

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10073

研究課題名(和文) BRCA1機能不全とエストロゲンの発癌への影響

研究課題名(英文) The effect of oestrogen with BRCA1 dysfunction on carcinogenesis

研究代表者

佐藤 工 (SATO, KO)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：30598462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1に変異と関連があるのは乳癌、卵巣癌であり、BRCA1の変異と発癌にはエストロゲンの関与が強く疑われる。本研究は分裂方向の規則性とエストロゲン、BRCA1との関連を明らかにするものである。BRCA1変異は予後不良のbasal-like乳癌と関連があり、この予後不良乳癌の治療、予防においても重要である。bioinformaticsを用い腺管構造に影響を与える因子の同定を目指しているが、未だ同定には至っていない。しかし本検討により、basal-like乳癌の予後良好因子や予後不良因子、及び効果的治療方法を確立し、論文発表、国際学会発表した。腺管構造の異常発症機序は引き続き検討していく。

研究成果の概要(英文)：Mutation in BRCA1 gene is more likely to develop breast and ovarian cancer. These organs are targets of oestrogen, suggesting that oestrogen can be a main player in carcinogenesis caused by BRCA1 mutation. From a view of morphology, initial step of carcinogenesis is dysregulation of polarity signaling in epithelial tubule structure. This study is to investigate the mechanism of dysregulation of polarity caused by BRCA1 mutation with oestrogen. This study may provide a better treatment option in basal-like breast cancer associated with BRCA1 dysfunction. Unfortunately, mechanism of dysregulation in polarity has not yet been identified, however we identified biomarkers liked to poor and good prognosis in the basal-like breast cancer. Furthermore, we identified a potential effective treatment to a subset of the poor prognostic basal-like breast cancer. The mechanism of polarity dysregulation has been still investigated.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 エストロゲン BRCA1 bioinformatics 管腔構造

1. 研究開始当初の背景

癌は上皮細胞の管腔構造内腔方向への増殖からはじまり、核異型を伴い管腔組織外への浸潤がおこると考えられている。このため上皮管腔組織の破綻が癌化の第一歩として認識され、近年多くの重要な研究報告がある (reviewed in Nat Rev Cancer 12, 23-38, 2012)。乳管組織を例にとると、管腔構造破綻がおこる病態は癌だけでなく、前癌病変として考えられている DCIS、また良性疾患の乳腺症や平坦型異型乳管内病変でも乳管内腔方向への上皮細胞の増殖が見られる (J Am Geriatr Soc 30:165-9, 1982, Cancer Res 69(2 Suppl), 2009, Breast Cancer Res. 5:263-268, 2003, Nat. Rev. Cancer 4: 814-819, 2004, Nat. Med. 15, 907-913, 2009, Cell Stem Cell, 7, 403-417, 2010, Int J Cancer, 118, 2281-4, 2006)。これらの報告から、エストロゲンは良悪性にかかわらず、乳管における管腔構造の破綻、および発癌 (特に BRCA1 ヘテロ接合で) に関連することが疑われる。

2. 研究の目的

本研究はエストロゲンが転写因子であることから RNA sequencing を用いた網羅的転写スクリーニングを行い、以下の状況での遺伝子発現の変化を観察する。

1. エストロゲンによる影響
2. BRCA1 ヘテロ接合による影響
3. BRCA1 ヘテロ接合におけるエストロゲンの影響

BRCA1 ヘテロ接合のキャリアもエストロゲン発現がない幼少期に発癌しないことから BRCA1 ヘテロ接合におけるエストロゲンの影響により発現変化をおこした遺伝子が発現に関わる可能性が高い。

本スクリーニングにより発癌に関与する候補遺伝子はその後 in vitro, in vivo で再現性を確認する。本行程にて確認された発癌関連遺伝子およびそれぞれの遺伝子が関わる経路が解明すると、効果的治療や癌の予防法の確立に重要と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 実験用モデル細胞の作成 (ヒトのエストロゲン受容体陽性正常細胞の樹立と BRCA1 ヘテロ接合の作成): ヒト乳管組織より成熟した Luminal 細胞、Luminal Progenitor 細胞、および Stem cell を分離し、その後それぞれの細胞で BRCA1 ヘテロ接合をつくる。乳癌の手術摘出検体の余剰部位は病理学的診断で正常組織であることを確認したのち本研究に用いる。手術摘出検体は異なる年齢の3検体を用いる。正常乳腺組織はコラゲナーゼ, DNaseI を用い単細胞分離する。分離された細胞は ALDEFLUOR を用い分化能をもつ細

胞 (progenitor, stem cell) と分化能を有さない成熟した細胞にセルソーターを用い分離する。理論上90%以上の精度で分離できるはずであるが、分離の精度は再度 ALDEFLUOR を用い FACS で確認し、必要であれば再度分離を行う。分離されたそれぞれの fraction は EasySep™ Human MUC1 Positive Selection Kit を用い、Luminal, Luminal Progenitor, Stem cell に分離する。これは磁気標識された抗体による分離であり、分離の後に表面抗原に対する抗体を用い FACS で分離の精度を確認する。分離の精度が低い場合は再分離を行う。分離された分化度の異なる細胞はすべて ROCK inhibitor を加えた EpiCultB medium で培養する。これら分離された細胞は TALEN、または CRISPR/cas を用い BRCA1 ヘテロ接合を作る。TALEN または CRISPR/cas は Electroporation で細胞内に誘導し、BRCA1 の特定の配列にニックを入れる。ニックは Non-Homologous End Joining による修復を経て BRCA1 ヘテロ接合が形成される。BRCA1 遺伝子の変異は Cel-1 アッセイでスクリーニングを行い、sequencing でヘテロ接合であることを確認する。一般的にヘテロ接合の作成はホモでのノックアウトに比べ比較的容易に作成することが可能である。しかし本研究で主に使用する細胞は Luminal progenitor であり、TALEN, CRISPR/cas の細胞内導入の効率は不明である。TALEN または CRISPR/cas による目的遺伝子の変異導入の効率は高いため、細胞内導入は高効率でなくても問題ないと思われる。また Electroporation を用いることで TALEN の細胞内導入は可能と考えられるが、TALEN, CRISPR/cas が全く導入できないことも起こりうる。BRCA1 ヘテロ接合は BRCA1 タンパクを野生型の60%くらい発現していることが報告されている。このため TALEN, CRISPR/cas を全く細胞内導入できない場合は、BRCA1 に対する shRNA をレンチウイルスで細胞内導入する方法を用いる。単細胞分離し BRCA1 タンパクが野生型の60%ほど発現している細胞を用いることも検討する。ここで作られた細胞は、BRCA1 遺伝子変異の有無にかかわらず、Luminal 及び Luminal progenitor はエストロゲン受容体陽性、Stem cell はエストロゲン受容体陰性であることを確認する。これらの細胞を用い後述するエストロゲンによる管腔構造への影響を検討する。Stem Cell は Negative control として用いる。

(2) スクリーニング: ヒトのエストロゲン受容体陽性正常細胞のエストロゲンへの応答、および BRCA1 ヘテロ接合のエストロゲンに対する応答。

エストロゲンの titration: Luminal Cell および Luminal Progenitor Cell は Matrigel を用いた三次元培養する。細胞は異なる濃度

のエストロゲン投与、または投与せずに観察する。Luminal Cell は Matrigel 内で管腔構造を形成することが報告されている（右図：Matrigel webpage より）。これを用い細胞増殖を促すエストロゲンの量、また管腔構造の破綻を惹起するエストロゲンの濃度と時期を確認する。また BRCA1^{+/+} と BRCA1^{+/-} で管腔構造の破綻がおこる時期や、破綻を惹起するエストロゲンの濃度に差がないか等も確認する。Matrigel を用いた管腔構造形成が確認できない場合、続く実験で用いられるエストロゲン投与量は論文で使用されている量を用い、また表現系の解析は下記に述べる方法（臨床検体を用いる方法）を代用する。

スクリーニング：エストロゲンによる影響は、エストロゲンが転写因子であるため RNA sequencing がスクリーニングとして好ましいと考える。RNA sequencing は Ingenuity Pathway Analysis (IPA: ソフトウェア) による経路分析を行いどの経路に関わる遺伝子の変化であるかも同時に確認する。スクリーニングは以下に示す三つの condition で行う。

A. エストロゲンによる変化（管腔構造破綻をきたすメカニズム）
Luminal Cell および Luminal Progenitor cell を で検討したエストロゲン投与量（増殖のみ促進する濃度と管腔構造破綻を来す濃度）に暴露し遺伝子発現変化を RNA sequencing を用い比較検討する。遺伝子発現量が変化したもののうち、増殖のみ促進するエストロゲン濃度では見られずに、管腔構造破綻をおこす濃度によって変化を来したものが候補遺伝子となる。

B. BRCA1 ヘテロ接合による変化
Luminal Progenitor での BRCA1^{+/+} と BRCA1^{+/-} での遺伝子発現の変化を観察する。

C. BRCA1 ヘテロ接合のエストロゲンによる変化（エストロゲンによる発癌のメカニズム）

Luminal Progenitor Cell (BRCA1^{+/+} および BRCA1^{+/-}) に で検討した量のエストロゲンを投与し RNA sequencing を用い遺伝子発現を比較検討する。BRCA1^{+/+} と BRCA1^{+/-} で変化を示す遺伝子が候補となる

(3) 表現系観察：候補遺伝子の機能解析：発現量変化により管腔構造破綻を惹起するか、核異型性を惹起するか、さらにそれらの阻害薬の効果判定。

再現性の確認：いくつかの目的候補遺伝子を抽出し、発現量低下したものは siRNA で、発現量が増加したものは細胞発現プラスミドを用いた過剰発現で遺伝子量変化を擬似的に再現し、Matrigel を用いた三次元培養で管腔構造破綻をおこすことを確認する。さらに実際に管腔構造破綻をきたす疾患（乳腺症や乳癌）で、候補遺伝子の発現量変化を免疫染色法を用いて確認する。

治療法、および予防法の確立： で確認した管腔構造破綻や発癌をきたす遺伝子が関

わる経路を IPA により同定する。本経路または遺伝子そのものの阻害薬が表現系に変化をもたらすか in vitro で確認する。Matrigel を用いた三次元培養で、阻害薬投与群と非投与群でのエストロゲンによる管腔構造破綻、または核異型の発現に及ぼす影響を観察する。

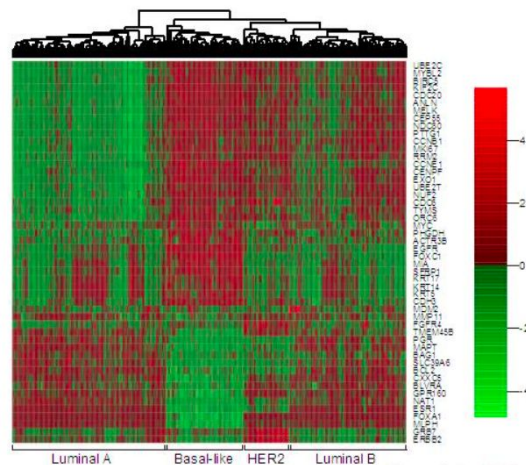
4. 研究成果

(1) 実験用モデル細胞の作成

乳癌の手術摘出検体の余剰部位は用いて行う本研究は、本学倫理委員会で研究の妥当性を検討され承認を得て研究開始となった。余剰検体は病理学的診断で正常組織であることを確認したのち本研究に用いた。手術摘出検体は異なる年齢の3検体を用いる。正常乳腺組織はコラゲナーゼ、DNaseI を用い単細胞分離した。ALDEFLUOR を用い分化能をもつ細胞 (progenitor, stem cell) と分化能を有さない成熟した細胞にセルソーターを用い分離する前に、ROCK inhibitor を加えた EpiCultB medium で培養し in vitro の培養条件でも oestrogen receptor が発現維持可能か検討した。いくつかの条件下で検討したがいずれも oestrogen receptor の発現維持が困難であった。このため予定を変更し bioinformatics を用いた検討へ計画を変更した。

(2) スクリーニング：ヒトのエストロゲン受容体陽性正常細胞のエストロゲンへの応答、および BRCA1 ヘテロ接合のエストロゲンに対する応答。

The Human Genome Atlas 乳癌データセットを用い BRCA1 変異を伴う患者の特異的遺伝子発現パターンを検討した。実際は BRCA1 変異のあり、なしで発現変動遺伝子を同定し、この発現遺伝子によりエストロゲンの下流遺伝子を抽出するという方法を行った。発現変動遺伝子は FDR<0.05 として定義した。しかしエストロゲン下流遺伝子として複数のデータセットで共通に見られる遺伝子はなかった。

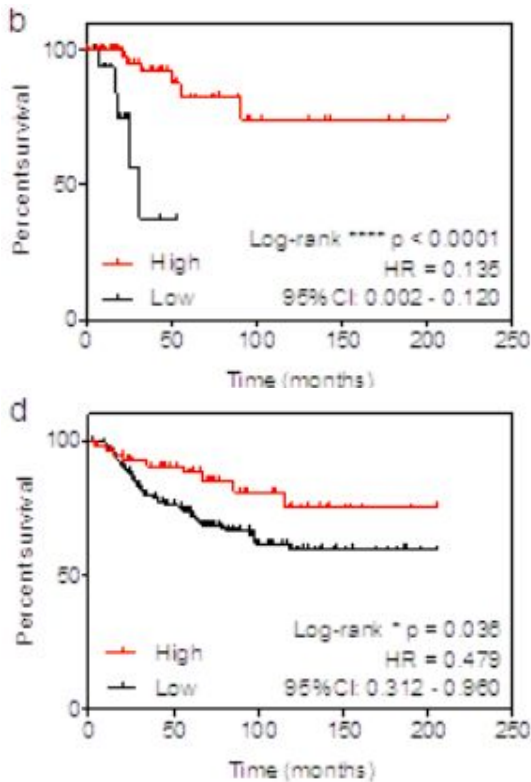


(図の解説；使用したデータベースの発現パ

ターンによる乳癌の分類)

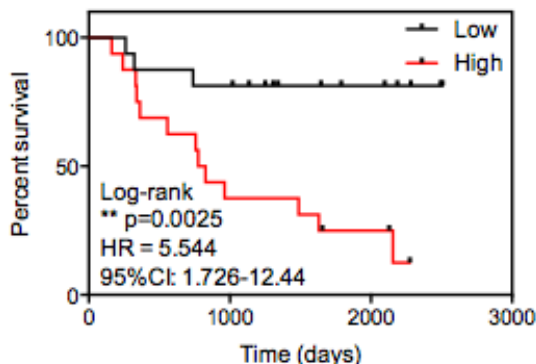
次に本研究は BRCA1 変異関連予後不良乳癌である basal-like 乳癌の治療方確立への貢献も目指すものであるため、basal-like 乳癌の予後関連因子を検討した。

予後不良の Basal-like 乳癌を規定する因子の一つである EX01 が予後良好因子であることを発見し論文発表した (International Journal of Innovative Research in Medical Science 2017;2:1031-1036)。



(図の解説 ; 二つのデータセットで EX01 過剰発現は予後量となる)

また basal-like 乳癌の予後不良乳癌の予後不良因子も同定し、さらにこの予後不良乳癌に対する効果的治療方法も確立し、現在検討中である。



(図の解説 : 乳癌検体で basal-like 乳癌の予後不良因子の発現の違い)

この結果は国際学会 (World Congress on Cancer Research & Therapy, Double Tree by Hilton San Diego Hotel Circle) で発表した。結果がまとまり次第論文発表する予定である。

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 3 件)

(1) Ayano Shinagawa, Kimino Minagawa, Hidekazu Yoshie, Tomoko Tsuruga, Keiko Oda, Hitoshi Yamamoto, Toshio Kumai, Juan A Bernal, Ko Sato, Anna S Sedukhina. EPO signaling as a predictive marker of disease severity in RSV infection. International Journal of Innovative Research in Medical Science 査読あり Vol. 2, 2017, 2455-8737 DOI10.23958/ijirms/vol02-i07/15

(2) Tomoko Tsuruga, Keiko Oda, Hidekazu Yoshie, Ayano Shinagawa, Kimino Minagawa, Toshio Kumai, Ko Sato*, and Anna S Sedukhina. A Subclassification of Basal-like Breast Cancer for Prognostic Prediction. International Journal of Innovative Research in Medical Science 査読あり Vol. 8, 2017, 1031-1036 DOI 10.23958/ijirms/vol02-i07/15

(3) Hidekazu Yoshie, Anna S Sedukhina, Kimino Minagawa, Keiko Oda, Shigeko Ohnuma, Nobuyuki Yanagisawa, Ichiro Maeda, Masayuki Takagi, Hiroya Kudo, Ryuto Nakazawa, Hideo Sasaki, Toshio Kumai, Tatsuya Chikaraishi, Ko Sato A bioinformatics-to-clinic sequential approach to analysis of prostate cancer biomarkers using TCGA datasets and clinical samples: A new method for precision oncology? Oncotarget 査読あり Vol. 8, 2017, 99601-99611 DOI 10.18632/oncotarget.20448

[学会発表](計 2 件)

(1) Sato K 2017

Two kills with one shot: A biomarker with therapeutic implications in poor prognosis gastric cancers.

AACR International Conference on New Frontiers in Cancer Research(国際学会)

(2) Sato K 2017

A bioinformatics-to-clinic sequential approach for precision oncology in triple negative breast cancer.

World Congress on Cancer Research & Therapy(招待講演)(国際学会)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 工 (SATO, KO)
聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：30598462

(2) 研究分担者

熊井 俊夫 (KUMAI, TOSHIO)
聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：40139671

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()