

平成30年6月9日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10075

研究課題名(和文) PARP阻害剤感受性を亢進するmicroRNAの同定と新規併用療法の開発

研究課題名(英文) PARP inhibitor microRNA

研究代表者

奥井 理予 (OKUI, Michiyo)

桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師

研究者番号：20327654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1) は、一本鎖DNAの修復に重要な役割を果たす酵素である。BRCA1/2は二本鎖DNAの相同組換え修復に必須であり、BRCA1/2遺伝子に変異を有する細胞は、PARP阻害剤 (olaparib) に対して高感受性を示す。しかし、olaparibの薬剤耐性機構については不明な点も多い。

本研究課題では、マウス髄芽腫細胞を用い、olaparib感受性に関与するmicroRNAとしてmiR-X、miR-Y、miR-Zを同定した。また、miR-X、miR-Y、miR-Zの発現を亢進する薬剤としてトリコスタチンAを同定した。

研究成果の概要(英文)： Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) effectively kill homologous recombination deficient tumor cells through the concept of synthetic lethality. However, PARPi resistance frequently occurs, and therefore additional strategies that synergize with PARPi to enhance anti-tumor activity are necessary. To develop approaches for enhancing the effectiveness of PARPi, we demonstrated a microRNA array analysis to identify targets affected by treating medulloblastoma (MB) cells with the PARPi olaparib. We found that the expression level of miR-X, miR-Y, and miR-Z were selectively down-regulated in Brca2-deficient MB cells after olaparib treatment. These results suggest that miR-X, miR-Y, and miR-Z upregulation may improve the chemotherapeutic efficacy of olaparib in BRCA-proficient cancer.

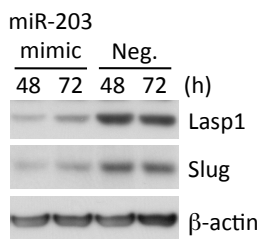
研究分野：分子生物学

キーワード：PARP阻害剤 microRNA

1. 研究開始当初の背景

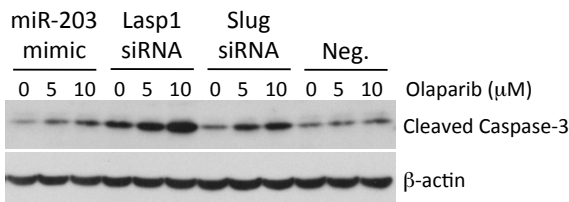
BRCA1/2 は、相同組換えによる二本鎖 DNA の修復に重要な役割を果たしており、BRCA1/2 遺伝子に変異が生じると、乳癌や卵巣癌を発症しやすくなる。PARP 阻害剤 (olaparib) は、一本鎖 DNA を修復する PARP の機能を阻害する。BRCA1/2 遺伝子が正常な細胞では、PARP 阻害剤を加えても相同組換えによって DNA が修復され、細胞は生き延びることができる。一方、BRCA1/2 遺伝子が機能しない細胞に PARP 阻害剤を加えると、DNA 修復ができず、アポトーシスが誘導される (合成致死)。このような合成致死を利用した治療法は、従来の抗がん剤と比較して奏効性が高く、副作用が少ない。

Brca1 遺伝子と *Brca2* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスは、いずれも胎生致死であるため、解析が難しい。そこで申請者らの研究グループは、*Brca2* 遺伝子の発現を脳特異的に抑制したマウス (*Brca2^{Nes-cre}; p53^{-/-}*) を作製し、この *Brca2* コンディショナル KO マウスが高頻度に髄芽腫を発症することを報告した (Frapaart et al. 2007 EMBO J, Kimura H et al, 2005 Oncogene)。また、申請者は、*Brca2* 欠損マウス (*Brca2^{Nes-cre}; p53^{-/-}*) や *Ptch1* 欠損マウス (*Ptch1^{+/-}; p53^{-/-}*) の髄芽腫から独自に細胞株を樹立し、TaqMan microRNA Array による発現解析を行った。その結果、olaparib を加えた *Brca2* 欠損髄芽腫細胞では、miR-203 の発現量が特異的に増加していることを見出した。miR-203 は、食道癌、白血病、メラノーマなどで癌幹細胞の増殖や分化に関与することが報告されている。そこで、*Brca2* 欠損髄芽腫細胞に miR-203 を過剰発現させ、miR-203 のターゲットとして *Slug* と *Lasp1* の発現量が減少することを確認した (図1)。



【図1】 *Brca2*欠損髄芽腫細胞にmiR-203を過剰発現後、ウェスタンブロットによる解析を行った。

次に、*Ptch1* 欠損マウスから樹立した髄芽腫細胞に miR-203、Lasp siRNA、Slug siRNA をトランスフェクションした後、olaparib 感受性試験を行った。*Ptch1* 欠損髄芽腫細胞は *Brca2* 遺伝子が正常であるため、olaparib 単独ではアポトーシスを起こさないが、miR-203、Lasp siRNA、Slug siRNA を過剰発現させた後に olaparib を加えると、アポトーシスが誘導されることを見出した (図2)。



【図2】 *Brca2*遺伝子が正常な*Ptch1*欠損マウス髄芽腫細胞にmiR-203 mimic、Lasp1 siRNA、Slug siRNAを導入後、olaparib感受性を調べた。

2. 研究の目的

BRCA1/2 遺伝子に変異を有する患者では、乳癌や卵巣癌の発症率が高い。また、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) や遺伝性乳癌卵巣癌 (HBOC) では明らかなターゲットが存在しないため、治療が難しい。合成致死を利用した olaparib による治療は、従来の抗がん剤に比べて副作用が少なく、TNBC や HBOC に対して有効であることが報告され、臨床試験による評価が期待されている。しかし、olaparib を用いた併用療法については様々な組合せが考えられ、未だ確立されていない。本研究では、ヒト乳癌細胞株を用いて同様の解析を行い、TNBC や HBOC に対して有効な olaparib 併用療法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 申請者がすでに行ったマウス髄芽腫細胞における TaqMan microRNA Array による発現解析の結果から、olaparib 感受性を亢進する microRNA をリストアップした。

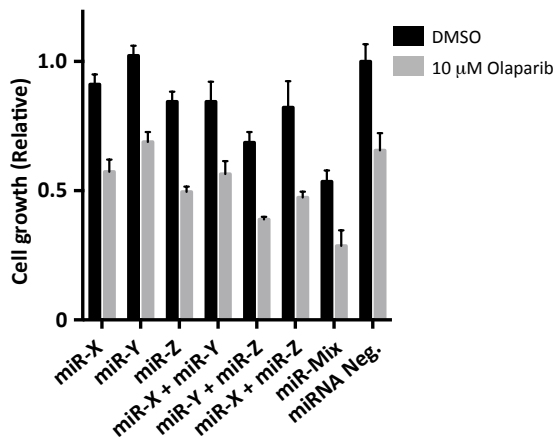
(2) 上記 3-(1) でリストアップした microRNA をヒト乳癌細胞株にトランスフェクション後、olaparib を加え、細胞増殖が抑制されることを確認した。

(3) ヒト乳癌細胞株 (MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453) を用い、シスプラチンなどの各種抗がん剤を加えた後、TaqMan assay により上記 3-(1) でリストアップした microRNA の発現を誘導する薬剤のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) マウス髄芽腫細胞株における microRNA 発現解析の結果から、olaparib 感受性を亢進する microRNA として、miR-X、miR-Y、miR-Z を同定した。

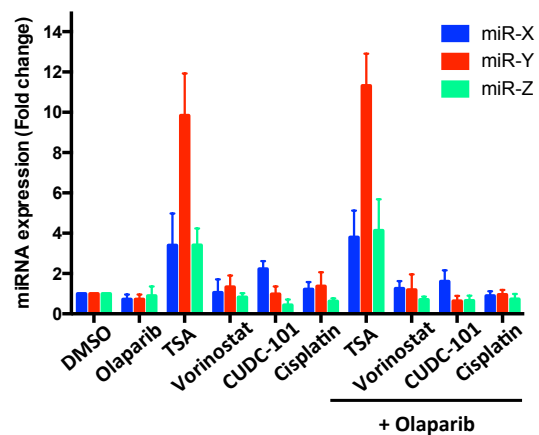
(2) 上記 4-(1) で同定した 3 種類の miRNA (miR-X、miR-Y、miR-Z) をヒト乳癌細胞 MCF-7 にトランスフェクション後、olaparib を加え、細胞増殖実験を行った。その結果、3 種類の miRNA (miR-X、miR-Y、miR-Z) を混ぜてトランスフェクションした細胞 (miR-Mix) では、olaparib 感受性が亢進することが分かった (図 3)。



【図3】 MCF-7細胞における細胞増殖実験

(3) olaparib 感受性を亢進する miRNA として同定した miR-X、miR-Y、miR-Z の塩基配列は、いずれもヒトとマウスで 100 %一致していた。そこで、マウス髄芽腫細胞を用い、miR-X、miR-Y、miR-Z の発現を誘導する薬剤のスクリーニングを行った。その結果、マウス髄芽腫細胞にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を加えると、miR-X、miR-Y、miR-Z の発現量が増加することが分かった (図 4)。TSA 以外の HDAC 阻害剤 (vorinostat、CUDC-101) では、miR-X、miR-Y、

miR-Z の顕著な発現増加は見られなかった。次に、ヒト乳癌細胞株 (MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453) を用いて同様の実験を行い、miR-X、miR-Y、miR-Z の発現を誘導する薬剤のスクリーニングを行った。シスプラチン、エトポシド、ボルテゾミブ、カンプトテシン、カルボプラチン、5-FU など、18 種類の薬剤について調べたが、3 種類の miRNA (miR-X、miR-Y、miR-Z) すべての発現を亢進する薬剤は見つからなかった。今後、さらに抗がん剤の種類を増やして検討を行う予定である。



【図4】 マウスPtch1欠損細胞を用いたmiRNA発現解析

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)

[学会発表] (計 4 件)

① Michiyo Okui, Junya Kobayashi, Kenshi Komatsu, Youngsoo Lee, Helen R. Russell, Peter J. McKinnon. MicroRNA-203 modulates olaparib sensitivity in medulloblastoma cells. The 16th Ataxia-Telangiectasia Workshop (北京)、2015 年

② Michiyo Okui, Junya Kobayashi, Kenshi Komatsu, Youngsoo Lee, Helen R. Russell, Peter J. McKinnon. MicroRNA modulates olaparib sensitivity in medulloblastoma cells. Gordon Research Conference on Genomic Instability (香港)、2016 年

③ 奥井理予、小林純也、小松賢志、李榮穗、
Helen R. Russell、Peter J. McKinnon. PARP
阻害剤感受性を亢進する microRNA の同定
第 39 回日本分子生物学会年会(横浜)、2016
年

④ 奥井理予、Helen R. Russell, Peter J.
McKinnon. PARP 阻害剤感受性を亢進する
microRNA の同定と PARP 阻害剤併用療法の
検討 日本薬学会第 136 年会(金沢)、
2018 年

6. 研究組織

研究代表者

奥井 理予 (OKUI, Michiyo)

桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・専
任講師

研究者番号：20327654