

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10050

研究課題名(和文) 遺伝性乳癌のスプライシング改変による新たな治療法をめざす

研究課題名(英文) Seeking a novel therapy for hereditary breast cancer by modulating alternative splicing

研究代表者

大江 賢治 (Ohe, Kenji)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：30419527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性乳癌のBRCA1遺伝子5382insC変異は、1塩基挿入により、フレームシフトを起こす。この変異を内在性にもつHCC/1937細胞を用いて、TG003や、同じCLK阻害活性をもつCX-4945を添加しエキソンスキップによる読み枠の修正を検討したが、BRCA1エキソン20のスキッピングを認めず、アンチセンスオリゴ、modified U1 snRNAやmodified U7 snRNAも試みたが、効果はなかった。ウエスタンブロットを行なうと、TG003は、修正BRCA1蛋白質を増加させ細胞増殖を抑制した。TG003によりエキソン20以外のエキソンがスキップされた可能性があり検討中である。

研究成果の概要(英文)：Hereditary breast cancer caused by the BRCA1 mutation 5382insC is due to a one base pair insertion in exon 20 and results in a frame shift. In order to correct this, we tried various ways to skip exon 20, eventually which corrects the frameshift. We tried small splice modifying compounds, antisense RNA, modified U1 snRNA, and modified U7 snRNA, but all ended up in a failure. However, when we evaluated BRCA1 protein (C term Ab) by Western blot, we found TG003 increased the corrected in-frame BRCA1 protein accompanying decreased cell viability of HCC1937 cells which harbor the BRCA1 5382insC mutation endogenously. Exon skipping may have been induced in other exons besides exon 20 by TG003, which we are still pursuing.

研究分野：スプライシング

キーワード：スプライシング

1. 研究開始当初の背景

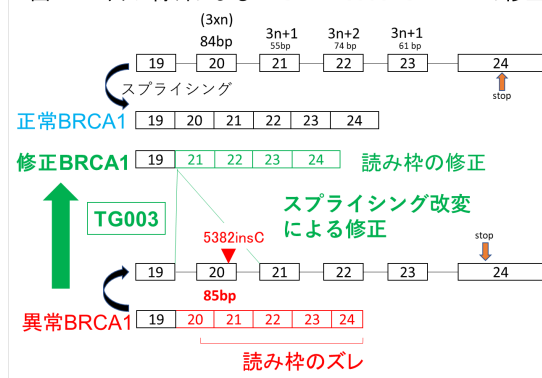
遺伝性乳癌の遺伝子変異という単一のイベントに着目し、遺伝子変異による異常スプライシングを改変することにより乳癌を予防することを目的とした研究である。

2. 研究の目的

癌抑制遺伝子である *BRCA1* (*breast cancer susceptibility gene-1*) の遺伝子変異である *BRCA1* 5382insC は、ロシアやポーランドにおいて遺伝性乳癌・卵巣癌の半以上に認められる報告があり、遺伝子乳癌のもっとも多い変異の一つである。この遺伝子変異により *BRCA1* エキソン 20 に 1 塩基挿入が生じ、フレームシフトにより下流のエキソン 24 に停止コドンが生じ、*BRCA1* 蛋白の発現が減少する。この遺伝子変異の影響を回避するために下記の 2 つの方法をとった。

低分子化合物による変異エキソンのエキソン除外を誘導する方法 (図 1)。
BRCA1 5382insC の変異が存在するエキソン 20 は、長さが 84 塩基対で 3 の倍数であるため、低分子化合物によりエキソン 20 の除外を誘導できれば、エキソン 21 から下流の読み枠が、もとの *BRCA1* 全長蛋白と同じになり、癌抑制遺伝子産物としての機能が認められれば、新規治療法としての可能性がある (図 1)。

図1 エキソン除外による*BRCA1* ins5382C mRNAの修正



3. 研究の方法

BRCA1 5382insC 変異を内在性にもつ HCC/1937 乳癌細胞を用いた。

(1) *BRCA1* exon 20 のエキソン除外誘導

TG003

TG003 は、スプライシングに重要なリン酸化酵素である *CLK1* の阻害薬で、*BRCA1* exon 20 除外を試みた。

CX-4945

CX-4945 は、casein kinase 2 の阻害薬であるが、*CLK1* 阻害活性が最近報告され、TG003 よりも強いこと、casein kinase 2 阻害薬として臨床研究もはじまっており、ヒトへの投与も可能ということで、*BRCA1* exon 20 除外を試みた。

その他、

アンチセンスオリゴ、modified U1 snRNA や modified U7 snRNA も試みた。

(2) TG003 による *BRCA1* 蛋白質の発現誘導、細胞増殖に対する影響

ウエスタン解析、RT-PCR 解析

HCC1937 細胞において TG003 を添加し、Trizol (Ambion)を用いて、蛋白質および total RNA を抽出し、それぞれ、ウエスタン解析 (anti-*BRCA1*: ab191042)および RT-PCR 解析に用いた。

細胞増殖アッセイ

MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide](BioAssay Systems)を用いて記載されたプロトコルに従って OD₅₇₀ を測定した。

4. 研究成果

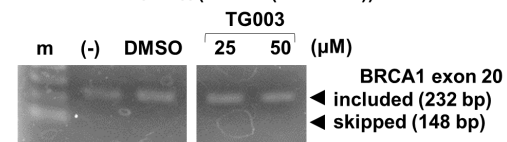
(1) *BRCA1* exon 20 のエキソン除外

HCC1937 細胞において、*BRCA1* exon 20 のエキソン除外を誘導することができなかった。以下、詳細を示す。

TG003

<実験 1>H*BRCA1* 5382insC 変異を内在性にもつ HCC/1937 細胞にコントロール(DMSO)および TG003 を添加し、*BRCA1* exon 20 のエキソン除外に対する影響を調べたが効果を認めなかった (図 2)。

図2 TG003は、*BRCA1* exon 20除外に効果を示さなかった HCC/1937細胞株(*BRCA1*(5382insC))



CX-4945

CX-4945 も TG003 同様、HCC/1937 細胞に対し、*BRCA1* exon 20 のエキソン除外を誘導しなかった。

アンチセンスオリゴ、

modified U1 snRNA、modified U7 snRNA

<アンチセンスオリゴ>

BRCA1 exon 20 の 5' スプライス部位の配列 (5'-AAGguaaag-3') に対し、下記の修飾オリゴを作製した。

(5'-C*T*T*T*ACCTTTCTGTC*C*T***G***G*G-3)

*は、2'-O-メチル基で、位置は家族性高コレステロール血症の mipomersen と同じ。

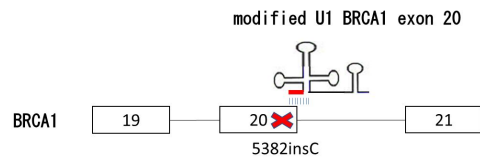
下線部は、*BRCA1* exon 20 の 5' スプライス部位のアンチセンス配列、残りの部分も exon 20 5' スプライス部位上流の配列と相補的である。赤太字は、5382insC 変異。このアンチセンスオリゴを HCC/1937 細胞に添加したが、効果を認めなかった (図 3)

図3 アンチセンスオリゴは、BRCA1 exon 20除外に効果を示さなかった
HCC/1937細胞株 (BRCA1(5382insC))



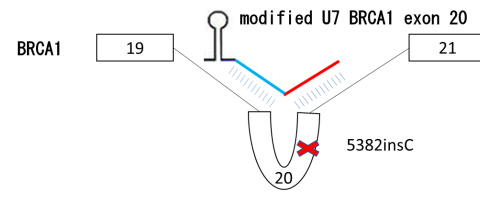
<BRCA1 exon 20 の 5'スプライス部位を標的にした modified U1 snRNA BRCA1 >
効果認めず。

図4 modified U1 は、BRCA1 exon 20除外に効果を示さなかった



<BRCA1 exon 20 前後のイントロンを標的にした modified U7 snRNA BRCA1 >
効果認めず。

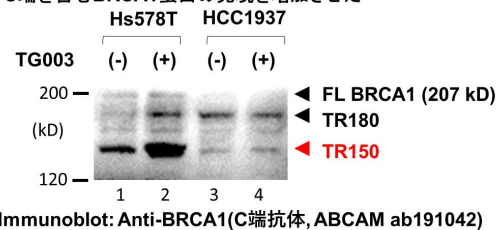
図5 modified U7 は、BRCA1 exon 20除外に効果を示さなかった



(2) TG003 による BRCA1 蛋白の発現誘導の可能性と細胞増殖抑制

TG003 は、修正された BRCA1 蛋白質の発現を誘導している可能性がある (図 6)。5382insC 変異のため、HCC1937 細胞では、BRCA1 蛋白質 (C 端) 抗体では、全長 BRCA1 蛋白質を検出することができなかった (lane 3,4, FL BRCA1)。Hs578T 細胞では、既報通り、発現は低いが、全長 BRCA1 蛋白質を認めた (lane 1,2, FL BRCA1)。TG003 添加時に BRCA1 C 端抗体で認識される短いアイソフォームの発現増強を認めた (Hs578T: TR180 と TR150, HCC1937: TR150)。

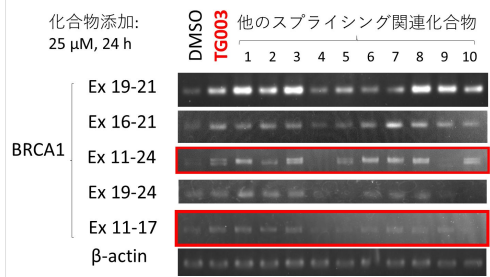
図6 TG003は、Hs578T細胞やHCC1937細胞において C端を含むBRCA1蛋白の発現を増加させた



さらに、このアイソフォームを mRNA レベルで検出するために RT-PCR 解析を試みた (図 7)。TG003 や他のスプライシング関連化合物 1-10 のうち、3,5,10 は、BRCA1 エキソン 11-24 の RT-PCR で、バンドが二つ検出された。また、エキソン 11-17 においてもバンドが二つ認められたことより、エキソン除外が示唆された (図 7: 赤枠)。しかし、長

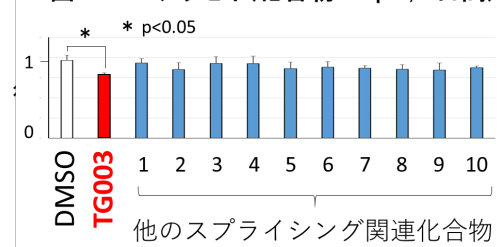
さの差は、100bp 前後であった。TR150 は、全長と 50Kd の差があり、1.6kb のエキソン除外が必要である。エキソン 11 の除外が報告されているが、分子量は 100 kD 前後である。エキソン 11 は、3.4kb であり、現在、エキソン 11 内のスプライス部位が使われた検討中である。

図7 スプライシング関連化合物によるアイソフォーム誘導の可能性



TG003 は、HCC1937 細胞の増殖を阻害する。TG003 を含めたスプライシング関連化合物の HCC1937 細胞への影響を調べるため、添加 3 日後に MTT アッセイを行なった。TG003 は、他のスプライシング関連化合物に比べ、細胞増殖を有意に阻害した。

図8 MTTアッセイ (化合物 25 μM, 3日間)



<今後>

TG003 の BRCA1 におけるエキソン除外を特定し、HCC1937 細胞だけでなく、Hs578T などの乳癌細胞において、このエキソン除外による細胞増殖抑制の機序を明らかにし、論文化したいと考えている。

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. Kenji Ohe, Shinsuke Miyajima, Ichiro Abe, Tomoko Tanaka, Yuriko Hamaguchi, Yoshihiro Harada, Yuta Horita, Yuki Beppu, Fumiaki Ito, Takafumi Yamasaki, Hiroki Terai, Masayoshi Mori, Yusuke Murata, Makito Tanabe, Kenji Ashida, Kunihisa Kobayashi, Munechika Enjoji, Toshihiko Yanase, Nobuhiro Harada, Toshiaki Utsumi, Akila Mayeda (2018) HMGA1a induces alternative splicing of estrogen receptor alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and*

molecular biology (available on line)
https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.007

2 . Kenji Ohe, Mayumi Yoshida, Akiko Nakano-Kobayashi, Motoyasu Hosokawa, Yukiya Sako, Maki Sakuma, Yukiko Okuno, Tomomi Usui, Kensuke Ninomiya, Takayuki Nojima, Naoyuki Kataoka, Masatoshi Hagiwara (2017). RBM24 promotes U1 snRNP recognition of the mutated 5' splice site in the *IKBKAP* gene of familial dysautonomia. *RNA*, 23, 1393-1403.

3 . Yukiya Sako, Kensuke Ninomiya, Yukiko Okuno, Masayasu Toyomoto, Atsushi Nishida, Yuka Koike, Kenji Ohe, Isao Kii, Suguru Yoshida, Naohiro Hashimoto, Takamitsu Hosoya, Masafumi Matsuo, Masatoshi Hagiwara (2017). Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*, 7, 46126.

〔学会発表〕(計3件)

1 . 大江賢治¹、宮島慎介⁵、田中智子²、森征慶¹、村田雄介¹、遠城寺宗近¹、柳瀬敏彦²、原田信広⁴、前田明³、内海俊明⁵。福岡大学 薬学部¹・内分泌糖尿病内科²、藤田保健衛生大学 総合医科学研究所遺伝子発現機構学³・医学部生化学⁴・乳腺外科⁵ HMGA1a「おとり」RNA のタモキシフェン耐性に対する影響。
ポスター P1-20-6
第 91 回 日本内分泌学会学術総会 4.26-28 2018 宮崎

2 . 大江賢治
福岡大学薬学部・臨床薬物治療学
生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (第40回日本分子生物学会、第90回日本生化学会大会)ワークショップ:1PW02 RNA制御が支える真核生物の複雑な形質発現機構
U1 snRNP と疾患における異常スプライシング(口頭発表) 12.6-9 2017 神戸

3 . 大江賢治¹、内海俊明²、前田明³、遠城寺宗近¹。¹福岡大学薬学部・臨床薬物治療学、²藤田保健衛生大学病院・乳腺外科、³藤田保健衛生大学病院総合医科学研究所・遺伝子発現機構学。HMGA1a に対する「おとり」RNA は、エストロゲン受容体の選択的スプライシングを制御する。
第2回 日本核酸医薬学会(ポスター発表) 東京理科大学葛飾キャンパス、11.15-17 2016

〔図書〕(計1件)

1 . 大江賢治、萩原正敏。家族性自律神経失調症の治療薬候補。医学のあゆみ 257(4) (2016 4/23) p.318-319 医歯薬出版株式会社

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

出願人:柳瀬敏彦、大江賢治、田中智子

出願日:平成30年(2018年)3月5日

出願No.:特願2018-038982

名称:N R 5 A 1 発現抑制剤および医薬組成物

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大江賢治(Ohe, Kenji)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号:30419527

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし