

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08339

研究課題名(和文) LentiPlexを利用したTN乳癌の新たな組織学的亜分類の試み

研究課題名(英文) New analysis of triple negative breast cancer by using LentiPlex

研究代表者

小山 徹也 (Oyama, Tetsunari)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50233622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的shRNAをLentiPlexを乳癌細胞株に対して、感染させ、次世代シーケンサーを用いて特異的に障害性を持つshRNA候補の抽出を試みた。またTNBC、non-TNBC細胞株を用いてTNBC高発現遺伝子をRNAシーケンス法で検索し、公共データベースを利用してTNBC特異的高発現遺伝子を同定した。上記で同定されたTNBC特異的治療候補であるCaspase-14およびCarboxypeptidase A4 に関してTissue microarrayを用いた免疫染色、また培養細胞を使った発現抑制、増殖抑制試験を行い、予後予測、治療標的遺伝子としての役割について検討し、一定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The short hairpin RNA (shRNA) library is often used to detect promising candidates for specific molecular target therapies in cancer. For our study, we first performed a shRNA library analysis to identify cellular viability-related genes in breast cancer TNBC and non-TNBC cell lines. Then, we performed a transcriptome analysis to select highly expressed genes in TNBC compared with non-TNBC cell lines. Finally, we used transcriptome analysis data from the public database RefEx to select the specific genes not expressed in normal organs.

From these analyses, we identified four genes as candidates for molecular target therapy in TNBC, one is Caspase-14 and the other is Carboxypeptidase A4. We performed several immunohistochemical analysis, using tissue microarray from breast cancer human surgical specimens and migration assay and proliferation assay, using cell lines. We had several significant data.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 TNBC shRNA CASP-14 CPA-4

1. 研究開始当初の背景

乳癌は現在 intrinsic subtype として、ホルモンレセプターや増殖因子受容体による分類がされている。Triple negative breast cancer (TNBC)は ER, PgR HER2 陰性のホルモ治療、分子標的治療耐性の乳癌である。TNBC には様々な亜型が報告されているが、治療や病理組織学的所見まで加味した知見の蓄積は未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

TNBC 特異的な予後因子、治療標的蛋白を検索する目的で、従来とは異なった shRNA ライブラリ LentiPlex や知世代シークエンサーを用いて、候補遺伝子を検索し、tissue microarray を用いた免疫染色で蛋白発現を検索し、臨床病理学的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 約1万5千の遺伝子に対する網羅的 shRNA ライブラリーである LentiPlex を Basal-like TNBC と non-TNBC の細胞株に対して、ウイルスの導入率が 30-50%になるように infection させ、次世代シークエンサーを用いて細胞内に残存する shRNA を同呈することにより Basal-like 特異的に細胞障害性を持つ shRNA 候補の抽出を試みた。

(2) TNBC 細胞株 3 株、non-TNBC 細胞株 3 株を用いて TNBC 高発現遺伝子を RNA シークエンス法で網羅的に検索し、正常組織で低発現である遺伝子を TNBC 特異的高発現遺伝子として同定した。

上記の2つの方法に加えて、公共データベース RefEx transcriptome 解析で、40 の正常組織で発現していない TNBC 特異的治療候補遺伝子を絞込み、最終的に同定された遺伝子の中から、今回は Caspase-14 (CASP14) および Carboxypeptidase A4 (CPA4) に関して乳癌の症例における発現を免疫染色で評価し、また培養細胞を使った発現抑制、増殖抑制試験を行った。

4. 研究成果

CASP14 は主に癌細胞質、核内で発現し非癌乳腺組織、間質細胞では低発現であった。また CASP14 高発現群は TNBC 症例で有意に多く RNA sequencing の結果を検証することができた。CASP14 高発現群は低発現群と比較して nuclear grade, EGFR, ALDH1, CD44 及び CD24 と関連した。また TNBC において、claudin 1 及び androgen receptor と関連した。以上から CASP14 は乳癌の悪性度、増殖能、TNBC subtype や癌の stem cell と関連するものであった (図下 Table 1 2)。

TABLE 1 Patient characteristics and CASP14 expression in 222 breast cancer cases

| Characteristics | CASP14 expression | | P-value |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| | Low expression <5% (n = 164) | High expression ≥5% (n = 58) | |
| Age (years) | 55.4 ± 12.82 | 55.4 ± 11.99 | 0.933 |
| Subtype | | | |
| Luminal A | 99 | 22 | 0.015* |
| Luminal B | 6 | 1 | |
| HER2 | 24 | 15 | |
| TNBC | 35 | 20 | |
| ER | | | |
| Negative | 61 | 35 | 0.002* |
| Positive | 103 | 23 | |
| PgR | | | |
| Negative | 89 | 39 | 0.086 |
| Positive | 75 | 19 | |
| HER2 | | | |
| Score 0, 1+ | 135 | 42 | 0.107 |
| Score 2+, 3+ | 29 | 16 | |
| EGFR | | | |
| Score 0, 1+ | 155 | 49 | 0.016* |
| Score 2+, 3+ | 9 | 9 | |
| CK5/6 | | | |
| Negative | 157 | 55 | 0.775 |
| Positive | 7 | 3 | |
| Ki-67 labeling index | 17.3 ± 21.85 | 23.3 ± 22.42 | 0.001* |
| Tumor size (cm) | | | |
| <2 cm | 72 | 20 | 0.211 |
| ≥2 cm | 92 | 38 | |
| Tumor stage | | | |
| I | 80 | 25 | 0.472 |
| II | 75 | 29 | |
| III | 6 | 4 | |
| IV | 3 | 0 | |
| Lymph node metastasis | | | |
| Negative | 103 | 35 | 0.74 |
| Positive | 61 | 23 | |
| Metastasis | | | |
| Negative | 163 | 58 | 0.551 |
| Positive | 1 | 0 | |
| Stage | | | |
| I | 58 | 19 | 0.897 |
| II | 78 | 28 | |
| III | 27 | 11 | |
| IV | 1 | 0 | |
| Lymphatic invasion | | | |
| Negative | 52 | 19 | 0.883 |
| Positive | 112 | 39 | |
| Venous invasion | | | |
| Negative | 114 | 40 | 0.938 |
| Positive | 50 | 18 | |
| Nuclear grade | | | |
| NG1 | 37 | 9 | 0.006* |
| NG2 | 53 | 9 | |
| NG3 | 74 | 40 | |
| AR | | | |
| Negative | 65 | 27 | 0.158 |
| Positive | 90 | 31 | |
| Unknown | 9 | | |

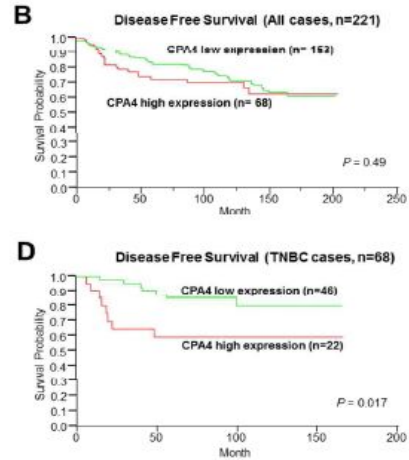
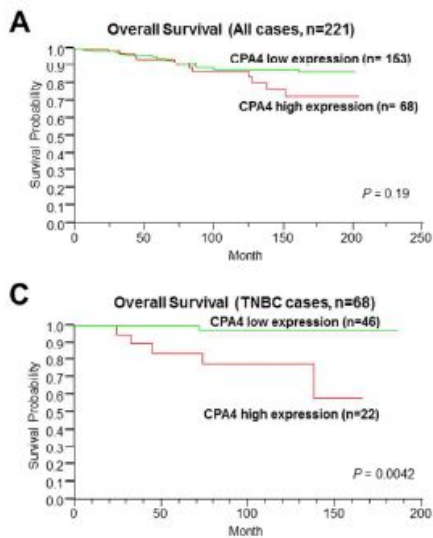
*P < 0.05.

TABLE 2 Relationship of the CASP14, stem cell markers, and claudins in 222 breast cancer cases

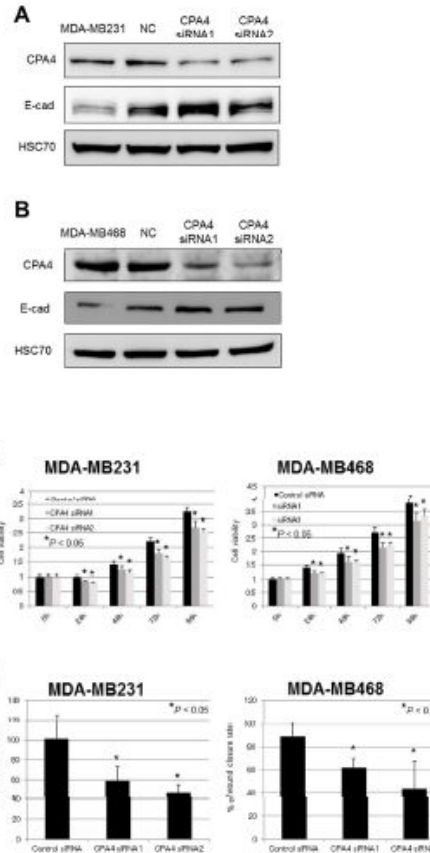
| Characteristics | CASP14 expression | | P-value |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------|
| | Low expression <5% (n = 164) | High expression ≥5% (n = 58) | |
| ALDH1 | | | |
| Negative | 159 | 49 | <0.001* |
| Positive | 5 | 9 | |
| CD44 | | | |
| Negative | 94 | 16 | <0.001* |
| Positive | 70 | 42 | |
| CD24 | | | |
| Negative | 149 | 43 | 0.001* |
| Positive | 15 | 15 | |
| CD44+CD24- | | | |
| Negative | 102 | 25 | 0.012* |
| Positive | 62 | 33 | |
| ALDH1+CD44+CD24- | | | |
| Negative | 162 | 53 | 0.006* |
| Positive | 2 | 5 | |
| Claudin1 | | | |
| Negative | 117 | 30 | 0.017* |
| Positive | 46 | 28 | |
| Unknown | 1 | | |
| Claudin3 | | | |
| Negative | 121 | 37 | 0.078 |
| Positive | 38 | 21 | |
| Unknown | 5 | | |
| Claudin4 | | | |
| Negative | 79 | 17 | 0.034* |
| Positive | 84 | 41 | |
| Unknown | 1 | | |
| Claudin7 | | | |
| Negative | 93 | 22 | 0.005* |
| Positive | 64 | 36 | |
| Unknown | 7 | | |

*P < 0.05.

CPA4 は細胞質に強く発現し、TNBC における CPA4 の発現は E-cadherin の低発現、cancer stem cell (CSC)の高発現と相関し、OS (AとC)、DFS (BとD)において予後不良因子であった(図下)。



E-cadherin の発現は CPA4 の抑制で減少し (AとB)、細胞の生存能力と運動能力は CPA4 を抑制することで減少した (CとD) (図下)。



CPA4 は EMT (epithelial-mesenchymal transition) に関する新しいマーカーである可能性が示唆された。

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1件)

Handa T, Katayama A, Yokobori T, Yamane A, Horiguchi J, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Bao P, Gombodorj N, Altan B, Kaira K, Asao T, Kuwano H, Nishiyama M, Oyama T.

Caspase14 expression is associated with triple negative phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients.

J Surg Oncol. (査読あり)

2017 Nov;116(6):706-715.

doi: 10.1002/jso.24705.

〔学会発表〕(計2件)

1. 半田正、片山彩香、山根有人、吉山伸司、堀口淳、西山正彦、小山徹也

Triple negative 乳癌の標的として shRNA screening により検出された GPR124 の乳癌における発現

第24回乳癌基礎研究会

2015年9月05日～06日 福島

2. 半田正、横堀武彦、川端麗香、片山彩香、小松恵、山根有人、吉山伸司、堀口淳、西山正彦、小山徹也

Triple negative 乳癌における新規治療標的候補 CASP14 発現の臨床的意義

第25回乳癌基礎研究会

2016年7月23日～24日 奈良

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小山 徹也(OYAMA Tetsunari)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50233622

(4)協力研究者

山根 有人(YAMANE Arito)