

課題番号 21

BRCA1による新規薬剤耐性機構を利用した PARP阻害剤・白金製剤の感受性予測法の開発

[1] 組織

代表者：河合 賢朗

(山形大学大学院 医学専攻
外科学第一講座)

対応者：千葉 奈津子

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

元井 冬彦 (山形大学大学院 医学専攻
外科学第一講座)

田中 喬之 (山形大学大学院 医学専攻
外科学第一講座)

研究費：物件費 20 万

[2] 研究経過

相同組み換え(Homologous recombination: HR) 修復は、DNA 二本鎖切断の修復経路である。HR 因子の異常により HR の機能不全 (HR deficiency: HRD) となった腫瘍細胞は、DNA 単鎖切断修復因子である Poly [ADP-ribose] polymerase (PARP)を標的とした PARP 阻害剤や、多くの悪性腫瘍の化学療法のキードラッグである白金製剤などの DNA 傷害性薬剤に高感受性である (図 1)。

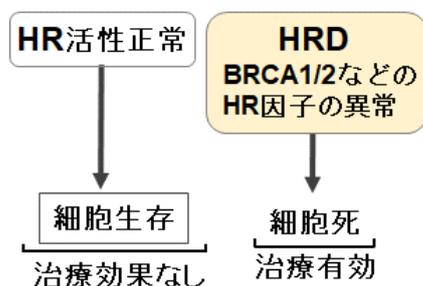


図1 PARP阻害剤・白金製剤の感受性予測

所内対応者の千葉奈津子教授らは、CRISPR/Cas9システムを用いて、簡便で定量性の高い新規 HR 活性の測定法 Assay for site-specific HR activity (ASHRA)を開発した (Yoshino and Endo et al. *Sci*

Rep 2019)。ASHRA では、まず、測定用ベクターである、ゲノム DNA を切断する Cas9/gRNA の発現ベクターと、切断部位と相同な配列と検出に必要なマーカー配列を持つドナーベクターを測定対象細胞に導入する。ゲノム DNA に生じた DNA 二本鎖切断が、ドナーベクターを使って相同組換え修復によって修復されると、マーカー配列が DNA 二本鎖切断にロックインされ、マーカー配列と内在性遺伝子との融合遺伝子が生じ、これを定量 PCR によって検出する。

ASHRA を用いて、遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因遺伝子で、重要な HR 因子である BRCA1 の多数のバリエーションの HR 活性を測定し、薬剤感受性との相関を検討することにより、BRCA1 が転写因子 Activating transcription factor 1 (ATF1) のコアクチベーターとして機能し、ATF1 高発現細胞で PARP 阻害剤・白金製剤に耐性を引き起こすという新しい薬剤耐性機構を明らかにした (図 2)。

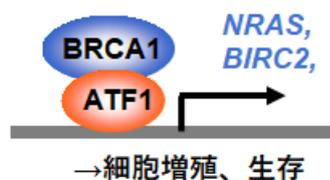


図2 新たなPARP阻害剤、白金製剤耐性機構

興味深いことに、BRCA2 などの他の HR 因子の異常による HRD の状態で、ATF1 高発現細胞はこれらの薬剤に耐性を示した。加えて、ATF1/BRCA1 の転写活性化の標的遺伝子として、NRAS、BIRC2 を明らかにした (Endo and Yoshino et al. *Cancer Res Commun* 2021)。これらにより、ATF1、ATF1/BRCA1 の下流因子が PARP 阻害剤、白金製剤の感受性を予測するバイオマーカーになることが示唆された。

本研究は、ATF1/BRCA1 による薬剤耐性の特異性を解析するとともに、ATF1/BRCA1 の標的遺伝

子として既に同定した *NRAS*、*BIRC2* に加え、さらに標的遺伝子の同定を試みる。また、これら因子のバイオマーカーとしての有用性を細胞学的に明らかにし、従来法より正確な感受性予測を可能にする PARP 阻害剤・白金製剤の感受性予測法を開発することを目的とした。

研究は、分担者である田中喬之大学院生が、研究代表者と研究の進捗状況について連絡を取り、千葉教授の研究室で主に実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

まず、ATF1/BRCA1 の転写活性化が、DNA 傷害性薬剤、代謝拮抗薬、微小管阻害剤などの他の抗がん薬の薬剤感受性に関与するかどうかの検討を行った。現在、結果の再現性を検討している。

PARP 阻害剤、白金製剤への耐性を規定する ATF1/BRCA1 の下流因子を同定し、バイオマーカーとすれば、ATF1/BRCA1 の転写活性化能に依存しないため、その高発現症例は HRD の有無に関わらず耐性と予測される。よって、この場合は高額で時間を要する HRD の検査を実施する必要がない。そこで、まず、これまでの解析で、ATF1/BRCA1 下流因子として候補としていた分子について、解析を進めたが、発現ベクターで十分な発現が得られず、解析が困難であった。タンパク質の安定性などに問題があると考え、タグを変更し、発現ベクターを作製中である。

また、RNA-seq 解析を行い、ATF1/BRCA1 下流因子の同定を試みた。候補遺伝子として、ATF1/BRCA1 の発現により、発現の上昇する分子 107 分子と低下する分子 36 分子の同定に成功した。それぞれ 3 分子ずつ選択し、既に siRNA を作製し、発現量の変化と薬剤感受性変化を検討中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

PARP 阻害剤は、HR 因子の異常により HRD となった腫瘍細胞に合成致死を引き起こす分子標的治療薬である。近年、本邦でもオラパリブ、ニラパリブが承認され、乳がん、卵巣がん、膵がん、前立腺がんで使用されている。これらの薬剤には、*BRCA1/2* 遺伝子検査や HRD スコアが感受性予測のコンパニオン診断薬として用いられている。しかし、これらによる患者層別化では耐性症例が含まれ、効果予測は不十分な状況であり、さらに詳細に患者を層別化するコンパニオン診断薬が求められている。

白金製剤は DNA 架橋剤で、シスプラチン、カルボプラチン、オキザリプラチンなどがある。従来より、肺がん、大腸がん、頭頸部がん、胃がん、卵巣がん、胆道がん、膵がん、子宮頸・体がん、原発不明がんなど多くの悪性腫瘍の化学療法におけるキードラッグで、最も使用されている抗がん薬の 1 つであり、有効性の期待できる抗がん薬でもある。しかし、耐性症例は確かに存在し、かつ腎毒性、消化器毒性などが他の抗がん剤に比較してかなり重篤であることも臨床的に問題であり、耐性症例をあらかじめ除外することは患者に大きなメリットがある。白金製剤により生じる DNA 架橋の修復には HR 経路が必要なため、PARP 阻害剤と同様、白金製剤は HRD の腫瘍に有効であることが明らかになっている。しかしながら現在のところ、効果予測には活かされていない。

本研究で開発される感受性予測法は、千葉教授らが明らかにした PARP 阻害剤・白金製剤の新たな耐性機構で機能する分子をバイオマーカーにするものであるため、現在行われている *BRCA1/2* 遺伝子検査や遺伝子パネル検査、HRD スコアで感受性と予測されてしまう症例に存在する、耐性症例を同定するものである。よって、従来法のみで層別化する方法に比べて、より精密な層別化が可能になる。

バイオマーカーとしての使用法は、ヒト組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片スライドの免疫染色を想定しており、安価な診断薬となり、安全性は問題がない。

さらに、ATF1/BRCA1 の下流因子をバイオマーカーとする場合は、ATF1/BRCA1 の転写活性化能に依存しないため、HRD の有無に関わらず耐性と予測されるため、耐性と判断された際は、高額で時間を要する *BRCA1/2* 遺伝子検査や HRD スコアによる HRD を評価するための検査を実施する必要がなく、医療コストの大きな低減になる。

よって、本研究で PARP 阻害剤・白金製剤の感受性予測診断薬が開発されれば、多くの患者がその恩恵を受けることになり、がん治療に大きく貢献できると考えられる。

[4] 成果資料

本研究は今年度から開始したものであり、成果発表は来年度からを行う予定である。