

クリプトコッカス酵母を用いた遺伝性乳癌 卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング

東京工業大学

科学技術創成研究院・細胞制御工学センター

教授 岩崎博史

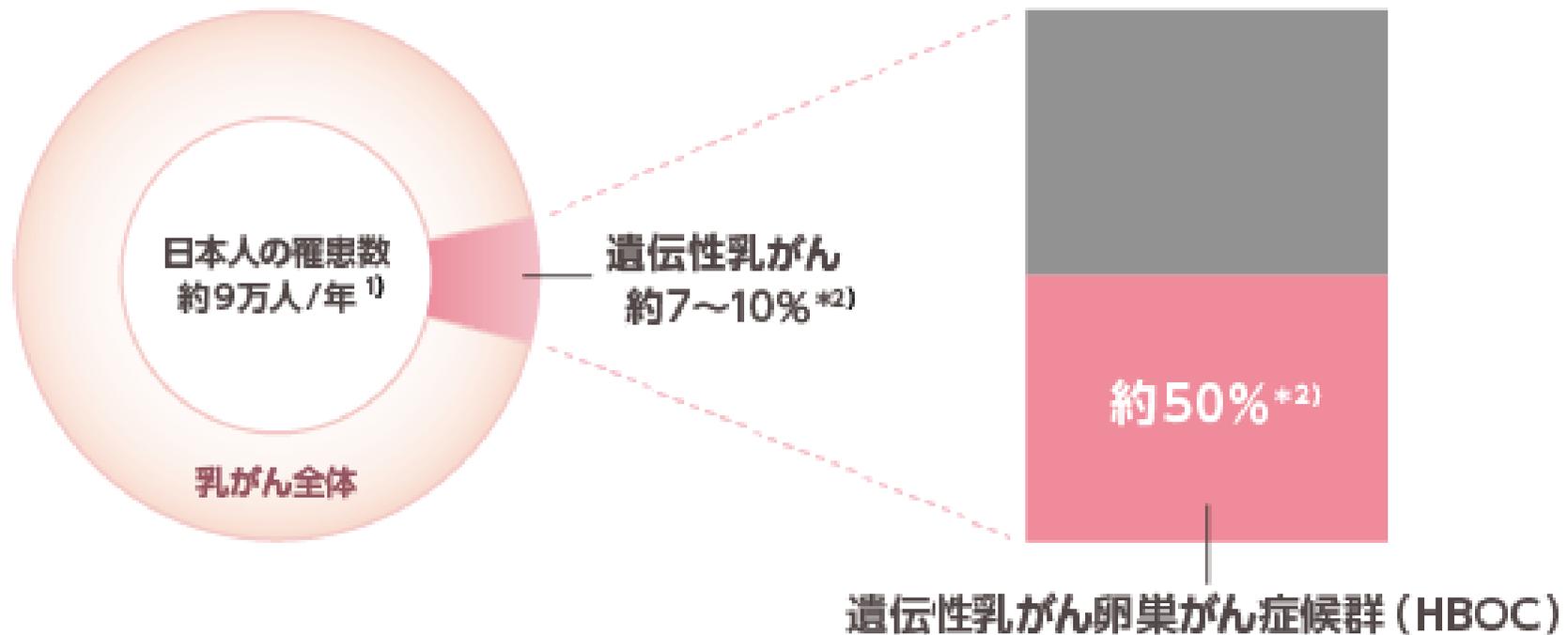
2019年11月19日

副題

モデル生物から迫る創薬

遺伝性乳癌卵巣癌症候群(HBOC)の治療薬の開発

遺伝性乳がんとHBOCの割合



* 海外での報告をもとに推定しています

- 1) 国立がん研究センター がん情報サービス「2017年のがん統計予測」
- 2) Kauff ND. Management of BRCA-Negative Hereditary Breast Cancer Families. Hereditary Breast Cancer. Isaacs C. CRC Press, New York, 2007, p311-318

<https://www.nyugan.jp/>より改変

がん発症リスク

	一般的な日本人	BRCA1変異	BRCA2変異
乳がんにかかるリスク	生涯で9% ¹⁾	70歳までに57% ²⁾	70歳までに57% ²⁾
卵巣がんにかかるリスク	生涯で1% ¹⁾	70歳までに40% ²⁾	70歳までに57% ²⁾
前立腺がんにかかるリスク	生涯で9% ¹⁾	70歳までに25% ³⁾	65歳までに～15% ⁴⁾

1) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(2013年データ)

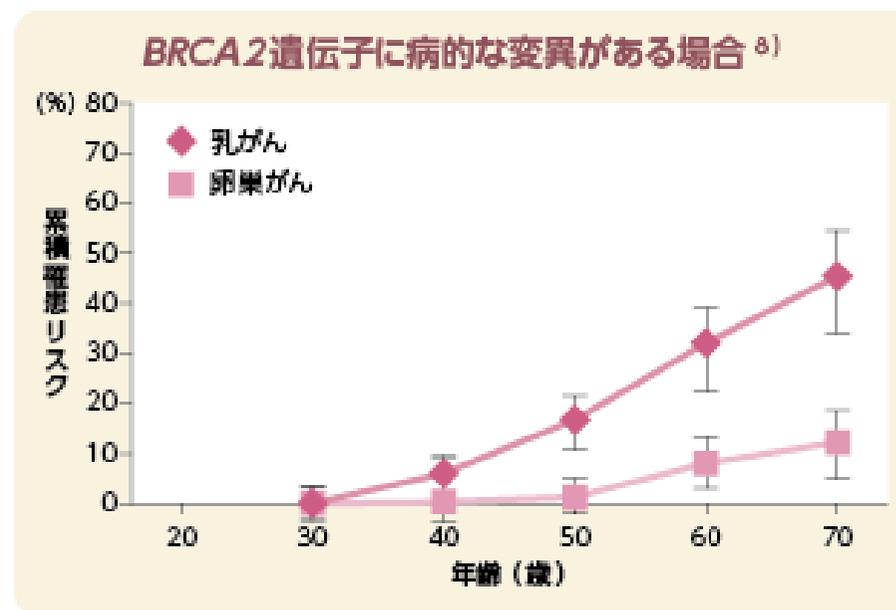
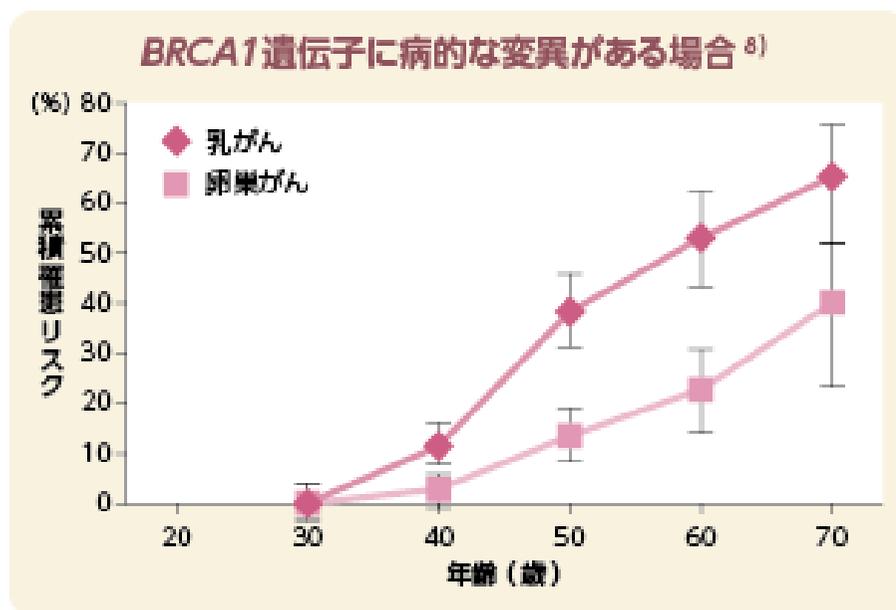
2) Chen S, et al. J Clin Oncol. 2007; 25(11): 1329-1333

3) Struwing JP, et al. N Engl J Med. 1997; 336(20): 1401-1408

4) Kote-Jarai Z, et al. Br J Cancer. 2011; 105(8): 1230-1234

<https://www.nyugan.jp/heredity/connexion.html>を改変

加齢によるHBOC発症リスクの増加



8) Antoniou A, et al. Am J Hum Genet. 2003; 72(5): 1117-1130

遺伝性乳がん・卵巣がん症候群 (HBOC) の発症機構

BRCA1 遺伝子または *BRCA2* 遺伝子の変異による。

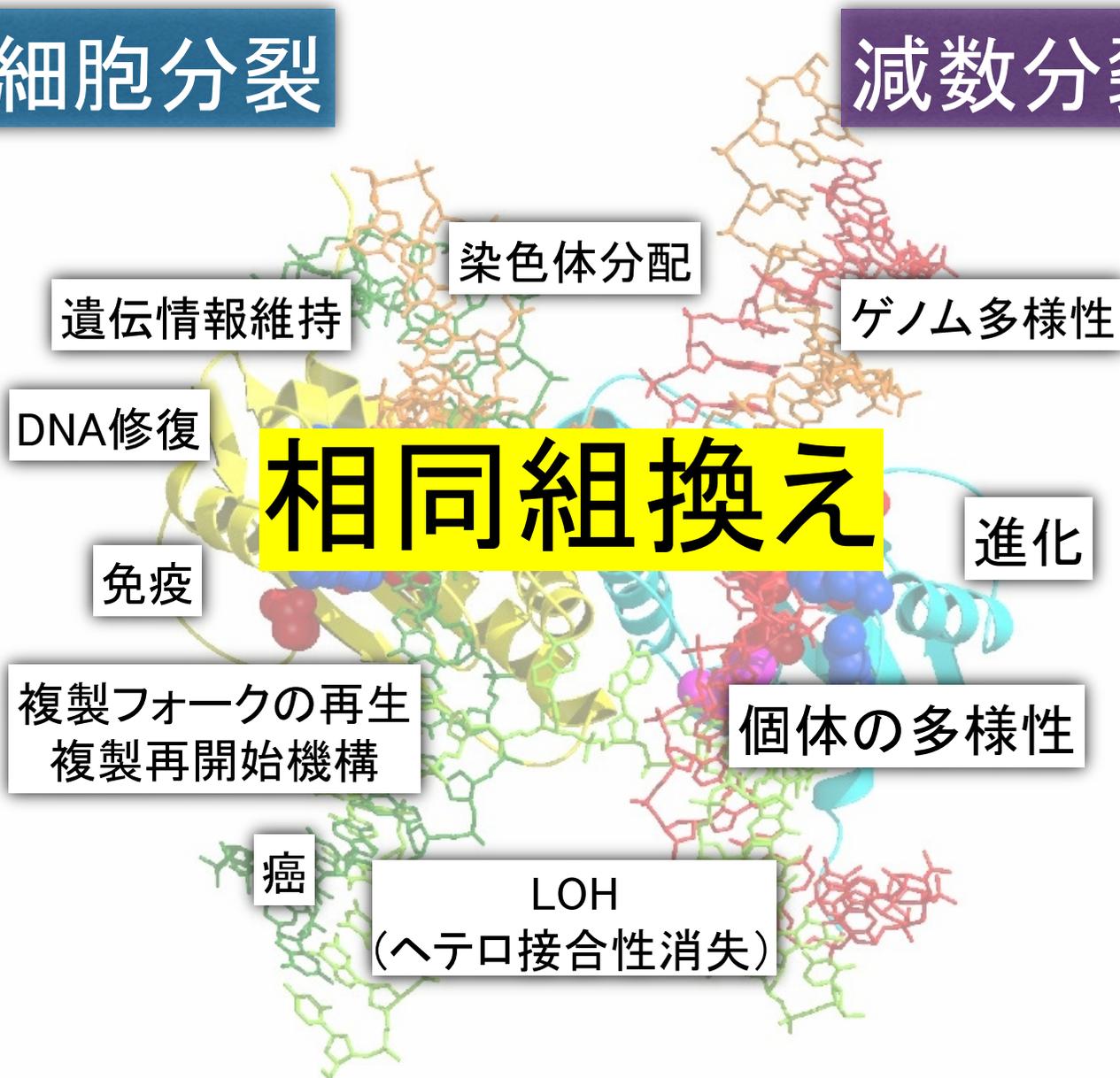
正常な *BRCA1*/*BRCA2* タンパク質は **RAD51 タンパク質** (鎖交換タンパク) の補助因子として組換え修復を助ける。

よって、*BRCA1* 遺伝子または *BRCA2* 遺伝子に突然変異がおこると、**相同組換え機構を用いた修復 (組換え修復)** が正常に機能しなくなる。

相同組換えの多彩な機能

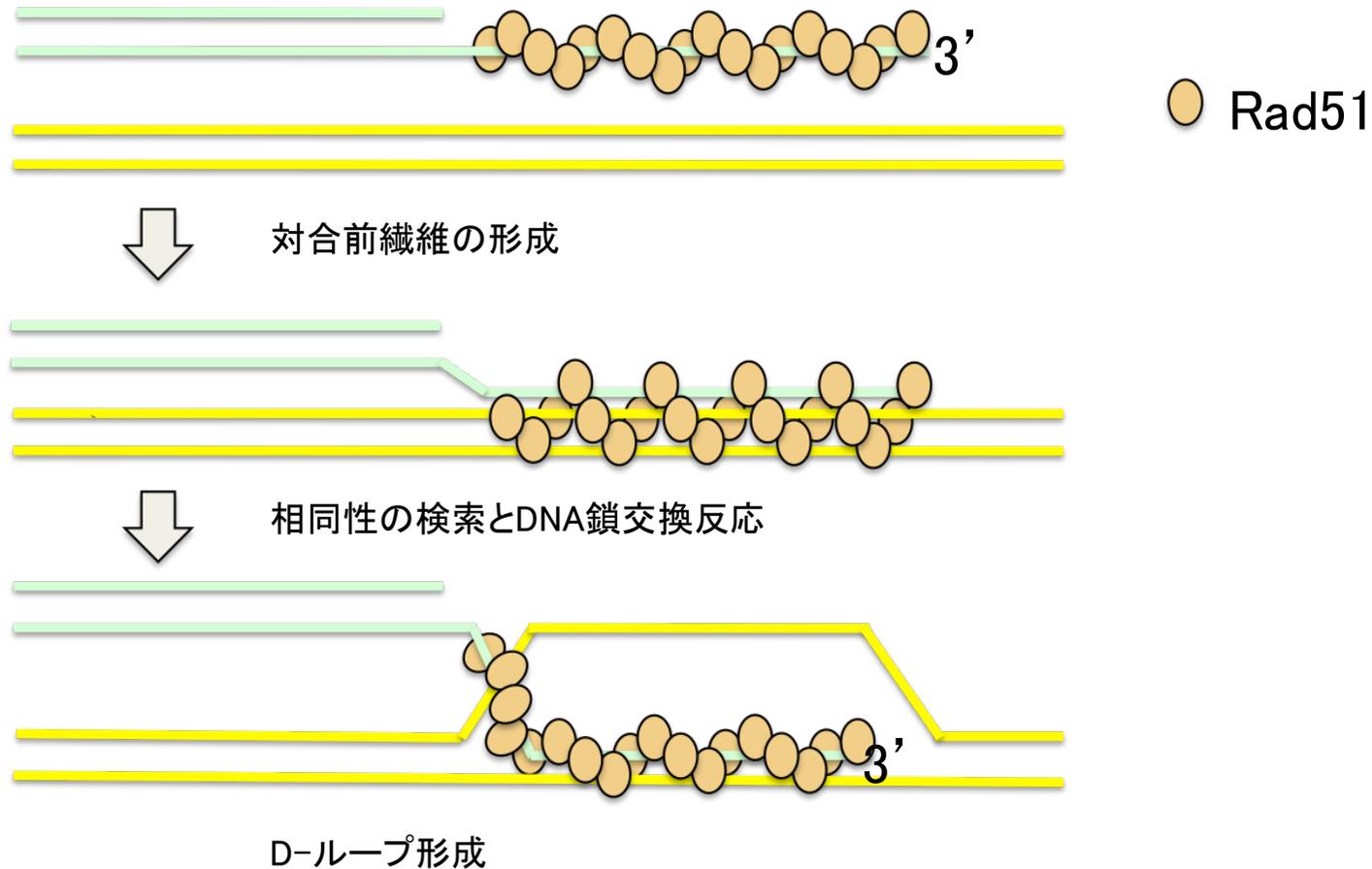
体細胞分裂

減数分裂



相同組換えの中心的な反応はRad51 タンパク質による DNA鎖交換反応である

真核生物 Rad51によるDNA鎖交換反応 のモデル



Rad51 の補助因子

ヒト	<i>S. cerevisiae</i> (出芽酵母)	<i>S. pombe</i> (分裂酵母)
Rad52	Rad52	Rad22 (spRad52)
BRCA2	–	–
RAD51C–XRCC3, Rad51B–Rad51C–XRCC3	Rad55–Rad57	Rad55–Rad57
SWS1–Rad51D–XRCC2 ^a	Shu1–Shu2–Pys3–Csm2	Sws1–Rlp1–Rdl1
Swi5–Sfr1	Sae3–Mei5 ^b	Swi5–Sfr1

^aShu1=Rlp1=XRCC2, Shu2=Sws1=SWS1,
Psy3=Rdl1=RAD51D, Csm2=?

^b減数分裂特異的 Dmc1に作用

一般に DNA代謝は生物種間で保存されている

DNA代謝（DNA複製、DNA組換え、DNA修復、突然変異誘発など）の細胞内分子機構は、生物種間で保存されている。

例えば、組換え修復で鍵となるタンパク質はRad51であるが、ヒトRad51と酵母Rad51間では75%同一のアミノ酸、類似アミノ酸を考慮すると87%が相同である。よって、酵母の基礎研究がパラダイムとしてヒトの分子機構に直接貢献し、今まで多くの知見が得られてきた。

しかし、

基礎研究に用いられる
出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) や
分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は、*BRCA* 遺
伝子を持たないため、これらの酵母で *BRCA* 遺伝子の
作用機序や *BRCA* 変異株の薬剤処理後の応答や感受
性の研究はできなかった。

我々は

1. *Cryptococcus liquefaciens* の全ゲノム配列を決定してBRCA2遺伝子を発見した。

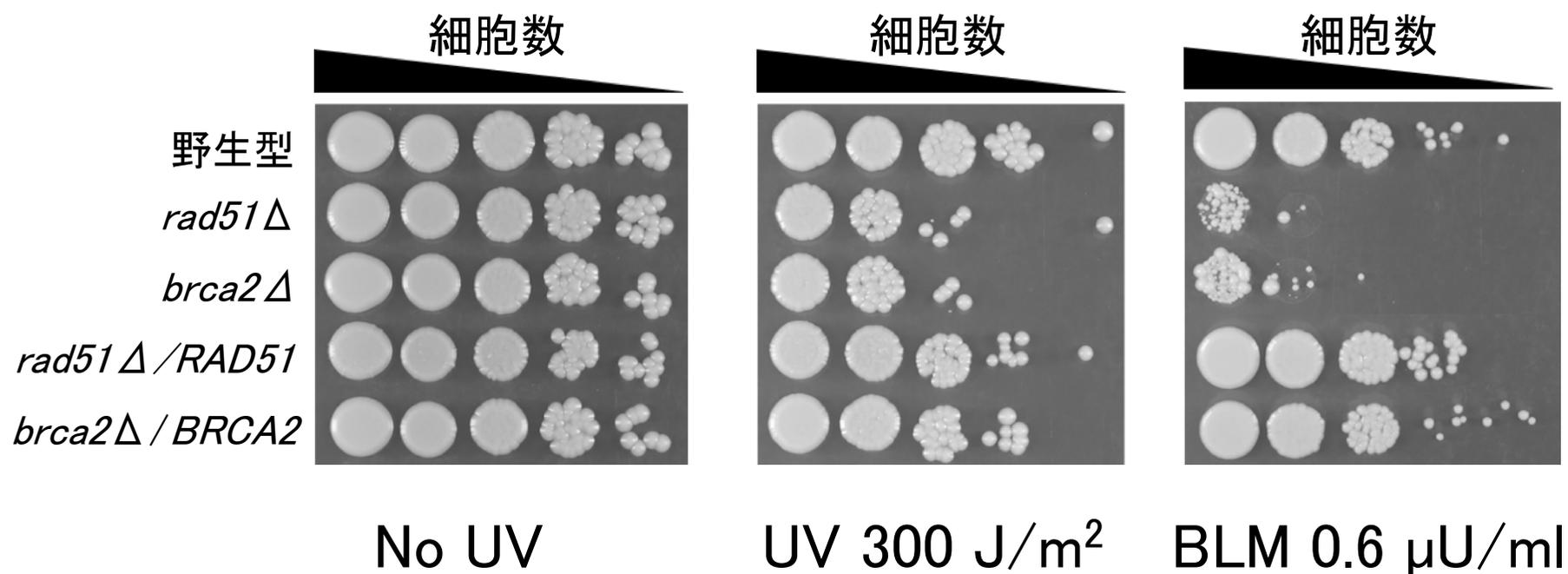
Cryptococcus liquefaciens は、担子菌類に属する酵母で、代表的なものに、日和見感染症であるクリプトコッカス症の原因菌となる*Cryptococcus neoformans*がある。

*C. liquefaciens*は病原性を持たないのでモデル生物として優れている。

2. *C. liquefaciens* 細胞への遺伝子導入法(形質転換法)と遺伝子改変法(ゲノム編集法)を確立し、*brca2*欠損株を作出した。
3. *C. liquefaciens brca2* 欠損株を用いて、HBOCの治療薬を開発する。

→特許出願済み

クリプトコッカス *BRCA2* 変異株は DNA 損傷感受性を示す



クリプトコッカス *BRCA2* 変異株は DNA 二重鎖切断修復 (≡ 組換え修復) に
欠損がある

オラパリブ

遺伝性乳がん・卵巣がん症候群(HBOC)の治療薬

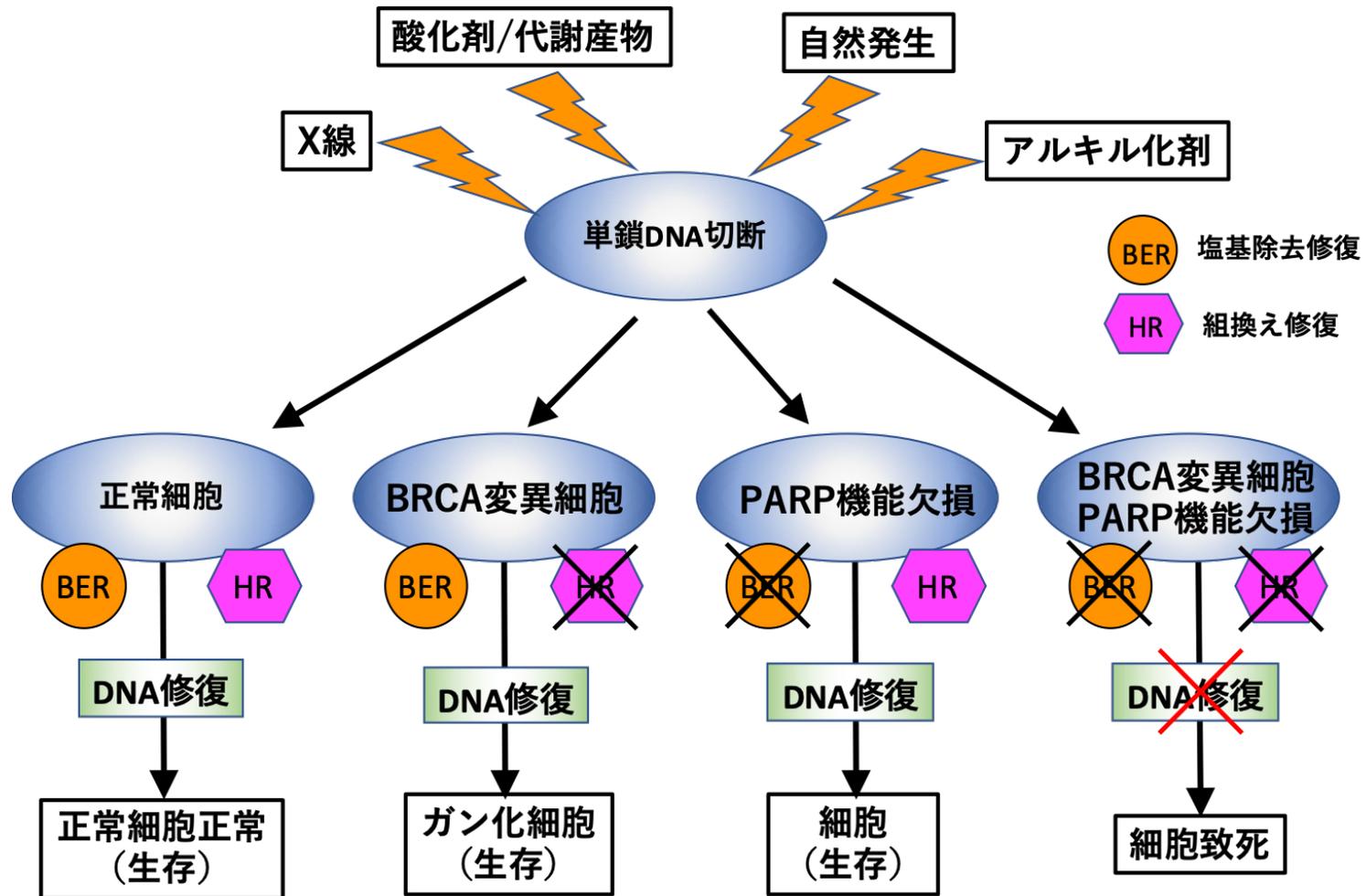
オラパリブはポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)の阻害剤

オラパリブ投与により、BRCA細胞が特異的に致死

アストラゼネカとメルク・アンド・カンパニー(日本においてはアストラゼネカ)が医薬品製造販売承認

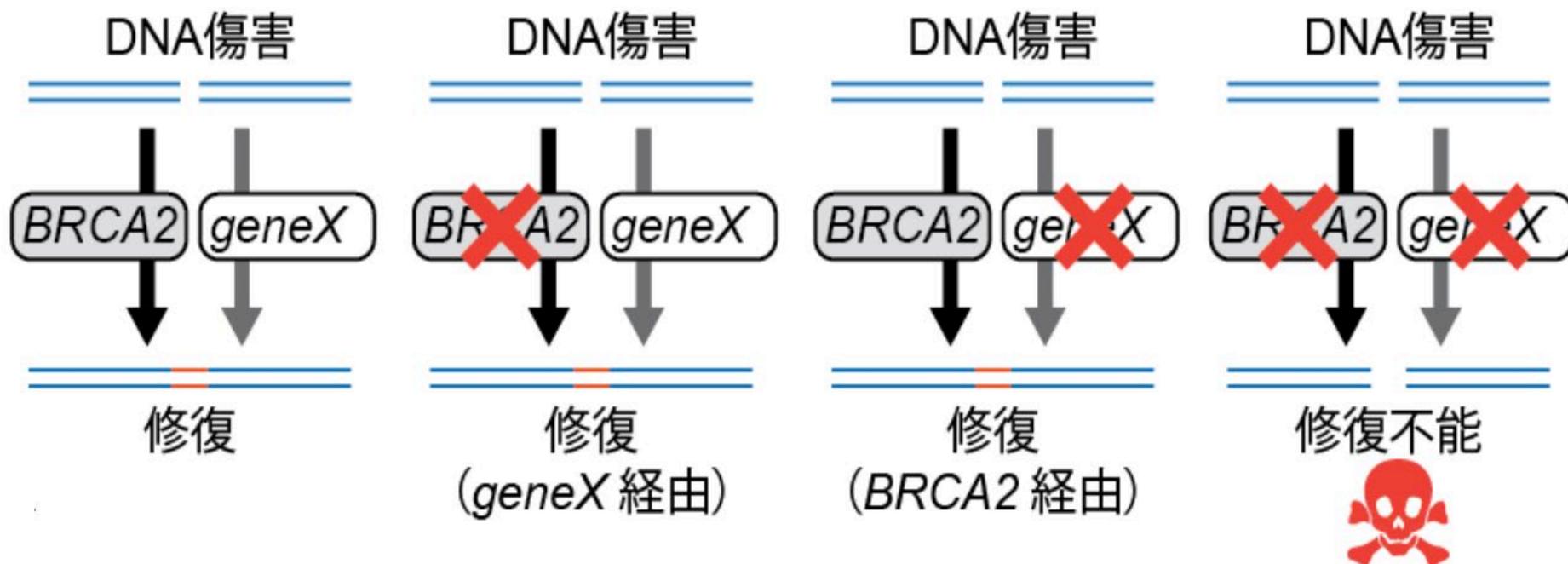
リムパーザとして発売

PARPを阻害することでBRCA細胞だけが致死となる

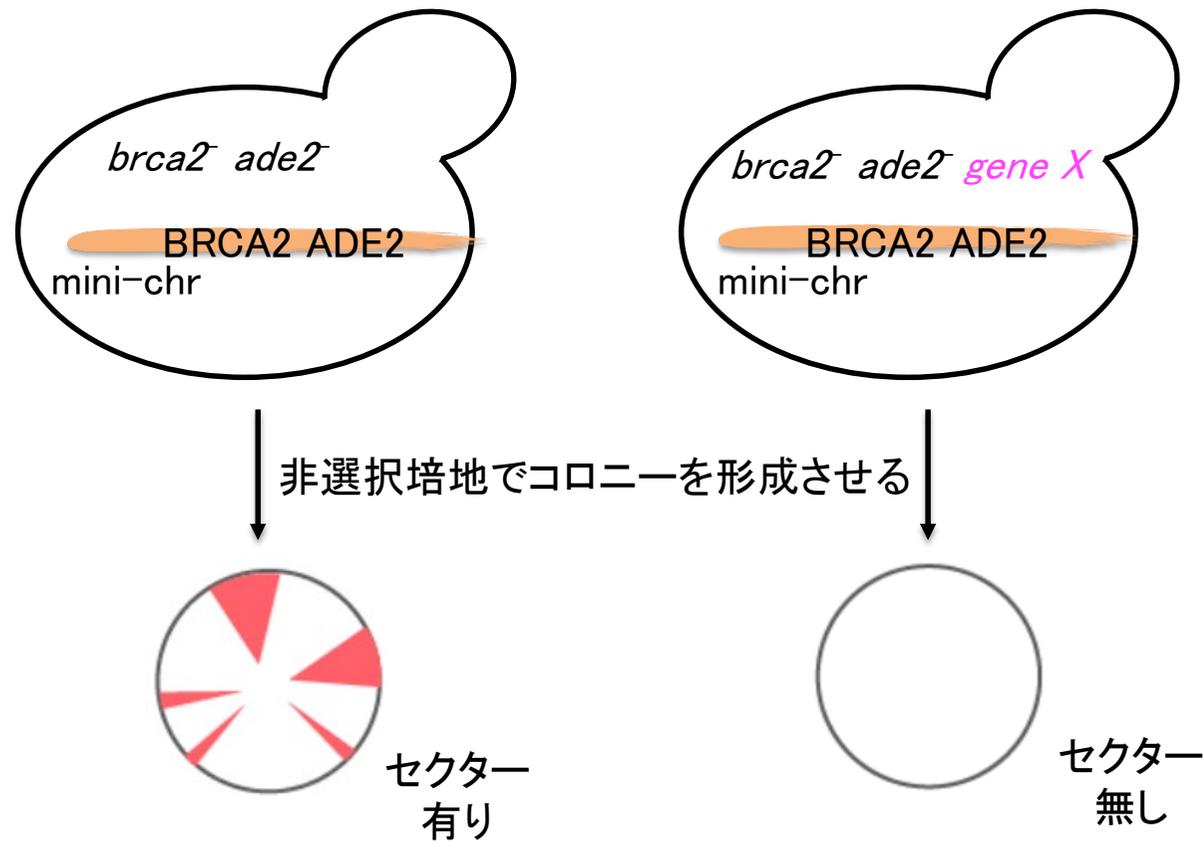


BRCA2変異細胞特異的薬剤のターゲット 遺伝子の検索

BRCA2変異との合成致死変異



コロニーセクターアッセイを用いた 合成致死変異株の分離



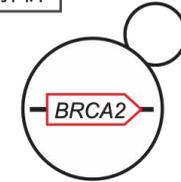
合成致死変異株の分離に加えて、
*Cryptococcus liquefaciens brca2*変異株を用いることで、
酵母遺伝学を駆使し
BRCA2 パスウェイの全体像を明らかにして、
得られた情報を創薬に利用する

注: ヒト *BRCA2* や *RAD51* は必須遺伝子完全欠損細胞ができない

ストラテジーの小括

① クリプトコッカス酵母をモデルとしたBRCA2の遺伝的解析

- ・クリプトコッカス酵母
 - ・BRCA2遺伝子を持つ
 - ・担子菌門に属する単細胞真核生物
 - ・一倍体の生活環を持ち出芽酵母同様の遺伝的解析が可能



クリプトコッカス
= BRCA2を持つ酵母



- ・BRCA2と遺伝的相互作用を示す遺伝子を包括的に同定
 - ・BRCA2変異と合成致死を示す変異群
 - ・BRCA2変異の欠損を抑制する変異群



② クリプトコッカスの解析から得られた遺伝的相互作用をヒト培養細胞系を使い検証



ヒト乳がん細胞の利用
(HCC1428など)

+



ヒトgeneXホモログの破壊

BRCA2変異細胞内での候補遺伝子の破壊

- ・表現型の検証
- ・抗がん化合物のスクリーニング



- ・新規HBOC治療法の開拓へ

従来技術とその問題点

既にHBOCの治療薬として実用化されているオラパリブがある。

しかし、オラパリブに対して全く反応しない症例やオラパリブ投与過程で耐性を獲得し最終的には腫瘍の増大を認める例が報告されている。

そこで、オラパリブに替わる治療薬やオラパリブ耐性となったがんに対する新たな治療薬の開発が急務である。

新薬創薬における 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の創薬は、トライアンドエラーによるスクリーニングであり、作用機序がすぐに分からない。本技術は、遺伝学的解析に基づくもので、作用機序を直接的に特定できるため、その後の応用範囲が大きい。
- 酵母を用いるため、初期スクリーニングのコストが安価である。

想定される用途

- ターゲットとなる遺伝子(タンパク質)が網羅的に捕捉できる。

実用化に向けた課題

- 現在、さまざまな修復遺伝子との二重変異、三重変異を作製して、修復経路の全容を明らかにしようとしている。これにより、複数存在するDNA修復経路のそれぞれの貢献度を見積もり、ヒトの修復経路との相違点を明らかにできる。今後、相補性テストをより簡便にするために、クリプトコッカス酵母細胞内で安定に自律複製可能なプラスミドの構築を急ぐ必要がある。

企業への期待

- 未解決の自律複製可能なプラスミドの構築に関しては、早晚開発できると考えている。
- 創薬に関わるケミカルライブラリーを持つ、企業との共同研究を希望。
- また、新しく酵母遺伝学を導入・展開を考えている企業には、共同研究によって人材育成が可能。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 遺伝性乳癌卵巣癌症候群の治療薬のスクリーニング方法
- 出願番号 : 特願2018-77857
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 岩崎 博史、坪内 英生、伊藤 武彦、
梶谷 嶺、リハッティ マルダン、
韓 龍雲

お問い合わせ先

東京工業大学
研究・産学連携本部

TEL 03-5734-2445

FAX 03-5734-2482

e-mail sangaku@sangaku.titech.ac.jp