

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04693

研究課題名(和文) BRCA遺伝子機能を標的とした乳がん新規治療法の開発

研究課題名(英文) Study on new treatment of breast cancer targeting BRCA gene function

研究代表者

三木 義男 (MIKI, Yoshio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：10281594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 微小管脱重合阻害剤パクリタキセルが、微小管安定化を促進するため協働で微小管に直接結合する微小管関連タンパク質を同定した。また、BRCA2の枯渇後の細胞ベースおよびインビトロでのチューブリン重合アッセイにより、これらのタンパク質によって微小管安定化が誘導されたことを明らかにした。

(2) BRCA2の核内輸送タンパク質を同定した。DNA損傷修復は核内で行われることから、このタンパク質をノックダウンするとBRCA2の核移行が阻止され、BRCA2が核内で機能できず、PARP阻害薬による合成致死性が誘導されることを見出した。また、このタンパク質の核内局在を阻害する2種の化合物を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究の目的は、BRCAの染色体安定性維持に関わる分子の生理活性を明らかにすることで、目的の分子によって担われる情報伝達の流れが、乳がん発生機構の解明に繋がることが期待される。重要なことは、その結果、得られた情報を駆使して、合成致死理論に基づく新規分子標的の探索や治療法の開発を進める点で、さらに、その中でも特記すべき独創性は、遺伝性乳がん研究から創出された新規治療法を一般乳がんに応用・展開する点であり、基礎医学的興味に留まらず、臨床的な新規診断・治療法開発に強く波及し得るものと確信する。

研究成果の概要(英文)：(1) We identified a microtubule-related protein that directly binds to microtubules together with the microtubule depolymerization inhibitor, paclitaxel, in concert to promote microtubule stabilization. In addition, cell-based and in vitro tubulin polymerization assays revealed that these proteins induced microtubule stabilization.

(2) We identified the nuclear transport protein of BRCA2. Since DNA damage repair is performed in the nucleus, it was found that knockdown of this protein prevents BRCA2 from translocating to the nucleus, BRCA2 cannot function in the nucleus, and synthetic lethality is induced by PARP inhibitors. In addition, we detected two compounds that inhibit the nuclear localization of this protein.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん抑制遺伝子 BRCA1/2 合成致死療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

1994年、我々は遺伝性乳がん原因遺伝子 BRCA1 (Miki et al. Science 266: 66-71, 1994) を、1995年に Wooster らが BRCA2 を同定し、それらの機能解析から、乳がん発生には DNA 損傷修復機能破綻によるゲノム不安定性が強く関与していることが明らかになった。我々は BRCA2 タンパクの細胞内局在化シグナルの同定とその機能解析を通して、多種の BRCA2 機能を明らかにしてきた。細胞周期の間期には中心体に局在して、その複製 (Wang et al. Cancer Res 2011) やポジショニング (Niwa et al. Cancer Sci 2009) に関与する (中心体ダイナミクス制御)。また、分裂期には、BRCA2 が染色体に結合し、染色体の維持・分配に関与する (染色体分配制御) (投稿準備中)。細胞周期の最終段階 (細胞質分裂) では 2 個の娘細胞の切断に関与する (細胞質分裂制御) (Takaoka et al. Cancer Res 2014) 等を解明してきた。その結果、特記すべきは、BRCA1・2 のゲノム安定化機構は、DNA 損傷修復以外にも、中心体ダイナミクス制御、染色体分配制御、細胞質分裂制御など細胞周期の種々の時期や場所で機能する「染色体の管理者 (chromosome custodians)」であることが明らかになった。当該申請研究では、これらの情報を駆使し、新規分子標的の探索を目的として合成致死 (synthetic lethality) 理論に基づくスクリーニングを行う。BRCA1 又は BRCA2 の欠損細胞は 2 本鎖 DNA 切断修復が行えず、そこに 1 本鎖切断を修復する PARP 機能を阻害すると高度のゲノム不安定性が生じ死に至る。そこで BRCA1 又は BRCA2 変異陽性 (不活性型) 乳がんに対して、PARP 阻害剤による合成致死療法が提唱されている。しかし、BRCA は多機能でありミスセンス変異等が生じるドメインによっては、DNA 損傷修復とは異なる機能が失活する可能性があり、PARP 阻害剤だけでは対応できない。そこで、本研究では、BRCA の DNA 損傷修復機能に加え、中心体制御機能、染色体分配制御機能、細胞質分裂制御機能にも合成致死理論を当てはめ新規標的分子の探索を行い、PARP 阻害剤とは異なる作用機作の化合物やさらに有効性の高い化合物の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

BRCA1・BRCA2 の「染色体安定性維持」による乳がん抑制機能の解明と、その情報を応用し合成致死に基づく新規治療法開発を目的とする。これまで BRCA は DNA 損傷修復機能に焦点が当てられてきたが、我々は中心体ダイナミクス制御、染色体維持及び分配制御、細胞質分裂制御など細胞周期の種々の時期や場所で機能することを明らかにしてきた。そこで、機能解析をさらに進め、得られた情報から細胞周期全体に及ぶ BRCA の「染色体安定性維持機能」の系統的なネットワーク構築を目指す。加えて、これらの情報を駆使し、分子標的療法の有効性改善や新規分子標的の検出を目的として、合成致死 (synthetic lethality) 理論に基づく効率的なスクリーニングを行う。その結果、BRCA 変異陽性 (不活性型) 乳がんに対する新規分子標的の同定・治療法開発、さらに PARP 阻害剤併用療法や新規合成致死療法の BRCA 変異陰性 (一般) 乳がんへの展開を目指す。

## 3. 研究の方法

BRCA1・BRCA2 の「染色体安定性維持機能」のネットワークの解明を行う。具体的には細胞周期の各フェーズにおける BRCA タンパクの局在を詳細に再解析し、各局在部位で BRCA1/2 に結合する分子 (群) 及び BRCA1/2 と共同で働く分子の同定・機能解析を行う。加えて、得られた BRCA を中心とする「染色体安定性維持」の機能ネットワーク情報を基盤に、関連タンパクネットワークを開発、それらタンパクを標的に BRCA 変異陽性 (不活性型) 細胞において RNAi によるスクリーニングを進め、BRCA の合成致死誘導パートナーを探索する。さらに、BRCA の DNA 損傷・修復機能を阻害する分子又は化合物を探索し、野生型 BRCA (活性型) 細胞に対し、BRCA の阻害剤と PARP 阻害剤や他のパートナー阻害剤との併用による合成致死誘導を解析し、合成致死療法の BRCA 活性型 (一般) 乳がんへの展開を進める。

## 4. 研究成果

(1) BRCA2 欠損細胞に対する微小管脱重合阻害剤の合成致死誘導メカニズムの解明に対し、微小管脱重合阻害剤パクリタキセルが、微小管安定化を促進するため協働で微小管に直接結合する微小管関連タンパク質を同定した。また、BRCA2 の枯渇後の細胞ベースおよびインビトロでのチューブリン重合アッセイにより、この蛋白によって微小管安定化が誘導されたことを明らかにした。

(2) トリプルネガティブ乳がんには、BRCA1 変異が陽性で、プラチナ製剤及びポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) 阻害薬によく応答する症例が存在する。しかし、既に PARP 阻害薬治療における耐性獲得が報告され、HR 機能が維持されているがんに対し、HR 関連分子を阻害し HR 機能を低下させた後、PARP 阻害薬やプラチナ製剤等の DNA 傷害性抗がん剤により治療する新たな方法も研究されている。我々は、これまで BRCA2 の細胞内機能の解析を進めて、BRCA2 の核輸送蛋白を同定した。DNA 損傷修復は核内で行われることから、この蛋白をロックダウンすると BRCA2 の核移行が阻止され、BRCA2 が核内で機能できず、PARP 阻害薬による合成致死性が誘導されることを見出した。これは、BRCA2 の機能を抑制する「BRCAness」を作り出す新しい試みであり、新たながん治療を生み出す可能性が期待できる。この結果を踏まえ、この蛋白を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。機能既知化合物ライブラリー (本学の約 1,600 種低分子化合物ライブラリー) を用いたスクリーニングの結果、BRCA 機能正常細胞に対

しこの蛋白の核内局在を阻害する2種の化合物を検出した。次に、BRCA機能正常細胞に対するこれらの化合物とPARP阻害剤併用による合成致死誘導効果を解析し、*in vitro* 実験で誘導効果を示す結果を得ている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)『すべて査読有り』

1. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K, Miki Y, Hirata M, Matsuda K, Spurdle AB, Kubo M. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun.* 2018;9(1):4083. doi: 10.1038/s41467-018-06581-8.
2. Sunada S, Nakanishi A, Miki Y. Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(4):893-899. doi: 10.1111/cas.13530.
3. Osumi H, Shinozaki E, Mashima T, Wakatsuki T, Suenaga M, Ichimura T, Ogura M, Ota Y, Nakayama I, Takahari D, Chin K, Miki Y, Yamaguchi K. Phase II trial of biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy for pretreated KRAS exon 2 wild-type colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(8):2567-2575. doi: 10.1111/cas.13698.
4. Takaoka M, Miki Y. BRCA1 gene: function and deficiency. *Int J Clin Oncol.* 2018;23(1):36-44. doi: 10.1007/s10147-017-1182-2
5. Takaoka M, Ito S, Miki Y, Nakanishi A. FKBP51 regulates cell motility and invasion via RhoA signaling. *Cancer Sci.* 2017;108(3):380-389. doi: 10.1111/cas.13153.
6. Sato K, Koyasu M, Nomura S, Sato Y, Kita M, Ashihara Y, Adachi Y, Ohno S, Iwase T, Kitagawa D, Nakashima E, Yoshida R, Miki Y, Arai M. Mutation status of RAD51C, PALB2 and BRIP1 in 100 Japanese familial breast cancer cases without BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Sci.* 2017;108(11):2287-2294. doi: 10.1111/cas.13350.
7. Nguyen CT, Okamura T, Morita KI, Yamaguchi S, Harada H, Miki Y, Izumo T, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. LAMC2 is a predictive marker for the malignant progression of leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(3):223-231. doi: 10.1111/jop.12485.
8. Hosoya K, Matsusaka S, Kashiwada T, Suzuki K, Ureshino N, Sato A, Miki Y, Kitera K, Hirai M, Hatake K, Kimura S, Sueoka-Aragane N. Detection of KRAS Mutations in Plasma DNA Using a fully Automated Rapid Detection System in Colorectal Cancer Patients. *Pathol Oncol Res.* 2017;23(4):737-744. doi: 10.1007/s12253-016-0175-1.
9. Pal SK, Nguyen CT, Morita KI, Miki Y, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. THBS1 is induced by TGFβ1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(10):730-739. doi: 10.1111/jop.12430.
10. Osumi H, Shinozaki E, Suenaga M, Matsusaka S, Konishi T, Akiyoshi T, Fujimoto Y, Nagayama S, Fukunaga Y, Ueno M, Mise Y, Ishizawa T, Inoue Y, Takahashi Y, Saiura A, Uehara H, Mun M, Okumura S, Mizunuma N, Miki Y, Yamaguchi T. RAS mutation is a prognostic biomarker in colorectal cancer patients with metastasectomy. *Int J Cancer.* 2016;139(4):803-811. doi: 10.1002/ijc.30106.
11. Malik S, Saito H, Takaoka M, Miki Y, Nakanishi A. BRCA2 mediates centrosome cohesion via an interaction with cytoplasmic dynein. *Cell Cycle.* 2016;15(16):2145-2156. doi: 10.1080/15384101.2016.1195531
12. Khanom R, Nguyen CT, Kayamori K, Zhao X, Morita K, Miki Y, Katsube K, Yamaguchi A,

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 三木 義男, HBOC(遺伝性乳癌卵巣癌症候群) 遺伝子パネルによる乳がん発症危険度の遺伝学的検査 有効性, 口頭: 第 56 回日本癌治療学会学術集会, 2018.10.19, 国内.
2. 三木 義男, 中西 啓, 乳癌の治療戦略 DNA 損傷応答を標的とした新たな乳がん治療戦略, 口頭(シンポジウム): 第 26 回日本乳癌学会学術総会, 2018.05.17, 国内.
3. 三木 義男, DNA 損傷修復機構 がん抑制機能と新たながん治療への応用, 口頭(プレナリーセッション): 第 26 回日本乳癌学会学術総会, 2018.05.17, 国内.
4. 三木 義男; 遺伝性乳がん、卵巣がんの遺伝学的検査 現状と展望 . 第 23 回日本家族性腫瘍学会学術集会、札幌市、2017 年 8 月 4 日 - 5 日
5. 三木 義男; 乳癌の遺伝子発現・変異 BRCA1/2 遺伝子の機能不全と乳癌 . 第 25 回日本乳癌学会総会、福岡県福岡市、2017 年 7 月 13 日 - 15 日
6. 三木 義男; BRCA 遺伝子変異陽性卵巣がん と PARP 阻害薬 本邦における承認前の課題 BRCA 機能とそれらを標的とした新規がん治療法の開発 . 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、鳥取県米子市、2016 年 12 月 1 日 - 3 日
7. 三木 義男; 次世代シーケンサーによるがんゲノム研究の最前線 . 第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪市、2016 年 4 月 14 日 - 16 日(卒後教育セミナー)
8. 三木 義男; 合成致死性とがん治療: PARP 阻害剤から学ぶ DNA 損傷修復機能を標的とした新規がん治療戦略 . 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会、愛媛県(松山市)、2016 年 6 月 3 日 - 4 日
9. 三木 義男, 中西 啓; 日本の HBOC 診療の未来を展望する HBOC 発症の分子機構と新規治療戦略 . 第 24 回日本乳癌学会総会、東京都(江東区)、2016 年 6 月 16 日 - 18 日
10. 三木 義男; BRCA 遺伝子変異陽性卵巣がん と PARP 阻害薬 本邦における承認前の課題 BRCA 機能とそれらを標的とした新規がん治療法の開発 . 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、鳥取県米子市、2016 年 12 月 1 日 - 3 日

〔図書〕(計 8 件)

1. 三木 義男:【動き始めたがんゲノム医療 深化と普及のための基礎研究課題】(第 2 章)actionable パスウェイ PARP 阻害剤 がん治療における新しい合成致死アプローチ、実験医学 36 巻 15 号 Page2543-2552(2018.09)
2. 甲畑 宏子、三木 義男:【根拠がわかる治療とケアのベストプラクティス】(第 11 章 総論:がんのエビデンス)がん遺伝、がん看護 24 巻 2 号(2019 増刊 Page115-120(2019.02))
3. 三木 義男:【遺伝性がんはここまで解明された】 遺伝性腫瘍 最近の知見と遺伝形式 . 成人病と生活習慣病 47 巻 8 号, 813-819, (2017.07)
4. 三木 義男:【乳癌のすべて】 診断・治療の進歩 BRCA 遺伝子の基礎と合成致死療法の開発に向けて . 医学のあゆみ 261 巻 5 号, 423-428, (2017.04)
5. 三木 義男:【HBOC 症候群の診断と治療の現況】 HBOC 症候群の分子診断と治療 . 癌と化学療法 44 巻 2 号, 102-106, (2017.02)
6. 三木 義男; Basic Science と外科 次世代シーケンサーによるがんゲノム研究の最前線 . 日本外科学会雑誌 117 巻 6 号, 616-618, (2016.11)
7. 三木 義男; 編集: 最新遺伝性腫瘍・家族性腫瘍研究と遺伝カウンセリング(遺伝子医学

MOOK 別冊：最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング シリーズ 1 メディカルドゥ，  
(2016.09)

8. 三木 義男；Basic Science と外科 次世代シーケンサーによるがんゲノム研究の最前線．  
日本外科学会雑誌 117 巻 6 号，616-618，(2016.11)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子遺伝分野  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/mgen/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：中西 啓

ローマ字氏名：Nakanishi Akira

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：難治疾患研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50321790

研究分担者氏名：高岡 美帆

ローマ字氏名：Takaoka Miho

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：難治疾患研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：90770701

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。