

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19905

研究課題名(和文)BRCA1抑制とNF- κ B活性化の作用機構の解明研究課題名(英文)A functional analysis of NF κ B downregulation due to BRCA1 inhibition

研究代表者

佐倉 杏奈 (Sakura, Anna)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・研究技術員

研究者番号：80626698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Basal-like乳癌は予後不良であり、この乳癌の治療開発が早急に望まれる。BRCA1変異細胞でNF κ B経路が亢進している報告からNF κ B経路を抑制するBortezomibがBRCA1機能不全細胞の増殖を選択的に抑制するという仮説を立て検討した。細胞株実験で、BRCA1遺伝子変異及び発現低下でNF κ B経路を亢進させ、Bortezomibが同経路の抑制を介しBRCA1機能不全細胞を選択的に死滅させることを確認した。最終年度は臨床検体を用いた実験で再現性の確認を行い、BRCA1発現低下の乳癌がBortezomibに高感受性である傾向を導き出した。現在本研究の結果の論文発表に向けて準備している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Basal-like乳癌は予後不良と関連があり効果的治療方法の確立が重要である。効果的治療方法は、腫瘍だけに効果があること(選択性)と、安全性の確立された既存の薬剤で実現することが望ましい。本研究の結果により、BRCA1機能不全細胞ではNF κ B経路がoncogene addictionを起こしていることを証明した。これはNF κ B阻害薬がBRCA1機能不全細胞を選択的に死滅させるということである。そして本研究で用いたBortezomibは多発性骨髄腫の治療ですでに用いられている安全性の確立された薬剤である。これらの点で実用性に富んでいると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Basal-like breast cancer, a subtype of breast cancer is associated with BRCA1 dysfunction. Basal-like breast cancer is linked to poorer clinical outcome, therefore effective treatment options for this subtype is desired. Recent reports have revealed that NF κ B signaling is upregulated in breast cancer with BRCA1 mutation. We hypothesized that basal-like breast cancer with BRCA1 dysfunction could be sensitive to Bortezomib, a NF κ B inhibitor. Indeed, we have revealed that cancer cell lines with BRCA1 dysfunction due to both mutation and reduced expression displayed NF κ B upregulation. Also, cells with BRCA1 dysfunction are sensitive to Bortezomib through NF κ B inhibition. The last series of experiments using clinical samples showed reproducible results, suggesting that Bortezomib could be a reasonable therapeutic option for basal-like breast cancer with BRCA1 dysfunction. We have been preparing a manuscript to present our data as a scientific paper.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により乳癌は 5 つの亜型に分類された (Nature 406:747-752, 2000, Proc Natl Acad Sci U S A. 100:8418-8423, 2003)。このうち basal-like 乳癌は予後不良である。basal-like 乳癌が BRCA1 (家族性乳癌の原因遺伝子) 変異及び機能不全と関連があることが報告された (Nat. Rev. Cancer 4: 814-819, 2004, Oncogene. 26:2126-32. 2007)。これにより、BRCA1 機能不全を伴う乳癌の克服は重要と考えられる。NF- κ B 転写因子は自然免疫、炎症、細胞生存に関わることが知られており (Nat Immunol 3:221-227, 2002.) NF- κ B の持続的な活性化と癌化の関連が指摘されている。実際に白血病やリンパ腫、大腸癌、膵臓癌など悪性腫瘍で NF- κ B の活性が上昇している (Surgery 130:363-369, 2001, J Immunol 175:7162-7169,2005, Cancer Res 59:1049-1053,1999, Cancer 89:2274-2281,2000)。このことから NF- κ B の活性化を阻害する Bortezomib(ベルケード®)が抗癌剤として使用できるか検討され、多発性骨髄腫の治療薬としてアメリカでは 2003 年に、日本でも 2005 年に承認された。その後 Bortezomib は NF- κ B を抑制するのか、活性化するのか議論が分かれているが、いずれにせよ NF- κ B の活性を伴う悪性腫瘍を選択的に死滅させることが証明された。近年、遺伝子変異による BRCA1 機能不全細胞で NF- κ B の転写活性が亢進していることが報告された。申請者らは、遺伝子変異のみでなく、発現不全による BRCA1 機能不全細胞でも NF- κ B が亢進していることを証明し、いずれの BRCA1 機能不全細胞も Bortezomib により選択的に死滅させられることを示した。いくつかの濃度では BRCA1 機能不全のみを選択的に死滅させる結果は、つまり理論上副作用なく、予後不良癌細胞のみ死滅させる可能性が高いことが示唆される。Bortezomib は多発性骨髄腫の治療薬として既に利用されており、安全性や薬物動態が既に検討された薬剤である。このように、安全性の確立されている既存の薬剤を用い、合成致死 (理論上副作用なし)に基づき、予後不良癌を選択的に死滅させる可能性を検討することが本研究の開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究は BRCA1 機能不全を伴う予後不良な乳癌、卵巣癌に対する画期的な治療方法の確立を目的とした。これにより乳癌全体の予後改善ができることが期待された。また卵巣癌に

応用できる可能性もある。癌細胞が持つ機能不全などの特徴と、臨床応用されている安全性の確立された既存の抗癌剤の効果の組み合わせで理論上副作用のない、予後不良を引き起こす癌細胞だけを選択的に死滅させる可能性を検討した。

3 . 研究の方法

本研究は、BRCA1 遺伝子変異、又は発現低下による BRCA1 機能不全細胞が Bortezomib に対し高い感受性を示すという結果を、BRCA1 機能不全（遺伝子変異または発現低下）を伴う乳癌、卵巣癌細胞株を用いた *in vitro*、および *in vivo* の実験系で確認し、さらに臨床検体を用いた実験で再現性を確認した。具体的には、遺伝子変異による BRCA1 機能不全細胞に野生型 BRCA1 を安定的に発現する細胞株と、BRCA1 の機能が正常な細胞に BRCA1 に対する shRNA を安定的に発現し BRCA1 を恒常的にノックダウンした細胞をそれぞれ樹立し *in vitro* で薬剤感受性を確認し、またこれらの細胞を免疫不全動物に皮下接種し *in vivo* での薬剤感受性を確認した。臨床検体は単細胞分離の上で *in vitro* で薬剤感受性を検討した。

4 . 研究成果

BRCA1 機能不全細胞が Bortezomib に対して高感受性を示すことを確認した。また NFκB 経路は BRCA1 機能不全細胞で亢進し、Bortezomib により抑制されることを p65 の局在変化の実験系で証明した。同様の結果を shRNA による BRCA1 発現抑制を用いた実験系でも証明した。これにより BRCA1 の遺伝子変異だけでなく、BRCA1 の発現低下でも NFκB 経路を亢進させ、いずれも Bortezomib に高感受性を示すことを証明した。BRCA1 機能不全細胞である乳癌、卵巣癌の細胞株に恒常的に野生型の BRCA1 を発現させた細胞株を免疫不全マウスに皮下接種し、xenograft を作成し *in vivo* での Bortezomib に対する感受性も検討した。現在引き続きマウスの実験を行なっている。また、最終年度は臨床検体を用いた実験を行い、BRCA1 発現低下を伴う Triple-negative 乳癌が Bortezomib に高感受性である傾向を導き出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ayano Shinagawa, Kimino Minagawa, Hidekazu Yoshie, Tomoko Tsuruga, Keiko Oda, Hitoshi Yamamoto, Toshio Kumai, Juan A. Bernal, Ko Sato, Anna S. Sedukhina	4. 巻 2
2. 論文標題 EPO Signaling as a Predictive Marker of Disease Severity in RSV Infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Innovative Research in Medical Science	6. 最初と最後の頁 2455-8737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23958/ijirms/vol102-i09/21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tomoko Tsuruga, Keiko Oda, Hidekazu Yoshie, Ayano Shinagawa, Kimino Minagawa, Toshio Kumai, Ko Sato, Anna S Sedukhina	4. 巻 2
2. 論文標題 A Subclassification of Basal-like Breast Cancer for Prognostic Prediction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Innovative Research in Medical Science	6. 最初と最後の頁 1031-1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23958/ijirms/vol102-i07/15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 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, and Ko Sato	4. 巻 8
2. 論文標題 A bioinformatics-to-clinic sequential approach to analysis of prostate cancer biomarkers using TCGA datasets and clinical samples: a new method for precision oncology?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 99601-99611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.20448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oda-Kawashima K1,2, Sedukhina AS1, Okamoto N1, Lytvyn M, Minagawa K, Iwata T, Kumai T, Sato E, Inada E, Yamaura A, Sakamoto M, Roche-Molina M, Bernal JA, Sato K	4. 巻 10
2. 論文標題 NF-κB signaling in cardiomyocytes is inhibited by sevoflurane and promoted by propofol.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 259-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 セドキーナアンナ
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌をモデルにしたプレジジョンオンコロジーのための多段階in silico解析
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 セドキーナアンナ 佐藤工
2. 発表標題 合成致死を多くの予後不良癌へ
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 セドキーナアンナ 佐藤工
2. 発表標題 前立腺癌におけるGRB2発現の生存期間と治療方法への影響
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考