

201220064A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進 研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三木 義男

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究	----- 1
三木 義男	
II. 分担研究報告	
1. 分子プロファイリングによるトリプルネガティブ乳癌関連分子の同定とその機能解析	----- 16
片桐 豊雅	
2. DNA修復経路における合成致死解析	----- 21
太田 智彦	
3. DNA損傷修復の新たな薬剤標的の研究	----- 25
中田 慎一郎	
4. ホルモン療法耐性乳癌の機序解明とその克服の研究	----- 29
林 慎一	
5. エストロゲン受容体の蛋白分解機構の解明	----- 36
大竹 史明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 44

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究

研究代表者 三木 義男 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨

本研究では「難治性乳癌」であるTriple Negative乳癌とホルモン療法耐性Luminal乳癌を対象に、(1)エクソーム・遺伝子発現解析、(2)DNA修復経路における合成致死解析、(3)ホルモン療法耐性獲得機序の解明、の3プロジェクトを柱に、各グループが綿密な連携のもと有機的な研究体制を整備し、「難治性乳癌」の新規治療法の開発に向けた基礎研究と開発基盤の構築に取り組む。本年度は、(1)遺伝子発現解析による治療標的分子の機能解明にエクソーム解析を加え、TN乳癌関連因子の探索、新規分子標的の同定を行った。(2)我々の持つBRCA1のDNA相同組換え修復(HR)機構での機能情報、HR機構のDNA修復因子集積機序情報を基盤に、DNA損傷性薬剤に対して合成致死を来す新規遺伝子の機能不全を探索した。(3)新規耐性機序や低分子リガンド依存的なarylhydrocarbon受容体(AhR)の活性化によるエストロゲン受容体(ER)の分解促進と機能抑制という新規作用機序に基づくER機能阻害戦略に取り組んだ。その結果、難治性乳癌治療法の研究基盤構築に重要な複数の新規知見を同定した。

研究分担者氏名	所属研究機関名及び所属研究機関における職名
片桐 豊雅	徳島大学・教授
太田 智彦	聖マリアンナ医科大学・教授
中田 慎一郎	大阪大学・独立准教授
林 慎一	東北大学・教授
大竹 史明	国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

A. 研究目的

本研究では「難治性乳癌」である Triple Negative (TN)乳癌とホルモン療法耐性 Luminal 乳癌を対象として、

1. エクソーム・遺伝子発現情報解析（三木・片桐）
2. DNA 修復経路における合成致死解析（太田・中田）
3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明（林・大竹）

の3プロジェクトを柱に新規治療法の開発に取り組む。

1. TN乳癌は生物学的悪性度が高く、予後不良である。分担者片桐はこれまでの遺伝子発現情報解析による治療標的分子の同定とその機能解明にエクソーム解析を加え、さらに後述機能研究と連携してTN乳癌の発症・進展・感受性関連因子群を同定する。
2. PARP阻害剤がBRCA1/2変異乳癌に著効したことからDNA修復経路の補完し合う2因子の機能抑制による合成致死という概念が浮上してきた。分担者太田はBRCA1がユビキチンリガーゼであることを発見し、DNA相同組換え修復(HR)機構に関わるBRCA1機能を解析した。分担者中田はHR機構のDNA損傷部位への修復因子集積機序を研究し、OTUB1を同定した。合成致死という概念を基盤にこれらの知見を展開し、DNA損傷性薬剤に対して合成致死を来す新たな遺伝子の機能不全を探索し治療に応用する。
3. Luminal乳癌はホルモン療法が奏効するが、進行・再発例は耐性を獲得し難治性となる。分担者林は耐性と乳癌幹細胞性との関係を見出し、新規耐性機序の解明を目指す。分担者大竹は、低分子リガンド依存的なArylhydrocarbon受容体(AhR)の活性化によるエストロゲン受容体(ER)蛋白の分解促進と機能抑制という新規作用機序に基づく新たなER機能阻害戦略に取り組む。

本研究では、難治性乳癌に対しエクソーム解析、合成致死解析と新規ER機能阻害

戦略により多角的かつ系統的に新規治療法の開発に取り組む点の特記すべき特色である。また、合成致死という概念に基づいた治療法開発は、先行研究として系統的な解析基盤の構築および候補分子の選定が進んでいる点で我々は優位性を有する。AhRリガンドによるER蛋白分解制御という新規の作用機序に基づく新たなER機能阻害戦略は本提案のみの独創的な計画である。

B. 研究方法

1. エクソーム・遺伝子発現情報解析

本年度はトリプルネガティブ乳癌(TNBC)臨床検体を用いた次世代シーケンサー(NGS)によるエクソーム解析を行い、さらに、TNBC48症例・正常乳腺組織13例を対象に、マイクロダイセクション法およびDNAマイアレイによるTNBC・正常乳管の網羅的遺伝子発現情報解析を行った。次いで、生命維持に重要な心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的遺伝子発現情報との比較から、TNBCにおいて高頻度の発現亢進し、正常臓器では発現を認めない「癌特異的分子」を同定した。その中の候補遺伝子のTNBC細胞の増殖における重要性を証明した。

2. DNA修復経路における合成致死解析

- 1) 合成致死性を生じる薬剤と遺伝子の組合せを同定するためのスクリーニング

BARD1との結合および蛋白質の安定性を維持したままE3活性だけを死活させる変異体であるV26A変異を導入したBRCA1をノックインしたDT40細胞にCPT-11, PARP阻害剤およびマイトマイシンCを加え、細胞の

感受性を解析した。またこの際の DNA 相同組換え能を Sister Chromatid Exchange (SCE)法、Chk1 のリン酸化と Claspin のユビキチン化およびクロマチンへの誘導をウェスタンブロットにて解析した。PLK1 による BRCA1 の E3 活性の阻害は *in vivo* における BRCA1 の自己ユビキチン化を指標として PLK1 の一過性過剰発現および PLK1 阻害剤の効果で解析した。20 種類の細胞株の PLK1 発現をウェスタンブロットにて解析し、PLK1 高発現および低発現群に分け、CPT-11, PARP 阻害剤、マイトマイシン C およびシスプラチンに対する感受性を IC50 にて解析した。代表的な細胞を選び、ヌードマウスの皮下腫瘍を作成し、*in vivo* における感受性の解析を行った。PLK1 高発現細胞においては shRNA による発現抑制、PLK1 低発現細胞においてはトランスフェクションによる PLK1 一過性過剰発現が化学療法剤の感受性に与える影響を解析した。プロモーターメチル化解析では過去に術前化学療法を行った原発性乳癌症例の治療前針生検検体のパラフィン包埋ホルマリン固定切片よりマイクロダイセクション法にて乳癌部分を取り出し、DNA を抽出し、bisulfite 処理した後、培養細胞株 20 種類を用いた予備実験にて有効性が確認されたプライマーを用いて上記 16 の相同組換え遺伝子のプロモーター領域の pyrosequencing を行った。

2) 合成致死性の鍵となる相同組換え修復に関連する新規分子を同定

siRNA を用いて BRCA1 および

53BP1 の発現を抑制した細胞を難治性乳癌のモデルとした。この細胞からさらに E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 の発現を抑制し、相同組換え修復に至るシグナリングおよび相同組換え修復効率を解析した。シグナリングの解析には、RAD51 および RPA の DNA 損傷部位への集積を蛍光免疫染色法により検出する手法を採用した。相同組換え修復効率の測定には direct-repeat GFP assay 法を採用し、フローサイトメトリーにより解析を行った。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) ホルモン療法治療（特にアロマターゼ阻害剤治療）後の乳癌進行・再発症例の臨床検体十数例から調製した乳癌初代培養細胞に ERE-GFP 導入アデノウイルスを感染させ、その蛍光を定量して ER の活性を解析した。また各種薬剤に対する感受性を同様の手法で評価し、実際に臨床で存在するホルモン療法耐性乳癌のエストロゲンシグナル経路を解析し、その機序を推察した。
- 2) このデータを参考にしながら、理論的に考えられる耐性機序のすべての仮説について、それら各々を模倣する複数のアロマターゼ阻害剤耐性モデル乳癌細胞株を樹立し、それらの細胞内のエストロゲンシグナル経路、リン酸化シグナル経路について詳細に解析し、耐性増殖の原因となっている理由を明らかにした。さらに見出された機序の乳癌症例が実際に存在することも 10 例の再発乳癌臨床検体を用いた Real-time RT-PCR 解析や免疫染色法により確認した。その他の関連する研

究として、

- 3) ER 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、ER 活性がタキサンの効果を減弱させることを MCF-7 細胞と SKBR3細胞を用いた in vitro の研究からと術前化学療法の検体の ER 活性と治療効果との比較をした研究からの両面から明らかにした。
- 4) ホルモン療法剤の代表であるタモキシフェンに対する耐性株において癌幹細胞性(spheroid 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現)が高まっていることを見出した。
- 5) AhR 依存的な ER 蛋白分解促進機構を解析するため、蛋白量測定および遺伝子発現定量解析を行った。ER 蛋白分解促進因子探索の中でも、特異的リガンドを探索することとし、検討を行った。遺伝子発現解析のために、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞に、AhR リガンドとして知られている薬剤である Indirubin,

Indigo, 3,3'-diindolylmethane (DIM) などを添加し、4-6 時間後に細胞を回収した。

定量 PCR は ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems)を用いた。細胞個数当たりの mRNA コピー数の絶対定量化のため、先行研究(Kanno J, et al., BMC Genomics, 2006)の方法に従い、DNA 含量に応じて設定された量の外来性 Spike RNA(Bacillus 由来 RNA5 種)を添加することで、遺伝子発現量を測定した。蛋白質発現解析のため、MCF-7 細胞に薬剤を添加し、3-6 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液は Western blotting 法により、抗 ER- α 抗体、抗 AhR 抗体、抗 β -Actin 抗体を用いて検出した。ER 蛋白分解と AhR 転写活性能との比較のため、上記の定量値をリガンド種ごとにプロットし、両者機能が乖離する条件を見出した。

(以上、図1参照)

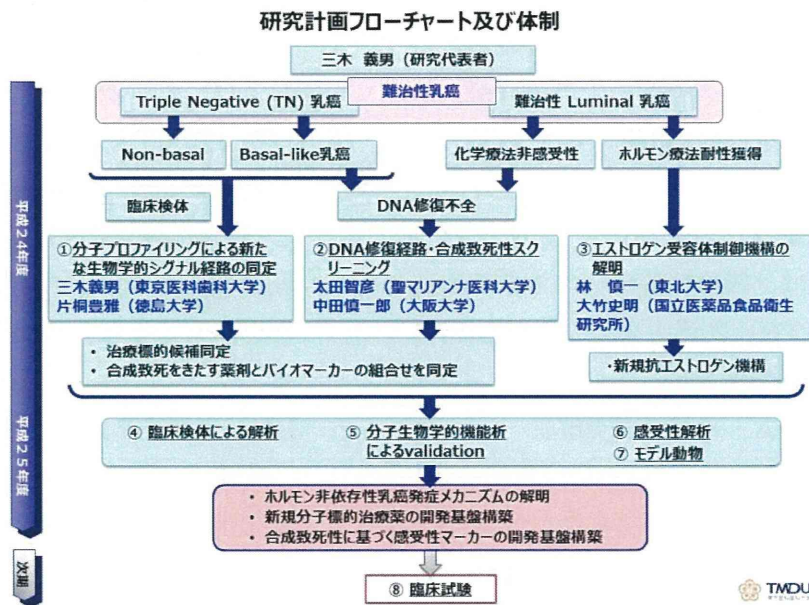


図1

(倫理面への配慮)

● 倫理的問題に関する対策

臨床検体を用いた研究、臨床試験については代表者及び分担、協力者各自の所属する施設の生命倫理委員会にて、社会的コンセンサス、個人情報取り扱い、安全対策に対する取り組みなど当該研究施設の規準を遵守した研究実施に関して十分に審議を受け承認された上で行った。被験者の検体、情報を病院外に出すことはない。院内でデータを取り扱う者は全て法的に守秘義務を課せられた者が行った。データを分担研究者間で共有する場合は各施設に個人情報管理者をおいた。結果が学会や科学誌などで公的に発表される場合には、名前や個人を識別できる情報は一切公表せず、プライバシーは保護される。利益相反状態にある研究者がいた場合にはこれを開示した。

● 遺伝子組換え実験および動物実験等に関する対策

遺伝子組み換え生物等の実験および動物実験は当該施設の管理下に研究課題の申請を行い、承認を受けて行った。

C. 研究結果

本研究では「難治性乳癌」である Triple Negative (TN) 乳癌とホルモン療法耐性 Luminal 乳癌を対象に、

1. エクソーム・遺伝子発現解析
 2. DNA 修復経路における合成致死解析
 3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明
- の3種のサブテーマを柱に、各グループが綿密な連携のもと有機的な研究体制を整備し、「難治性乳癌」の新規治療法の開発に向

けた基礎研究と開発基盤の構築に取り組んだ。

1. エクソーム・遺伝子発現解析

トリプルネガティブ乳癌(TN 乳癌) 12 症例を対象とした次世代シーケンサー(NGS)によるエクソーム解析を行い、複数の症例に共通して、TP53, BRCA1, BRCA2, PIK3CA, NF1 において、既報と同様に、体細胞変異を同定し、また、癌抑制遺伝子としての機能を有する遺伝子 BCMG1 及び、メチル化抑制遺伝子としての報告のある遺伝子 BCMG2 において複数の TNBC 症例にて新たな体細胞変異を同定した。さらに、TN 乳がん 48 症例の網羅的遺伝子解析により、TN 乳癌に共通して発現亢進を認め、正常臓器では発現の極めて低く、TN 乳癌の細胞増殖に重要な役割に担う細胞周期関連遺伝子 ASPM・CENPK を同定した。これらの遺伝子は、多様性を認める TN 乳癌の性質を規定する遺伝子である可能性があり、さらなる症例による変異検索およびこれら遺伝子の詳細な機能解析(相互作用分子の同定、細胞周期制御)を通じたこれら癌特異的分子を標的とした治療薬の開発は、難治性である TN 乳癌の新たな治療の提供および選択基準を与えることにつながると考えられる。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

乳癌の DNA 修復経路における合成致死性を生じる薬剤と遺伝子の組合せの解析を進めた。その結果、BRCA1 のユビキチンリガーゼ (E3) 活性は DNA 鎖間架橋形成の修復には必要な

いが、トポイソメラーゼ阻害剤 CPT-11 と PARP 阻害剤に起因する DNA 損傷の修復には必要であることが明らかとなった。その分子生物学的機構として CPT-11 や PARP 阻害剤に起因する DNA 損傷特異的に、BRCA1 が Claspin をポリユビキチン化してクロマチンへ誘導することが ATR による Chk1 のリン酸化と相同組換え修復に必須であることを解明した。さらに、PLK1 が BRCA1 の E3 活性を抑制し、PLK1 過剰発現がん細胞が CPT-11 と PARP 阻害剤に高感受性であるが、DNA 鎖間架橋形成剤であるマイトマイシン C やシスプラチンに対しては感受性が低いことを明らかにした。

一方、原発性乳癌 60 例について相同組換え修復遺伝子 BRCA1, BRCA2, BARD1, MDC1, RNF8, RNF168, UBC13, ABRA1, PALB2, RAD50, RAD51, RAD51C, MRE11, NBS1, CtIP および ATM のプロモーターメチル化を bisulfite-pyrosequence 法にて定量的に解析した結果、BRCA1 と RNF8 のメチル化はトリプルネガティブ (TN) 乳癌に有意に高頻度に起こり、また、BRCA1 のメチル化はアントラサイクリン系薬剤とドセタキセルを用いた術前化学療法にて病理学的完全寛解をきたす TN 乳癌で高い傾向を示した。逆に RNF8 のメチル化は TN 乳癌で有意に低頻度であった。

DNA 修復経路における合成致死解析のテーマのうち、本年度は DNA 修復経路合成致死性因子の同定と機能解明を目標としていた。

Poly(ADP-ribose)polymerase-1

(PARP1)阻害剤により発生する DNA 損傷は、相同組換えにより修復される。BRCA1 あるいは BRCA2 欠損乳癌細胞では、BRCA1・BRCA2 に依存した相同組換え修復が行われないため、PARP-1 阻害剤に感受性を示す。しかし、53BP1 が欠損すると BRCA1 非依存性に相同組換え修復がおこるため、53BP1 の発現が低い BRCA1 変異乳癌は化学療法に抵抗性を示すと予想されている。また、乳癌の臨床サンプルにおいて、53BP1 の低下と治療抵抗性との相関関係が示されている。そこで我々は、BRCA1 変異-53BP1 発現低下細胞における相同組換え修復を抑制することができれば、このような型の乳癌を新たな合成致死性により治療できるのではないかと考え、研究を進めた。siRNA を用いて BRCA1 と 53BP1 を同時にノックダウンし、これを難治性乳癌のモデルとした。本モデルにおいて、DNA 損傷部位におけるユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 の発現を抑制することで相同組換え修復が抑制できることを見いだした。難治性乳癌モデルに限らず、相同組換え修復は合成致死性の観点で、重要な DNA 修復系である。本研究においては、DNA 損傷応答におけるユビキチン化に着目し、RNF8 の他に相同組換え修復を抑制する新規分子を同定しつつある。これらの分子の発見を利用し、平成 25 年度の研究目標である培養細胞による候補因子の合成致死性の立証を進めていくことが可能となった。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

ホルモン療法耐性機序解明に向けて、

- 1) 十数例のホルモン療法治療後再発症例の検体について **ERE-GFP** ウイルスアッセイを行い、その **ER** 活性が高いものからほとんど見られないものまで多様であること、抗エストロゲン剤に対する感受性も様々であることを確認した。
- 2) そこで考えられる機序を想定して、エストロゲン応答性 **GFP** を安定導入した **Luminal** 型乳癌培養細胞株 (**MCF-7-E10,T47D-TE8**)を親株として **GFP** を指標に合計 5 種類 (**Type 1** ~ **Type 5**)の機序の異なるホルモン療法耐性 (アロマターゼ阻害剤耐性) 細胞株を樹立した。さらにこれらの耐性株を用いて順次その耐性機序について解析を進めた。**Type 1** 細胞は **ER** を過剰発現し、**ER** タンパクのリン酸化により恒常的に活性化していること、**Type 2** 細胞は **ER** 発現が低下して、活性も失っており、何らかの他の手段によって生存を維持していることが示唆された。特徴的なものとして特異的 **JNK** の活性化が観察された (論文投稿中)。**Type 4** 細胞についてはこれまでに報告されていないステロイド代謝経路変化 (**3 β HSD1** の発現上昇)とステロイド感受性の変化(アンドロゲン受容体の低下)とを原因とする新規の機序であることを見出した。さらにこのような機序の乳癌症例が実際に存在することも再発乳癌臨床検体を用いて確認した (論文投稿中)。
- 3) **ER** 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、**ER** 活性がタキサンの効果を減弱させることを **in vivo, in vitro** の両面から明らかにした。
- 4) ホルモン療法剤の代表であるタモキシフェンに対する耐性株において癌幹細胞性(**spheroid** 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現)が高まっていることを見出した。
- 5) エストロゲン受容体 (**ER**) 機能は乳癌の増悪因子であり、乳癌克服に向けて重要な分子標的の一つと考えられる。そこで、**ER** の蛋白質分解機構を解析し、新規な機能阻害戦略の基盤解明に取り組んだ。中でも **Arylhydrocarbon receptor (AhR)** 依存的な **ER** 蛋白質分解の促進に着目してその分子機構の解析を行った。**AhR** による **ER** 蛋白質分解を選択的に促進する因子の探索の中で、本年度は特異的リガンドの探索を行った。そのために、定量的な遺伝子発現解析、蛋白質発現解析および遺伝子発現絶対定量測定を遂行した。その結果、ある種の **AhR** 部分アンタゴニストが **ER** 蛋白質分解活性においてはアゴニストとして機能し、**ER** 蛋白質分解を選択的に促進することを見出した。**AhR** 標的遺伝子である **CYP1A1** を指標とした検討の結果、**3,3'-diindolylmethane (DIM)** は **AhR** の転写活性をほとんど活性化しない用量において **ER** 蛋白質分解を促進することを見出し、両者分子機能に明確な乖離が見られた。本成果は、**AhR** 依存的な **ER** 蛋白質分解機構の一端を明らかにした。

D. 考察

1. エクソーム・遺伝子発現解析

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)の患者は、内分泌療法や抗 HER2 薬が不応であることから、新規治療法の開発は喫緊の課題である。本年度、TNBC 検体を用いた NGS 解析及び網羅的遺伝子発現解析を通じて、TNBC 細胞増殖に重要である TNBC 関連候補遺伝子を複数同定した。これらのうち、BCMG1 とメチル化抑制機能を有する BCMG2 遺伝子は、これまでに TNBC を含む乳癌における体細胞変異は報告されておらず、新規の癌抑制遺伝子の可能性が示唆された。今後、TNBC への癌化機構への関与検討する計画である。さらに、網羅的遺伝子発現情報解析にて同定した癌特異的分子で、細胞周期制御関連遺伝子である ASPM と CENP 遺伝子の機能解析を通じ、副作用の少ない新規分子標的薬の開発につながるができる。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

家族性乳癌あるいは卵巣癌をきたす BRCA1 変異の中には蛋白質の安定性を保持したまま E3 活性を失う変異があり、また散発性乳癌の中にも BRCA1 の E3 活性が低下したものと考えられる。本研究結果からこのような癌には CPT-11 と PARP 阻害剤が奏功する可能性があり、感受性のバイオマーカーとして有用である。さらに、PLK1 は乳癌、卵巣癌に限らず、消化器癌を含む多くの癌で過剰発現しており、すでに臨床でも予後不良のマーカーとして重要であるが、本研究結果か

ら、PLK1 は予後不良だけではなく、CPT-11 および PARP 阻害剤に対する感受性のバイオマーカーになり得ることが示唆され、薬剤選択の上で臨床的に重要な役割を果たす可能性をもつ。一方、プロモーターメチル化解析の結果から BRCA1 および RNF8 のメチル化がトリプルネガティブ乳癌において化学療法感受性のバイオマーカーになり得ることが示唆された。

また、本研究では、合成致死性の観点から、DNA 損傷修復に関わる新規薬剤標的を発見し検証することを目標としている。本年度の成果により、標的となる可能性がある分子を2つ（一つは BRCA1 非存在下、一つは BRCA1 存在下）同定しつつある。今後、相同組換え修復においてこれらの分子が担う機能の解析をすするとともに、実際にこれらの分子の発現を抑制した場合に細胞の合成致死性や DNA 障害性薬剤に対する感受性が上昇するかについて検証を進めていく。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

今回の検討により、従来報告されている ER のリン酸化による恒常的活性化のほかに、アンドロゲン代謝産物による ER 活性化や JNK 経路などの ER 非依存性経路の関与などの、複数の新たな耐性機序の発見は、臨床において経験する個々の乳癌患者の各種治療に対する反応性の多様性と良く対応し、進行・再発乳癌の克服、特に、有効な2次治療の薬剤選択の指標を提供する。また、今後、これらの5種の耐性モデル細胞を用いた、in vitro や

xenograft の実験系によって進行再発乳癌の新規治療法開発が可能になることが期待される。さらにこれらの耐性機序を識別するバイオマーカーを明らかにすることによって、乳癌患者のさらなる個別化を可能にし、無駄な医療の回避、医療費の軽減にも繋がると思われる。また、本成果は、乳癌標的としての ER 機能抑制において、AhR の蛋白分解促進能のみを選択的に活性化させることによる ER 機能阻害戦略の有効性を示唆するものと考えられる。すなわち、AhR による転写活性は CYP1A1, CYP1B1 などの薬物代謝酵素の遺伝子発現を誘導し、酸化ストレスをはじめとした有害作用を仲介すると考えられている。このような遺伝子発現誘導を伴うことなく ER 蛋白分解のみを活性化することで副作用の少ない ER 機能阻害が可能になることから、特異的リガンドによる ER 蛋白分解制御は有効な ER 機能阻害戦略となる可能性が考えられる。従って、本成果は将来的には ER 機能阻害戦略の分子基盤として、今後の活用が期待できる。加えて、本成果は、ER 蛋白分解促進機構の基礎的な分子機構解明のためのモデル系を提供する。蛋白分解特異的リガンドを用いることで、今後、蛋白分解機構に特化した解析が可能となる。

これらの成果は、画期的な治療法開発に繋がることが期待され、厚生労働行政において喫緊の課題である「がん難民」の救済に大きく貢献するとともに無駄な医療の回避、医療費の軽減にも繋がり、国民の保健医療に関する行

政施策にも活用され得るものである。

E. 結論

1. エクソーム・遺伝子発現解析

1) 新たに TN 乳癌 48 例の網羅的遺伝子発現解析を行い、TN 乳癌発現亢進遺伝子としてがん抑制機能を有する 1 つの細胞周期関連遺伝子を同定した。

2) TN 乳癌 12 症例を対象にエクソーム解析を行い、複数症例に *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *NF1* の体細胞変異、および体細胞変異を有する TN 乳癌の新規関連遺伝子を同定した。

2. 合成致死性を生じる薬剤と遺伝子の組合せをスクリーニング

1) *BRCA1* の E3 活性が、トポイソメラーゼ阻害剤 CPT-11 と PARP 阻害剤に起因する DNA 損傷の修復に必要なであることを明らかにした。さらに、*PLK1* が *BRCA1* の E3 活性を抑制し、*PLK1* 過剰発現がん細胞が CPT-11 と PARP 阻害剤に高感受性であることを示した。

2) 相同組換え修復 (HR) 異常の乳癌は PARP 阻害剤が有効で、HR が機能する basal like 乳癌は治療抵抗性である。そこで、分子標的候補として HR 促進分子の同定を試み、DNA 損傷応答への関与が未知であった新規 HR 促進分子を同定し、さらにこの抑制により HR 抑制因子が DNA 損傷部位に集積、HR が抑制されることを確認した。

3) DNA 損傷修復以外にも、中心体制御・細胞質分裂制御において同定した *BRCA2* 関連分子を対象に合成致死スクリーニングを進め、1 つの S 期中心小体連結因子と *BRCA2* のダブルノック

クダウンが単独ノックダウンに比べ高度の細胞死を誘導し、合成致死性の新規分子標的候補であることを見出した。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

1) エストロゲン応答性 GFP の安定導入乳癌細胞株を親株とし、ホルモン療法耐性株 5 種(Type 1-5)を樹立。Type 4 において、ステロイドの代謝経路変化・感受性変化(3βHSD1 発現上昇・アンドロゲン受容体低下)を原因とする新規耐性機序を見出した。また、ER 陽性乳癌の化学療法耐性は ER 活性によるタキサン効果の減弱が原因である可能性(林業績 1)、およびタモキシフェン耐性株では癌幹細胞性(spheroid 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現)が亢進していることを見出した。

2) Arylhydrocarbon 受容体 (AhR) による ER 蛋白分解の選択的促進因子、特に特異的リガンドを探索し、転写活性化を伴わず ER 蛋白分解を選択的に促進するリガンドを見出した。これは、AhR 依存的 ER 蛋白分解促進が転写活性とは独立した新規機構であることを示し、この分子機構解明の重要な手がかりとなる。

4. 分子生物学的機能解析

上記の同定された各新規分子の抗腫瘍効果、耐性機序における機能解析を進めた。

F. 健康危険情報

該当する情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y.L. and Mano, H. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 3029-34, 2013.
- 2) Iyevleva, A.G., Kuligina, E., Mitiushkina, N.V., Togo, A.V., Miki, Y. and Imyanitov, E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 131, 1049-59, 2012.
- 3) Komatsu M, Yoshimaru T, Matsuo T, Kiyotani, K, Miyoshi Y, Tanahashi T, Rokutan K, Yamaguchi R, Saito A, Miyano S, Nakamura Y, Sasa M, Shimada M, Katagiri T. Molecular features of triple negative breast cancers by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int J Oncol.* 42:478-506, 2013.
- 4) Elgazzar S, Zembutsu H, Takahashi A, Kubo M, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Katagiri T. Miki Y, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies a genetic variant in the SIAH2 locus associated with hormonal receptor-positive

- breast cancer in Japanese. *J Hum Genet.* 56:766-71, 2012.
- 5) Murase K, Yanai A, Saito M, Imamura M, Miyagawa Y, Takatsuka Y, Inoue N, Ito T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Fujimoto Y, Hatada T, Ichii S, Nishizaki T, Tomita N, Miyoshi Y. Biological characteristics of luminal subtypes in pre- and postmenopausal estrogen receptor - positive and HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer.* 2013 in press.
 - 6) Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. A DNA-Damage Selective Role for BRCA1 E3 Ligase in Claspin Ubiquitylation, CHK1 Activation, and DNA Repair. *Curr Biol.* 22:1659-66, 2012.
 - 7) Nakada S, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res.* 72:4974-83, 2012.
 - 8) Tokuda, E., Seino, Y., Arakawa, A., Saito, M., Kasumi, F., Hayashi, S., and Yamaguchi, Y. Estrogen receptor- α directly regulates sensitivity to paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 133:427-36, 2012.
 - 9) Kataoka, M., Yamaguchi, Y., Moriya, Y., Sawada, N., Yasuno, H., Kondoh, K., Evans, DB., Mori, K., and Hayashi, S. Antitumor activity of chemo-endocrine therapy in premenopausal and postmenopausal models with human breast cancer xenografts. *Oncology Reports.* 27:303-10, 2012.
 - 10) Takagi, K., Moriya, T., Kurosumi, M., Oka, K., Miki, Y., Ebata, A., Toshima, T., Tsunekawa, S., Takei, H., Hirakawa, H., Ishida, T., Hayashi, S., Kurebayashi, J., Sasano, H., Suzuki, T. Intratumoral estrogen concentration and expression of estrogen-induced genes in male breast carcinoma: comparison with female breast carcinoma. *Hormones and Cancer.* 4:1-11, 2012.
 - 11) Gohno, T., Seino, Y., Hanamura, T., Niwa, T., Matsumoto, M., Yaegashi, N., Oba, H., Kurosumi, M., Takei, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Individual transcription activity of estrogen receptors in primary breast cancer and its clinical significance. *Cancer Medicine,* 1:328-37, 2012.
 - 12) Suda, T., Oba, H., Takei, H., Kurosumi, M., Hayashi, S., Yamaguchi, Y. ER-activating ability of breast cancer stromal fibroblasts is regulated independently of alteration of TP53 and PTEN tumor suppressor genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428:259-63, 2012.

2. 学会発表
 - 1) 三木 義男, 中西 啓 ; BRCA2の新規機能と合成致死理論に基づく新規乳癌治療法開発の可能性. 第20回日本乳癌学会学術総会、(熊本市) 2012年6月28-30日
 - 2) 三木 義男, 中西 啓 ; Hereditary breast/ovarian cancer -New development of the molecular diagnosis and treatment- 遺伝性乳がん・卵巣がん症候群-分子診断・治療の新たな展開-. 第71回日本癌学会学術総会シンポジウム、(札幌市) 2012年9月19日-21日
 - 3) 三木 義男, 中西 啓 ; 遺伝性乳がん卵巣がんの現状 問題点と展望 遺伝性乳がん原因遺伝子BRCA2の新規機能と新たな治療法開発の試み. 第18回日本家族性腫瘍学会学術集会、(大阪市) 2012年6月15日-16日
 - 4) Katagiri T, Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Nakamura Y, Miyoshi Y, Sasa M: Regulation of estrogen-signaling in ER-positive breast cancer by tumor suppressor REA via ERAP1.15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (Kanazawa, JAPAN) 2012.11.12-15,
 - 5) 片桐豊雅、吉丸哲郎、松尾泰佑、中村祐輔、三好康雄、笹三徳: New insight into developing treatment strategies for breast cancer 第71回日本癌学会総会 (シンポジウム) (札幌) 2012.9.19-21.
 - 6) 松尾泰佑、尾野雅哉、吉丸哲郎、三好康雄、笹三徳、中村祐輔、片桐豊雅: Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a novel glycosyltransferase BCGT1 in breast cancer.第71回日本癌学会総会 (ポスター) (札幌) 2012.9.19-21.
 - 7) 吉丸哲郎、小松正人、松尾泰佑、三好康雄、笹三徳、中村祐輔、片桐豊雅、ERAP1 constitutively activates estrogen-signaling in ER-positive breast cancer by capturing intact tumor suppressor REA. 第71回日本癌学会総会 (口演) (札幌) 2012.9.19-21.
 - 8) 小松正人、吉丸哲郎、松尾泰佑、清谷一馬、三好康雄、島田光生、中村祐輔、笹三徳、片桐豊雅: Involvement of proteasome-associated gene 1(PAG1) in proliferation of triple negative breast cancer. 第71回日本癌学会総会 (口演) (札幌) 2012.9.19-21.
 - 9) 太田 智彦. 第71回日本癌学会学術総会: シンポジウム 「DNA replication and checkpoint regulated by HERC2 and BRCA1 E3 ubiquitin ligases」 2012年9月
 - 10) Ohta T. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer : シンポジウム Agent-specific cellular chemosensitivity attributed to loss of BRCA1 E3 ligase activity. 2012年11月
 - 11) Shinichiro Nakada ; RNF8 regulates BRCA1-independent RAD51 assembly at sites of DNA double-strand breaks. 第35回 日本分

- 子生物学会年会（招待講演）（福岡）
2012年12月
- 12) 中田慎一郎；RNF8によるBRCA1非依存性相同組換え制御. 日本放射線影響学会 第55回大会（招待講演）（仙台）、2012年9月
- 13) Shinichiro Nakada；Complex regulation of homologous recombination by E3 ligases. AACR/JCA Joint Conference（招待講演）（Maui、USA）2013年2月
- 14) 林慎一；Luminal型乳癌の可塑性と薬物療法感受性. 有明乳癌セミナー（東京）、2012.
- 15) 林慎一；Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. The 6th Seoul St. Mary's Breast Cancer Symposium for endocrine and targeted therapy（Seoul,Korea),2012.
- 16) 林慎一；エストロゲン応答遺伝子の新たな展開. 第85回日本内分泌学会総会（名古屋）、2012
- 17) 林慎一；アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と治療戦略の基礎. 第20回日本乳癌学会学術総会（熊本）、2012.
- 18) 林慎一；AI剤耐性機序と耐性克服の基礎. 第7回中国 Breast Cancer Workshop（岡山）、2012.
- 19) 林慎一；アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と乳癌幹細胞. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Osaka（大阪）、2012.
- 20) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi；Individualization of Luminal-subtype Breast Cancer and Hormonal Therapy Resistance. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer(Kanazawa,Japan),2012.
- 21) 林慎一；アロマターゼ阻害剤治療後の再発メカニズムと治療の選択肢. 順天堂大学乳がん病診連携シンポジウム2012（東京）、2012.
- 22) 林慎一；アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と乳癌幹細胞. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Fukushima（福島）、2013.
- 23) 伊藤貴子、佐藤望、田澤智香、山口ゆり、森谷卓也、平川久、林慎一；癌幹細胞性によるLuminal型乳癌の新たな個別化. 第20回日本乳癌学会学術総会（熊本）、2012.
- 24) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一；Androgen シグナル抑制によるAI剤耐性機構. 第20回日本乳癌学会学術総会（熊本）、2012.
- 25) 佐藤望、伊藤貴子、田中美穂、田澤智香、森谷卓也、平川久、山口ゆり、林慎一；ホルモン療法耐性細胞と癌幹細胞性の検討. 第20回日本乳癌学会学術総会（熊本）、2012.
- 26) 樋口徹、郷野辰幸、長友隆将、堀口淳、竹吉泉、林慎一；ER遺伝子のPromoter Usage・エピゲノム制御とER陽性乳癌個別化. 第20回日本乳癌学会学術総会（熊本）、2012.
- 27) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一；乳癌腫瘍局所におけるAromatase非依存的Estrogen産生経

- 路と ER 活性の検討.第 21 回乳癌基礎研究会 (埼玉)、2012.
- 28) 須田哲司、清野祐子、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一、山口ゆり：ER 活性化能の異なる乳癌間質線維芽細胞が構築する癌微小環境の解析.第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 29) 高信純子、丹羽俊文、品川優理、郷野辰幸、山口ゆり、鈴木貴、林慎一：乳癌細胞膜型エストロゲン受容体に対するエストロゲンの配向性と ERK の活性化. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 30) 稲葉綾香、林慎一：ER 陽性乳癌におけるエストロゲン依存性の FOXC1 の発現. 第 71 回日本 癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 31) 伊藤貴子、佐藤望、田澤智香、山口ゆり、森谷卓也、平川久、林慎一：乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 32) 郷野辰幸、鈴木史彦、花村徹、清野祐子、山口ゆり、田澤智香、柳澤純、丹羽俊文、林慎一：乳癌における CHIP 遺伝子発現に関わるエピジェネティック制御機構の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 33) 山口ゆり、須田哲司、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一：乳癌幹細胞に対する癌微小環境の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 34) 樋口徹、郷野辰幸、長友隆将、丹羽俊文、堀口淳、竹吉泉、林慎一：乳癌におけるエストロゲンレセプター(ER) α 遺伝子の promoter usage の意義. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 35) 長友隆将、郷野辰幸、樋口徹、丹羽俊文、林慎一：ホルモン療法耐性乳癌細胞におけるエストロゲンレセプターの発現低下とそのエピゲノム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 36) 佐藤望、伊藤貴子、田中美穂、田澤智香、山口ゆり、林慎一：各種乳癌細胞株の癌幹細胞性の検討とサブタイプの可塑性. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
- 37) Takako, Ito., Nozomi, Sato., Chika, Tazawa., Yuri, Yamaguchi., Takuya, Moriya., Hisashi, Hirakawa., Shin-ichi, Hayashi. : Heterogeneity of Luminal-type Breast Cancer and Cancer Stemness. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 38) Yuri, Yamaguchi., Hanako, Oba., Kenichi, Inoue., Tetsuji, Suda., Yuko, Seino., Hiroyuki, Takei., Masafumi, Kurosumi., Atsushi, Mizokami., Shin-ichi, Hayashi. :Estrogen Signal-Related Heterogeneity of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Breast Cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 39) Tatsuyuki, Gohno., Fumihiko, Suzuki., Toru, Hanamura., Yuko Seino.,Yuri, Yamaguchi., Chika, Tazawa., Toshifumi, Niwa., Junn,

- Yanagisawa., Shin-ichi Hayashi. :Multiple Epigenetic Regulation Mechanism of CHIP Gene and Clinical Significance of Its Functional Re-expression Analysis in Breast Cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 40) Toshifumi, Niwa., Junko, Takanobu., Yuri, Shinagawa., Haruna Mori., Tatsuyuki, Gohno., Yuri, Yamaguchi., Takashi, Suzuki. and Shin-ichi Hayashi. :Membrane-type Estrogen Receptor in Breast Cancer Cells Activated by Specific Ligands. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 41) Toru Hanamura, Toshifumi Niwa., Sayo, Nishikawa., Hiromi, Konno., Tatsuyuki, Ghono., Yasuhito, Kobayashi., Masafumi, Kurosumi., Hiroyuki, Takei., Yuri, Yamaguchi., Ken-ichi, Ito., Shin-ichi Hayash. : The androgen metabolite-dependent growth in hormone receptor positive breast cancer as a novel aromatase inhibitor-resistance mechanism. Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio,USA),2012.
- 42) 稲葉綾香、花村徹、山口ゆり、林慎一 : 乳癌においてエストロゲンの制御を受ける FOX 遺伝子.第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

分子プロファイリングによるトリプルネガティブ乳癌関連分子の同定とその機能解析

研究分担者 片桐 豊雅 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター
ゲノム制御分野 教授

研究要旨

今や乳癌は日本女性が最も罹りやすい癌であり、一部の乳癌や進行・再発症例においては治療耐性が生じ難治性でその予後は極めて悪い。このような癌に対する対策が極めて重要で、特に、厚生労働行政において「がん難民」といわれる難治性癌患者の救済は喫緊の課題である。本研究では、難治性乳癌であるトリプルネガティブ(TN)乳癌の発症および進展メカニズムの解明、治療法の確立のため、次世代シーケンサーによるゲノム解析およびDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を組み合わせることにより、TN乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子を同定することを目的としている。さらに、それら新規遺伝子を標的とした治療薬を開発することを最終的な目標とする。

A. 研究目的

難治性乳癌のうち、エストロゲン受容体(ER)・プロゲステロン受容体(PgR)・Herの陰性であるトリプルネガティブ(TN)乳癌は生物学的悪性度が高く、上記受容体を標的とする内分泌療法では制御不能で、確立した治療法がないことから、現在その治療としてはタキサン系、アルキル化剤やプラチナ製剤などの細胞毒性化学療法が主に行われているが、これらには高い反応性を示す反面、比較的早期に転移・再発をきたす症例も多く、革新的な新規治療法の開発が切望されている。本研究は、次世代シーケンサー(NGS)による全エクソン解析とDNA

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を通じて、TN乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子を同定し、それらを標的とした新たな治療薬の開発を進めることで、厚生労働行政において「がん難民」といわれる難治性癌患者の救済に大きく貢献するとともに無駄な医療の回避、医療費の軽減に繋げ、国民の保健医療に関する行政施に活用することを目的とする。

B. 研究方法

(1) NGSによるエクソーム解析

① TN乳癌臨床検体12症例をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、組織中の

腫瘍の占有率が80%以上と高いものを選抜した(非腫瘍細胞の割合が多いと癌細胞特異的なゲノム異常の検出力が低下するため)。

- ② 12 症例ずつの乳癌細胞および正常細胞より、それぞれゲノム DNA を抽出した。
- ③ ゲノム DNA のクオリティーを詳細に確認後、NGS によりエクソーム解析を行い、乳癌細胞で特異的に起こっているゲノム異常、各症例にて共通して変異の認められる遺伝子を選別した。

(2) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

- ① 既に予後を始めとした臨床情報のある TN 乳癌 48 症例 と正常乳腺組織 13 例についてレーザーマイクロダイセクション法により乳癌細胞・正常乳管細胞のみを採取した。
- ② DNA マイクロアレイによる発現解析を行った。
- ③ 生命維持に重要な心臓・肺・肝臓・腎臓の DNA マイクロアレイ網羅的遺伝子発現情報解析を行い、乳癌の発現情報解析を合わせて、「癌特異的遺伝子」を選抜した。
- ④ RNA 干渉実験にて細胞増殖抑制効果について調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト遺伝子解析研究を含んでいる。解析対象となる乳癌患者由来の臨床検体やヒトゲノム試料等については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び同日通知の「同指針の施行等について」に基づいて、「遺伝子解析等に関する標本採取に関する同意書」を倫理委員会に提出し、

すでに承諾を受けている(「ゲノム解析による腫瘍関連遺伝子の探索」にて、徳島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に係る倫理審査会にて承認済み)。現在まで、その同意書に基づく説明を試料提供者に行い、同意を得られた症例から試料を採取し保管している。われわれは、「指針」に則り、匿名化された検体のみを用い、患者のプライバシー保護を配慮した実験計画のもとで行っている。

C. 研究結果

(1)本年度は TN 乳癌臨床 12 検体を用いた NGS によるエクソーム解析を行い、これまでの TN 乳癌におけるゲノム解析の報告と同様に、複数の TN 乳癌症例に共通して *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *NF1* 遺伝子 において高頻度に体細胞変異を認めることを確認した。また TN 乳癌の発症に関与可能性のある新規癌抑制候補遺伝子として 2 遺伝子 (BCMG1:Breast cancer mutated gene 1・BCMG2: Breast cancer mutated gene 2) にて、ともに 12 症例中 4 例にて、新たな体細胞変異を同定した(図 1)。

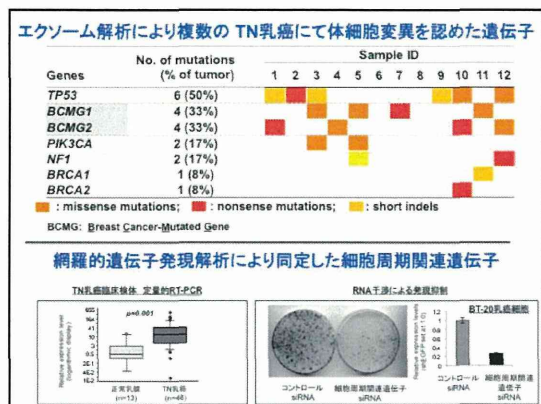


図 1

(2)DNAマイクロアレイによるTN乳癌の発現情報解析

TNBC48症例・正常乳腺組織13例を対象に、DNAマイクロアレイによるTNBC・正常乳管の網羅的遺伝子発現情報解析を行った結果、TN乳癌で発現亢進する301遺伝子、発現低下する302遺伝子を同定し発現亢進遺伝子の多くは細胞周期を正に制御する機能を、発現低下する遺伝子の多くは、細胞外基質・接着などの機能を有していた。さらに、生命維持に重要な心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的遺伝子発現情報との比較から、104個のTNBCにおいて高頻度の発現亢進し、正常臓器では発現を認めない「癌特異的分子」を、同定した。そのうち、細胞周期制御関連遺伝子*ASPM*と*CENP*遺伝子に着目した。はじめにTN乳癌臨床検体を用いた定量的RT-PCR法にてこれら遺伝子の発現を調べた結果、正常乳腺に比してTN乳癌に共通して有意に発現亢進を認めた。

続いて、TNBC培養細胞株を用いた*ASPM*、*CENPK*に対するRNA干渉法実験を行った結果、細胞周期の停止・アポトーシスが誘導されることで顕著に細胞増殖が抑制された。

D. 考察

(1)NGSによるエクソーム解析を通じて同定した*TP53*、*BRCA1*、*BRCA2*、*PIK3CA*、*NF1* 遺伝子はこれまでも欧米のTN乳癌のNGS解析にて体細胞変異が認められている遺伝子であった(Nature 2012;486:395-9)。この結果は、我々のNGS解析が高い精度で行われていることを示すものであり、また日本人のTN乳癌においても、変異の認める遺伝子が欧米と共通し

ていることを示すものである。

特に、*BCMG1* 遺伝子はキナーゼをコードし、これまでに癌抑制機能を有することが報告されていることから、今回同定した体細胞変異が*BCMG1* キナーゼ活性に影響することで、その癌抑制機能を失うことで癌化に寄与する可能性が示唆された。

(2)DNAマイクロアレイによるTN乳癌の発現情報解析を通じて、今回同定した癌特異的細胞周期関連遺伝子*ASPM*、*CENPK*は、RNA干渉実験による発現抑制により、細胞周期の停止・アポトーシス誘導による細胞増殖抑制を認めた。この結果は、*ASPM*や*CENPK*を分子標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながることを示唆するものであった。

E. 結論

本年度は、TN乳癌臨床検体を用いたエクソーム解析および網羅的発現解析によるTN乳癌関連分子の同定とその機能解析を進めた。その結果、エクソーム解析では、既報の体細胞変異を認める遺伝子および新規のTN乳癌の癌化に関与する可能性ある遺伝子の体細胞変異を同定した。さらに網羅的遺伝子発現解析により、TN乳癌に共通して発現亢進を認め、正常臓器では発現の極めて低い、癌特異的細胞周期関連遺伝子を同定した。

これらの結果は、TN乳癌の癌化、進展の分子機構の解明およびこれら癌特異的分子を標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながるものである。

F. 健康危険情報

なし