、日本臨牀：増刊号「乳癌」、査読有、9、2012、66-70。
セドキーナ アンナ、福田 貴代、太田 智彦、BRCA1 と DNA 損傷応答、生化学、査読有、84(7)、2012、637-640。
太田 智彦、西川 裕之、DNA 相同組換え修復と乳癌、*Medical Science Digest*、査読有、38(1)、2012、637-40。
Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T. HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. *Cancer Res.* 査読有, 71(17), 2011, 5621-5, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0385.
Ohta T, Sato K, Wu W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Lett.* 査読有, 585(18), 2011, 2836-44, DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.005.

〔学会発表〕(計7件)

太田 智彦、「BRCA1-E3 inactivation leads to a failure of homologous recombination DNA repair in response to CPT-11 and PARPi」、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜
太田 智彦、「DNA 損傷応答と BRCA1 ユビキチンリガーゼ」、第86回日本生化学学会大会、2013年9月12日、パシフィコ横浜
太田 智彦、「Homology-directed DNA repair competence as a possible biomarker for breast cancer chemosensitivity」、第11回日本臨床腫瘍学学会集会、2013年8月29日、仙台国際センター
太田 智彦、「DNA 損傷応答における BRCA1、Claspin および HERC2 の相互作用」、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月21日、ウインクあいち(愛知県産業労働センター)
太田 智彦、「Agent-specific cellular chemosensitivity attributed to loss of BRCA1 E3 ligase activity」、15th International Congress on Hormonal

Steroids and Hormones & Cancer、2012年11月15日、石川県立音楽堂
太田 智彦、「DNA replication and checkpoint regulated by HERC2 and BRCA1 E3 ubiquitin ligases」、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、さっぽろ芸文館
太田 智彦、「トリプルネガティブ乳癌に対する治療戦略」、第19回日本乳癌学会学術集会、2011年9月4日、仙台国際センター東北大学百周年記念会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 智彦(OHTA, Tomohiko)
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：60233136

(2) 研究分担者

朴 成和(BOKU, Narikazu)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：50505948

津川 浩一郎(Tsugawa, Koichiro)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：60313657

中田 慎一郎(NAKADA, Shinichiro)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：70548528