

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07686

研究課題名（和文）PARP阻害剤による非遺伝性乳癌に対する新規抗がん治療戦略

研究課題名（英文）A novel strategy by PARP inhibitors for sporadic breast cancers

研究代表者

桑原 一彦（Kawahara, Kazuhiko）

近畿大学・大学病院・講師

研究者番号：10263469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：PARP阻害剤は現在抗がん治療に適応されており、BRCA1/2変異を有する癌でその有効性が認められており、乳癌、卵巣癌、膵癌などで臨床応用されている。BRCA変異は全乳癌患者の約5%でのみみられるため、大部分の非遺伝性散発性乳癌ではPARP阻害剤による治療効果は得られない。我々は非遺伝性散発性乳癌の発症に関わるGANPの発現抑制がBRCA2のタンパク発現を低下させることから、GANPの発現抑制によるPARP阻害剤の効果を示した。GANP発現低下によるBRCAness誘導に至る分子機構を利用し、BRCA変異の有無に依らないPARP阻害剤による新規乳癌治療戦略を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌発症には女性ホルモンの長期暴露、欧米型の生活習慣などが危険因子となるが、95%を占める非遺伝性散発性乳癌ではその原因には不明な点が多い。家族性乳癌の原因遺伝子BRCA1とBRCA2の解析から両者がDNA修復に関与することが示され、乳癌が「DNA修復機構の異常による疾患」であることが明らかにされた。我々は転写共役型DNA傷害の制御に関わる分子GANPの機能不全と非遺伝性散発性乳癌発症に着目し、GANPの標的分子の一つがBRCA2であることを見出した。GANPを強制的に発現低下させることでBRCA2を抑制でき、PARP阻害剤の適応を非遺伝性散発性乳癌にまで広げることが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) have emerged as a new class of anti-cancer drugs, specifically for malignancies bearing aberrations of the homologous recombination pathway. They are clinically used in breast, ovarian, and pancreatic cancers. BRCA mutations are observed only in 5% among the patients with breast cancers; therefore, PARP inhibitors are ineffective to most of the patients with non-hereditary sporadic breast cancers. We found that PARP inhibitors could suppress the proliferation of breast cancer cells after ganp knockdown. In breast cancer cells, we demonstrate a novel strategy by PARP inhibitors through BRCAness induced by GANP-deficiency.

研究分野：実験病理

キーワード：乳癌 転写共役型DNA傷害

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の約 15 人に 1 人が罹患するが、女性ホルモンの長期暴露、欧米型の生活習慣などが危険因子となることが疫学的研究から明らかにされているものの、約 95% を占める非遺伝性散発性乳癌は多因子疾患のためその発症機構は不明な点が多い。我々は散発性乳癌の臨床検体を用いた解析で TREX2 複合体の構成分子 GANP の発現が独立予後因子であること、さらに二種類の GANP 欠損マウスで乳癌を自然発症することを明らかにし、マウスにおいて発症した乳癌の immunophenotype がヒト乳癌と類似していることを報告した (Kuwahara *et al.*, *Cancer Sci.*, 2016)。すなわち、ヒト乳癌発症を模倣するマウスモデルであることが示唆された。この乳癌発症には TREX2 複合体の発現抑制による「転写共役型 DNA 傷害」の誘導が重要であることが示唆された。出芽酵母の詳細な解析から mRNA 核外輸送に関わる TREX2 複合体のどの構成分子を欠損させても過剰な DNA 組換えを引き起こし、その結果ゲノムに不安定性が生じることが示されている。一方、ヒトなどの高等哺乳動物において GANP 以外の TREX2 複合体構成分子が *in vivo* で同様の機能を有するのかが明確になっていない。我々は GANP 以外の TREX2 構成分子である PCID2 を乳腺特異的に欠損させたマウスを作製したが、乳癌の自然発症は確認できていない (未発表データ)。この結果から、GANP 欠損マウスにおける乳癌発症は「転写共役型 DNA 傷害」のみが関与しているというよりは、GANP 特有の機能あるいはその標的分子が乳癌発症に関与するのではないかと考えた。

30 年前に家族性乳癌の原因遺伝子として BRCA1 と BRCA2 が単離され、これまでの詳細な解析から両者が DNA 修復に関与することが示された。これらの結果に基づき、乳癌は「DNA 修復機構の異常による疾患」であることが広く認知されている。我々は上述のマウスモデルから、GANP の機能不全が非遺伝性散発性乳癌の発症に関与することを明らかにしたが、さらに愛知県がんセンター疫学予防部との共同研究により、ヒト *ganp* の遺伝子多型 (SNPs) が乳癌の発症および悪性進展に関わることを見出した (Kotani *et al.*, *Breast Cancer*, 2019)。しかし、GANP の異常が実際に DNA 修復異常にどのように関与しているかは未だ明らかではなく、転写共役型 DNA 傷害は既知の DNA 修復系酵素と関連するという仮説のもと、GANP と様々な DNA 修復関連分子との関係を検証してきた。

2. 研究の目的

GANP 欠損マウスで発症する乳癌がヒト乳癌の表現型と類似しているという結果は、ヒト乳癌の発症においても GANP 発現低下が原因の一端であることを示唆している。これまでに報告された多くのマウスモデルでは、発症した乳癌は ER 陰性のものが多く、ER 陽性の乳癌が発症するのは ER シグナル経路に関わる分子の変異マウスのみである。一般的に C57BL/6 背景では乳癌の自然発症はほとんど報告がないが、我々の C57BL/6 背景 GANP 欠損マウスは一年以上の期間を経て約 30% で乳癌を自然発症し、ヒト乳癌発症を理解する上で過去報告されていない極めて有用なマウスモデルである。乳腺特異的 GANP 欠損マウスの乳腺上皮では著明な乳腺構築異常を認めるが、この表現型は乳腺特異的 BRCA1 欠損マウスの結果と類似しており (Xu *et al.*, *Nat. Genet.*, 1999) 乳腺上皮でのゲノム不安定性誘導に GANP が関与する可能性が高い。これらの結果から、GANP が BRCA 分子様の機能に関わるという仮説をたて、GANP の発現低下により影響を受ける DNA 修復関連分子をスクリーニングしたところ、BRCA2 発現が特異的に抑制されることを見出した。BRCA2 は家族性乳癌の原因遺伝子として知られるが、散発性乳癌における関与は未だ明確になっていない。本研究では GANP-BRCA2 axis の乳癌発症における関与を明らかにし、BRCA2 機能不全を強制的に誘導することで PARP 阻害剤による乳癌治療が可能か、に関して基盤研究を行う。

3. 研究の方法

今回の研究は以下の四点を中心に行った。

(1) 乳腺特異的 GANP 欠損による乳腺上皮のゲノム不安定性には BRCA2 発現低下が関与するの

か
--- ヒト BRCA2 遺伝子をクローニングして発現ベクターに組み込み、E2 刺激による DNA 傷害に BRCA2 が関与するかを MCF7 で解析し、コメットアッセイ (DNA 傷害) Annexin V/PI (細胞死) などにより評価する。さらに BRCA2 Tg マウスと *ganp* ヘテロ欠損マウスとの交配のために、トランスジーンのコストラクトを作成する。BRCA2 トランスジェニック (Tg) マウスを樹立し、*ganp* ヘテロ欠損マウスとの交配することにより、*ganp* ヘテロ欠損マウスにおける乳癌の自然発症に影響を及ぼすかを確認する。

(2) GANP は標的分子 BRCA2 をどのように制御しているのか

--- GANP とともに TREX2 複合体を形成する DSS1 は、BRCA2 の安定化に関わる分子であるが、DSS1 欠損により BRCA2 のタンパク質分解が生じる。GANP が DSS1 の発現に関わり、間接的に BRCA2 の発現を抑制している可能性がある。また GANP 自体が BRCA2 の転写調節に関与している可能性もある。ウェスタンブロットや RT-PCR を組み合わせ、まず

転写調節なのか、タンパク制御なのかを明らかにする。

- (3) 乳癌組織検体において GANP の発現と BRCA2 の発現に相関がみられるのか
--- 組織アレイを用いた約 300 例の非遺伝性散発性乳癌の臨床検体を用いて抗 GANP 抗体及び抗 BRCA2 抗体の免疫染色を行い、両者の発現を定量的に解析する。予備実験で BRCA2 の発現が効率よく検出できない場合は、モノクローナル抗体の作成に着手する。GANP の免疫染色の条件は既に決定している。
- (4) GANP 発現抑制細胞における PARP 阻害剤の効果
--- 研究開始以降にオラパリブ以外の複数の PARP 阻害剤が入手可能となった。BRCA 野生型と変異型を有するヒト乳癌細胞株を準備し、実際に細胞死を誘導できる濃度を確認する。その際に増殖アッセイで良いのか、既報で用いられている Clonogenic survival assay が良いのか、を確認する。BRCA 分子の直接の発現抑制により、PARP 阻害剤による細胞死が誘導できることは既に確認されているので、DSS1 と GANP をノックダウンすることにより PARP 阻害剤の効果がみられるか検証する。

4. 研究成果

- (1) ヒト BRCA2 遺伝子を PCR にてクローニングし、発現ベクターは完成したが、乳癌細胞株での強制発現系を構築することができなかった。その理由は不明だが、発現ベクターのプロモーター活性の問題の可能性がある。細胞株での発現が成功しなかったため、Tg マウス作製へと進めることができず、*in vitro*、*in vivo* とともに十分な成果を上げることができなかった。
- (2) スクリーニングはヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いた GANP ノックダウンにより、発現量が変動する分子をウェスタンブロット法により解析したため、この発現低下が転写レベルで起こっているのか、タンパク翻訳後に起こっているのかを確認する必要がある。リアルタイム PCR による BRCA2 mRNA を定量したところ、転写レベルで抑制されていることが確認された。GANP が転写因子として機能するという報告はないため、mRNA 核外輸送因子としての機能による可能性を考えた。GANP ノックダウンした細胞株から核分画と細胞質分画を分け、それぞれから mRNA を抽出しリアルタイム PCR を行った。コントロール細胞では BRCA2 mRNA は細胞質に優位に存在し、核外輸送が障害されると核内での発現が増加することが予想されるが、BRCA2 mRNA 量は細胞質、核ともに著減していた。このことから、GANP が BRCA2 mRNA の核外輸送を障害している可能性は低いが、転写レベルで抑制していることが判明した。上述の通り、TREX2 複合体の一員である DSS1 は BRCA2 安定化因子であり、GANP が DSS1 の発現自体を制御している可能性も考えられたが、GANP ノックダウン細胞において、DSS1 は mRNA、タンパクともに発現量に影響を受けなかった。GANP 抑制による BRCA2 の発現低下は、DSS1 非依存性であることが明らかとなった。
- (3) 組織アレイを用いた非遺伝性散発性乳癌における GANP と BRCA2 の発現が相関するのかを免疫組織化学で解析した。BRCA2 はこれまで免疫染色で使用可能な抗体がないといわれていたが、種々の条件で免疫染色をおこなったところ、コマーシャルで購入可能な抗体でも免疫染色可能であることが示された。名古屋市立大学乳癌外科の遠山竜也先生から供与された組織アレイを用いて両者の免疫染色を行い、その発現を H-score で定量したが、統計学的に有意な相関は得られなかった。そのことから、BRCA2 は GANP 以外の分子による制御を受けている可能性が考えられた。DSS1 と GANP の発現も相関せず、DSS1 と BRCA2 の発現も相関しないことから、組織検体でこれらの分子の発現量を評価することが困難であると考えた。
- (4) MCF-7 以外の乳癌細胞株を複数入手し、BRCA1 や BRCA2 に変異がみられる細胞株を用いて PARP 阻害剤による細胞死を評価した。BRCA 野生型、変異型を含む種々の細胞株で IC₅₀ を算出した。今回の実験では、MTT アッセイで細胞増殖に与える影響を評価することが可能であった。コントロールで用いた DSS1 ノックダウン細胞とともに、GANP ノックダウン細胞においても PARP 阻害剤により細胞死の増強を誘導できることが判明し、GANP ノックダウンによる BRCA2 タンパクの発現低下の誘導を間接的に証明することができた(投稿準備中)。GANP ノックダウンによる PARP 阻害剤の効果は BRCA 野生型でもみられることから、現在 BRCA 変異を含む、相同組換えの障害を伴う場合のみに使用される PARP 阻害剤が拡大適用できる可能性があり、GANP ノックダウンを今後如何にして誘導するか、siRNA 医薬や低分子化合物などの可能性を含めてさらに解析を進めていく。BRCA2 ノックダウンに比べて、GANP ノックダウンは GANP の発現を低下させることで DNA 傷害を誘導することができ、さらにプラチナ製剤の感受性を増強させることができる(未発表)。BRCA2 ノックダウンに比べて、これらの利点があることから PARP 阻害剤の効果させる以上にアドバンテージがあると考えられる。

当初の研究計画には入れていなかったが、研究方法を一部修正する中で、MCF-7 を用いて GANP のヒストンアセチル化酵素活性(HAT)ドメイン欠損株を Crisper-Cas9 を用いた RNA 編集により作製した。HAT は遺伝子の転写に関わることが示されており、このドメインが BRCA2 の転写に関与する可能性がある。この点に関しても現在解析を進めており、さらに PARP 阻害剤の効果に影響を与えるかを検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakai Yasuhiro, Kuwahara Kazuhiko	4. 巻 74
2. 論文標題 Carcinogenesis caused by transcription coupled DNA damage through GANP and other components of the TREX 2 complex	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 103 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13415	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 該当する
1. 著者名 Kuwahara Kazuhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 DNA Damage, DNA Repair, and Cancer: Second Edition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16835 ~ 16835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242316835	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 Yasuhiro Sakai, Kazuya Yoshinaga, Ayaka Yoshida, Andri Rezano, Kazuya Shiogama, Yoshiaki Kawashima, Tadashi Yoshizawa, Akihiko Yoshizawa, Shingo Hatakeyama, Chikara Ohyama, Hiroyasu Ito, Masato Abe, Hiroshi Kijima, Yoshiro Otsuki, Akihiko Ito, Toyonori Tsuzuki, Motohiro Takeya, Nobuo Sakaguchi & Kazuhiko Kuwahara	4. 巻 114
2. 論文標題 Testicular teratogenesis from primordial germ cells with overexpression of germinal center-associated nuclear protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1729-1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15685	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 該当する
1. 著者名 Naomi Gondo, Yasuhiro Sakai, Zhenhuan Zhang, Yukari Hato, Kiyotaka Kuzushima, Suchada Phimsen, Yoshiaki Kawashima, Makoto Kuroda, Motoshi Suzuki, Seiji Okada, Hiroji Iwata, Tatsuya Toyama, Andri Rezano & Kazuhiko Kuwahara	4. 巻 101
2. 論文標題 Increased chemosensitivity via BRCA2-independent DNA damage in DSS1- and PCID2-depleted breast carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1048-1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00613-6	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 該当する

1. 著者名 Shu Kato, Yasuhiro Sakai, Asako Okabe, Yoshiaki Kawashima, Kazuhiko Kuwahara, Kazuya Shiogama, Masato Abe, Hiroyasu Ito & Shin'ichiro Morimoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Histology of Cardiac Sarcoidosis with novel considerations arranged upon a pathologic basis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11010251	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 Yasuhiro Sakai & Kazuhiko Kuwahara	4. 巻 -
2. 論文標題 GANP: An Immunoactive Protein with a Key Role in Tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33548/SCIENTIA592.	査読の有無 無
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 Yasuhiro Sakai, Suchada Phimsen, Seiji Okada & Kazuhiko Kuwahara	4. 巻 90
2. 論文標題 The critical role of germinal center-associated nuclear protein in cell biology, immunohematology, and hematolymphoid oncogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 30-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2020.08.007.	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 該当する

1. 著者名 Hoshino Naoki, Yanase Masanobu, Ichiyasu Taisuke, Kuwahara Kazuhiko, Kawai Hideki, Muramatsu Takashi, Ishii Hideki, Tsukamoto Tetsuya, Morimoto Shin-ichiro, Izawa Hideo	4. 巻 26
2. 論文標題 An autopsy case report of fulminant myocarditis: Following mRNA COVID-19 vaccination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 391 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2022.06.006	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑原一彦、酒井康弘、伊藤彰彦
2. 発表標題 GANP過剰発現に起因する精巣奇形腫発症とその病理学的意義
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuhiko Kuwahara and Akihiko Ito
2. 発表標題 Testicular teratomagenesis with overexpression of GANP
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuhiko Kuwahara & Yasuhiro Sakai
2. 発表標題 DSS1, an anti-cancer therapeutic target, and the mechanism of chemoresistance in breast cancers
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiko Kuwahara & Akihiko Ito
2. 発表標題 Decrease of BRCA2-interacting DSS1 contributes to reducing the side effects of chemotherapy in breast carcinomas
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原一彦
2. 発表標題 ヒト腫瘍発症及び悪性進展における転写共役型DNA傷害の病理学的意義 -非遺伝性散発性乳癌の解析からの知見-
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤秀、酒井康弘、上本康明、鈴木元、遠山竜也、桑原一彦
2. 発表標題 中心体複製制御因子SAC3D1に着目した 非遺伝性乳癌の予後解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原一彦、酒井康弘、黒田誠、塚本徹哉
2. 発表標題 中心体複製制御因子の乳癌悪性進展における意義
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井康弘、塚本徹哉、黒田誠、桑原一彦
2. 発表標題 ヒト精巢胚細胞感受性遺伝子ganpの奇形腫発症における病理学的意義
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	酒井 康弘 (Sakai Yasuhiro) (20754394)	浜松医科大学・医学部・准教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------