

機関番号：32713

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591557

研究課題名 (和文) Basal-like 乳癌の術前化学療法における DNA 損傷応答の解析

研究課題名 (英文) Analyses of DNA damage response to neoadjuvant chemotherapy in basal-like breast cancer

研究代表者

太田 智彦 (OHTA TOMOHIKO)

聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授

研究者番号：60233136

研究成果の概要 (和文)：術前化学療法としてシクロホスファミド+エピルビシンを施行した原発性乳癌症例 60 例について初回化学療法施行後 18-24 時間に針生検を施行し、乳癌細胞における BRCA1,  $\gamma$ H2AX, および Rad51 の DNA 損傷部位への集積を免疫染色にて核内 foci 形成として同定し、DNA 損傷修復能としてスコア化した。腫瘍縮小率との相関を解析したところ、サブタイプ分類を含む臨床病理学的因子とは独立した最も有意な化学療法感受性の予見因子であった。

研究成果の概要 (英文)：Core needle biopsy specimens were obtained from sixty cases of primary breast cancer before and 18-24 hours after the first cycle of neoadjuvant epirubicin plus cyclophosphamide treatment. Nuclear focus formation of DNA damage repair proteins, BRCA1-,  $\gamma$ H2AX-, or Rad51, was immunohistochemically analyzed and DNA damage response competence was evaluated as DDR score. A high DDR score significantly correlated with low tumor response to EC and EC + docetaxel whereas other clinicopathological factors analyzed did not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：BRCA1・Basal-like 乳癌・DNA 損傷・薬剤感受性・術前化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現解析により乳癌は 5 つの亜型に分類された。このうち basal-like 乳癌は内分泌療法とトラスツズマブに抵抗性を示し、細胞増殖能が高く予後不良タイプである。BRCA1 経路の機能不全が散発性 basal-like 乳癌をきたす原因として考えられ、BRCAness という概念が提唱されている。BRCA1 は DNA 損傷修復において中心的な役割をしており、特に DNA 二重鎖切断において相同組み替えを行う BRCA2/Rad51 複合体を損傷部位に運ぶ

ために必須である。このカスケードに異常があると DNA 損傷に対する感受性が著名に亢進することから DNA 損傷をきたす抗癌剤の感受性予測因子として期待できる。

## 2. 研究の目的

乳癌の化学療法投与直後におこる BRCA1 を中心とした DNA 修復経路の反応を、臨床検体を用いた免疫染色と培養細胞を用いたプロテオミクスで解析し、Basal-like 乳癌および basal-like 乳癌に類似した DNA 損傷応答

を示す乳癌に特異的な薬剤感受性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳癌針生検検体の解析

①対象患者：聖マリアンナ医科大学乳腺・内分泌外科にて術前化学療法としてシクロホスファミド+エピルビシンを施行した原発性乳癌症例60例。

②免疫組織学的解析：初回化学療法施行後18-24時間に針生検を施行し、化学療法施行前(baseline)の針生検検体と共に乳癌細胞核内のBRCA1,  $\gamma$ H2AX, ユビキチン鎖、Rad51のfoci形成を免疫染色にて同定。

③治療効果との相関：初回診断時、化学療法終了時の腫瘍の体積を画像診断結果から算出し、縮小率を評価。

#### (2) basal-like 乳癌モデル培養細胞の DNA 損傷応答におけるプロテオミクス解析

①乳腺由来細胞のBRCA1およびp53をsiRNAでknockdownし、basal-like乳癌に近いDNA損傷応答の細胞内環境を構築。

②上記細胞に対してDNA損傷を加えたのち蛋白抽出液を作成し、2D-DIGEを用いてDNA損傷前後で変化する蛋白質を網羅的に解析する。ゲル上のスポットを切り出し、質量分析計にて当該蛋白質を同定する。

#### (3) DNA 損傷応答因子のエピジェネティック解析

原発性乳癌における相同組換え修復因子のプロモーターメチレーションをMethylated CpG island amplification (MCA)法とBisulfite-sequencing法、pyrosequencing法を用いて解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳癌針生検検体の解析

原発性乳癌症例の術前化学療法後針生検検体の核内BRCA1,  $\gamma$ H2AX, Rad51 foci形成による化学療法感受性予測では、foci陽性例の化学療法感受性が低いことが判明し、これら全ての因子をDNA損傷修復能としてスコア化したところ、このスコアはLuminal乳癌、Basal-like乳癌にかかわらずサブタイプ分類を含む臨床病理学的因子と独立した最も有意な化学療法感受性の予見因子であることがわかった。

#### (2) basal-like 乳癌モデル培養細胞の DNA 損傷応答におけるプロテオミクス解析

siRNAでBRCA1およびBARDの発現を抑制する条件を設定したが、限られた細胞株でしか十分な抑制が出来なかった。そこで、全ての細胞株にshRNAの導入が可能なレンチウイルスベクターを作成、さらに、同時に変異体を

add-back させることが可能なレンチウイルスベクターを作成した。しかし、当初予定のプロテオミクス解析では有意な結果は得られなかった。

#### (3) DNA 損傷応答因子のエピジェネティック解析

相同組換え修復経路22因子について15種の培養細胞を用いてプロモーターメチレーション解析のためのMethylated CpG island amplification (MCA)法、Bisulfite-sequencing法、pyrosequencing法の条件設定を行った。さらに術前化学療法を行った原発性乳癌のうち、1) basal-like乳癌のpCR症例、2) Luminal A乳癌のpCR症例、3) Luminal A乳癌のSD症例、それぞれ20例についてメチレーションを解析するためのmicrodissectionとDNA抽出を終了した。

### 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16件)

1. Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ohta T, Kurosumi M, Miyamoto K, Yamamoto Y, Iwase T. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer*. 17(2):118-24, 2010. 査読有り

2. Asakawa H, Koizumi H, Koike A, Takahashi M, Wu W, Iwase H, Fukuda M, Ohta T. Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res*. 12(2):R17, 2010. 査読有り

3. Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Mori S, Tsumura M, Okada S, Ohta T, Ohtani K, Kobayashi M, Takihara Y. Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21529-34. 査読有り

4. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6746-56. 査読有り

5.太田智彦、「乳がん」、遺伝子診療学（第2版）—遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望—（日本臨床）、2010年、984巻、8号、438-43、査読有り

6.Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman AR, Ohta T. HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Res.* 2010 Aug 1;70(15):6384-92. 査読有り

7.太田智彦、小泉宏隆、呉文文、「DNA 損傷応答と乳癌の薬剤感受性」、乳癌の臨床 2010年（篠原出版新社）、2010年、第25巻、第6号、査読有り

8.Sato K, Ohta T, Venkitaraman AR. A mitotic role for the DNA damage-responsive CHK2 kinase. *Nat Cell Biol.* 2010 May;12(5):424-5. 査読有り

9.太田智彦、「BRCA 遺伝子異常と標的治療」、がん分子標的治療（メディカルレビュー社）2010年4月号、Vol.8 No.2、査読有り

10.Ohta T, Wu W, Koike A, Asakawa H, Koizumi H, Fukuda M. Contemplating chemosensitivity of basal-like breast cancer based on BRCA1 dysfunction. *Breast Cancer.* 16(4):268-74, 2009. 査読有り

11.Takeshita T, Wu W, Koike A, Fukuda M, Ohta T. Perturbation of DNA repair pathways by proteasome inhibitors corresponds to enhanced chemosensitivity of cells to DNA damage-inducing agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64:1039-46, 2009. 査読有り

12.Nishikawa H, Wu W, Koike A, Kojima R, Gomi H, Fukuda M and Ohta T. BAP1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res.* 69:111-9, 2009. 査読有り

13.Sato K, Rajendra E, and Ohta T. The UPS: A promising target for breast cancer treatment. *BMC Biochem.* 9(suppl 1):S2,1-8, 2008. 査読有り

14.Shimo A, Tanikawa C, Nishidate T, Lin ML, Matsuda K, Park JH, Ueki T, Ohta T, Hirata K, Fukuda M, Nakamura Y, Katagiri T. Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated

kinesin overexpression in mammary carcinogenesis. *Cancer Sci.* 99:62-70, 2008. 査読有り

15.Wu W, Koike A, Takeshita T, and Ohta T. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div.* 3:1:1-10, 2008. 査読有り

16.Oshima R, \*Nakano H, Katayama M, Sakurai J, Wu W, Koizumi S, Asano T, Watanabe T, Asakura T, Ohta T, Otsubo T. Modification of the hepatic mitochondrial proteome in response to ischemic preconditioning following ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Eur Surg Res.* 40:247-55, 2008. 査読有り

〔学会発表〕（計13件）

1.太田智彦、「乳がんのDNA 相同組換え修復異常とユビキチン」、第69回日本癌学会学術総会・シンポジウム、2010年9月22-24日、大阪国際会議場（大阪）

2.Tomohiko Ohta. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. EMBO Workshop -The interface between the ubiquitin family and the DNA damage response. September 1st - 5th, 2010. Hotel Istra (Croatia)

3.太田智彦、「DNA 損傷応答と乳癌の薬剤感受性」、第18回日本乳癌学会学術総会・シンポジウム、2010年6月24-25日、ロイトン札幌（北海道）

4.Tomohiko Ohta. The DNA damage repair pathway in breast cancer chemotherapy. The 23rd International Symposium of the Foundation for Promotion of Cancer Research“Recent Progress on Breast Cancer. 2010年4月23-25日.国立がんセンター（東京都）

5.太田智彦、「乳癌の化学療法感受性とBRCA1」、第19回乳癌基礎研究会、2009年7月25日、伊香保温泉（群馬県）

6.Ayaka Koike, et al. REGULATION OF NUCLEOPHOSMIN BY BRCA1 E3 UBIQUITIN LIGASE. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting - The Ubiquitin Family -. 2009年4月22日. New York, USA

7.Wenwen Wu, et al. The E3 ligase activity

of HERC2 regulates BRCA1-mediated G2/M checkpoint function independent of BARD1. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting - The Ubiquitin Family -. 2009年4月22日. New York, USA

8.太田智彦、「BRCA1 機能不全を target にした乳癌の化学療法」、第109回日本外科学会定期学術集会、2009年4月2日、福岡国際会議場（福岡県）

9.太田智彦、「BRCA1 を標的とするユビキチンリガーゼの同定」、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場（愛知県）

10.太田智彦、「BRCA1 の機能から考えた Basal-like 乳癌の薬剤感受性」、第16回日本乳癌学会学術総会、2008年9月27日、大阪国際会議場（大阪府）

11. Tomohiko Ohta. DNA double-strand break repair mediated by BRCA1. 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research. 2008年9月23日. 岡山県

12. Tomohiko Ohta. Candidate substrates of BRCA1 in its multiple cellular functions. 2nd JCA-AACR special Joint Conference: The latest Advance in Breast Cancer Research From Basic Science to Therapeutics. 2008年7月14日. 兵庫県

13.太田智彦、「BRCA1 カスケードによる遺伝子恒常性維持と家族性腫瘍」、第14回日本家族性腫瘍学会学術総会、2008年6月21日、東京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 智彦 (OHTA TOMOHIKO)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科  
（研究院）・教授

研究者番号：60233136

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし