

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06376・19K21457

研究課題名（和文）遺伝性乳がん家系のBRCA変異保有者に対する新規予防法の開発

研究課題名（英文）The development for prevention of breast cancer for BRCA carriers

研究代表者

小野 寿子 (Ono, Hisako)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50827326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん増殖抑制効果を認める天然化合物クルクミンがBRCAnessを誘導することから、ケミカルプローブとして利用し、遺伝性乳癌や卵巣癌の予防や治療の一助になる分子マーカーを探索した。ケミカルバイオロジーの手法にてクルクミン固定化ナノ磁性ビーズを作成し、クルクミン結合タンパク質を精製・同定した。この候補分子のうち分子WをsiRNA法にてknockdownすると、mRNAレベルでBRCA1、2の発現低下が認められた。次に臨床で使用されている分子Wの阻害剤を処理すると同様の発現低下が認められた。以上の結果から、分子WはBRCAness誘導のkey moleculeである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりクルクミンの結合タンパク質のひとつである分子WがBRCAness誘導に関連している可能性が示唆された。現在、PARP阻害剤が遺伝性乳癌や卵巣癌の治療で臨床応用されている。PARP阻害剤の効果はBRCAnessの状態であれば感受性が增强することが想定されるため、今後、分子Wに関するさらなる解析を進めることで遺伝性乳がん卵巣がん症候群の予防や治療に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Based on the result that curcumin, one of natural compounds with anti-tumor effects induces BRCAness, we used it as a chemical probe and searched for a molecular biomarker which may be useful for prevention and therapies of hereditary breast and ovarian cancers. We generated curcumin-fixed magnetic FG beads through chemical biology approaches, and identified the curcumin-binding proteins. Among these identified proteins, molecule W was a candidate. Knockdown of W downregulated the BRCA1 and BRCA2 expression at the mRNA levels, as well as the treatment by clinically used inhibitory drugs of W. These findings suggest that molecule W has the possibility of a key molecule to induce BRCAness.

研究分野：乳癌 遺伝性腫瘍

キーワード：BRCA 遺伝性乳がん卵巣がん症候群 クルクミン ケミカルバイオロジー BRCAness PARP阻害薬 オラパリブ

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然化合物クルクミンはカレーに使われるターメリックというスパイスに含まれる黄色のポリフェノールであり、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験で様々ながんにおいて予防効果を示すことから、多くの予防医学研究に使用され、プロドラッグとして臨床応用が期待されている。私はクルクミンががん予防効果を示す一方、BRCA1 の発現を抑えるという既報 (Carcinogenesis, 2013; 34:2486-2497) に着目した。BRCA1/2 遺伝子は DNA 相同組み換え修復に必要ながん抑制遺伝子であり、「ゲノムの管理人」としてゲノム安定性の維持に機能している。生殖細胞系列 BRCA 変異以外に、BRCA 体細胞変異、また BRCA 遺伝子に変異を認めなくても BRCA の機能が低下している状態を BRCAness と総称する。BRCAness を呈するとゲノムの不安定性から発がんを誘導する。どのようにクルクミンが BRCAness を誘導するかを探索することは、大変興味深い。なぜなら、この探索はクルクミンのがん予防効果増強につながり、また BRCAness を呈したがんの発症メカニズムを探索することにもなるからである。

また近年、遺伝性乳癌や卵巣癌の治療に臨床応用されている PARP 阻害剤は合成致死といったメカニズムで BRCAness を呈したがんに効果を発揮することから、本研究は PARP 阻害剤の感受性の増強メカニズムを探索することにもなると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、クルクミンの BRCAness 誘導という負の側面に注目し、クルクミンをケミカルプローブとして利用する。ケミカルバイオロジーの手法でクルクミン結合タンパク質を同定し、その中から BRCAness 誘導を引き起こす分子の探索を行う。次にその分子の阻害物質を見だし、クルクミンのがん予防効果をより増強させることが可能かを検討する。また本研究の臨床的な応用として、その分子の発現を調整し BRCAness を誘導することにより PARP 阻害剤の感受性が増強されるかを検討する。以上により本研究は遺伝性乳癌や卵巣癌の予防や治療に関して新たな解明につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

まず、クルクミンががん予防効果を示す一方、BRCA1 の発現を抑えるという既報に関して、再現性の確認を行い、クルクミンが BRCAness 誘導を起こすケミカルプローブとして利用できるか検討した。次にクルクミン結合タンパク質を精製・同定し、その中に BRCAness を誘導する分子があるか検討した。BRCAness を誘導する分子が同定できれば、siRNA 法やその分子の阻害剤を同定し、その分子の発現を調整することで、クルクミンのがん増殖抑制効果を増強したり、PARP 阻害剤の感受性が増強できるかを検討する。

### 4. 研究成果

まず、クルクミンが BRCA1 の発現を抑えるという既報に関して、再現性の確認を行った。複数の乳癌細胞や卵巣癌細胞株を使用し、WST-8 法によるクルクミンの増殖抑制効果と FACS 解析によりそのフェノタイプを確認し、十分にクルクミンががん増殖抑制効果を示す濃度にて BRCA1、または BRCA2 の発現低下が認められるか検討した。複数の細胞株にてクルクミン処理にて mRNA レベルで BRCA1、または BRCA2 の発現低下が認められることからクルクミンが BRCAness を誘導する化合物であると確認された。

次にクルクミンをケミカルプローブとして利用し、BRCAness 誘導分子を探索した。乳癌細胞株 MCF-7 細胞を用いてケミカルバイオロジーの手法でクルクミン固定化ビーズを精製し (Fig.1) クルクミン結合タンパク質を同定した (Fig.2)。同定したタンパク質の機能に関して過去の文献を検討し、BRCAness 誘導に関連している可能性があるものから順に検討を行った。siRNA 法にて各々の分子を knockdown し、mRNA レベルで BRCA1、または BRCA2 の発現低下が認められるかどうかの検討を行った。DNA 修復に関与すると報告されている分子 X、クルクミンが作用する代表的な NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで RANKL の発現を低下させると報告されている分子 Y、散发性乳癌のマーカーであり、BRCA の近傍の遺伝性である分子 Z、抗がん剤のターゲットになっている分子 W を候補にあげた (Fig.3)。

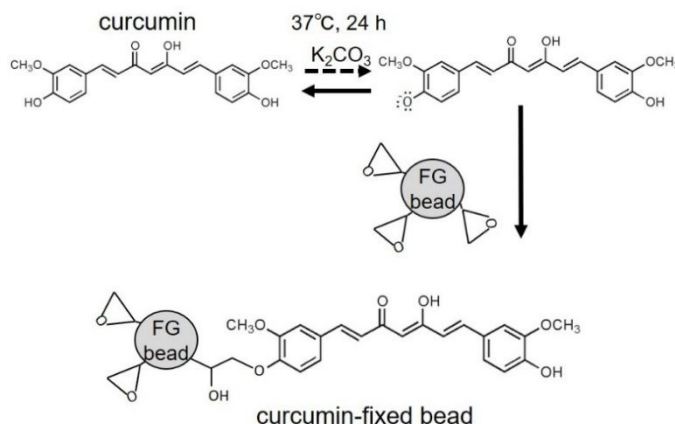


Fig.1  
クルクミン固定化ビーズ作成

Oncol Rep., 2017 38:3205-3210  
抜粋

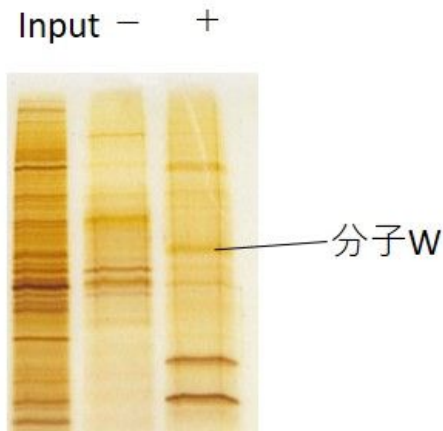


Fig.2 (Marker は省略) 銀染色

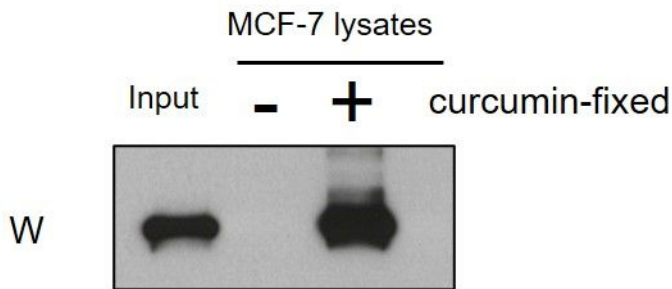


Fig.3 クルクミン結合タンパク質のひとつである分子 W

複数の候補の中からいくつかの細胞株における結果に基づき、クルクミン結合タンパク質のひとつである分子 W のアイソタイプのひとつが BRCAness 誘導を引き起こしているのではないかと最終的に結論づけた。また分子 W の阻害剤を処理すると BRCAness が誘導されることも確認された。

引き続き、分子 W の発現を調整することでクルクミンのがん増殖抑制効果を増強するかを検討を行った。siRNA 法にて分子 W を knockdown し、WST-8 法にて増殖抑制効果を検討したが、短期間の培養日数ではクルクミンのがん増殖抑制効果を増強するという結果に至らなかった。一方、卵巣癌細胞株において分子 W の阻害剤を処理し、PARP 阻害剤の感受性が増強するかを検討したところ、PARP 阻害剤オラパリブによるがん増殖抑制効果が増強されることが示された。これらの結果から、クルクミンの結合タンパク質である分子 W が BRCAness 誘導に関連している可能性が示唆された。今後、分子 W に関するさらなる解析を進めることで遺伝性乳癌や遺伝性卵巣癌の予防や治療に役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小野 寿子 曾和 義広 堀中 真野 酒井 敏行	4. 巻 45
2. 論文標題 Made in Japanの新規分標的薬によるトリプルネガティブ乳癌に対する治療開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小野 寿子 酒井 敏行	4. 巻 3
2. 論文標題 トリプルネガティブ乳癌に対する治療戦略の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 84-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小野 寿子 森 泰輔 小西 英一、北脇 城、田口 哲也	4. 巻 129
2. 論文標題 当院初リスク低減乳房切除術とリスク低減卵管卵巣切除術を施行したBRCA変異陽性乳癌患者の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 京都府立科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32206/jkpum.129.01.009	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野 寿子
2. 発表標題 Made in Japanの新規分標的薬によるトリプルネガティブ乳癌に対する治療法の開発
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術集会 ワークショップ「日本における新規乳がん治療薬の開発」
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hisako Ono, Mano Horinaka, Shusuke Yasuda, Mie Morita, Emi Nishimoto and Toshiyuki Sakai
2. 発表標題 A novel RAF/MEK inhibitor CH5126766 in phase 1 clinical trial has an effectiveness in the combination with eribulin for the treatment of TNBC.
3. 学会等名 ESMO Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都府立医科大学 創薬医学  <a href="http://fkpu-m-pubmed.com/">http://fkpu-m-pubmed.com/</a></p>
---

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