

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19861

研究課題名(和文)TN乳癌におけるエクソソームmiRNA発現解析、特に治療効果予測miRNAの検討

研究課題名(英文)Analysis of exosomal miRNA in the patients with tripe negative breast cancer;
role of miRNAs as predictive factors for treatment

研究代表者

末田 愛子(Sueta, Aiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70749720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ホルモン受容体陰性、HER2陰性乳癌の中で、術前に化学療法を行った症例で、血液中のエクソソームに内包されるmiRNA発現の検討を行った。腫瘍が完全に消失するpCR群では、腫瘍が残存しているnon-pCR群に比べて、miR-1273e、miR-4448、miR-2392、miR-2467-3p、miR-4800-3pの発現が有意に高く、miR-637、miR-874-3p、miR-423-5p、miR-1203、miR-3918、miR-4419a、miR-3177-5p、miR-4707-3p、miR-4740-3p、miR-210-5p、miR-6796-3pの発現が有意に低い結果であった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of exosomal miRNA which were derived from serum in the patients with hormonal receptor-positive and HER2-negative breast cancer. The patients with pCR had higher levels of miR-1273e, miR-4448, miR-2392, miR-2467-3p and miR-4800-3p and lower levels of miR-637, miR-874-3p, miR-423-5p, miR-1203, miR-3918, miR-4419a, miR-3177-5p, miR-4707-3p, miR-4740-3p, miR-210-5p and 6796-3p compared to those with non-pCR.

研究分野：乳癌における体液診断

キーワード：エクソソーム miRNA 体液診断

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌において術前化学療法も標準治療として行われるようになっており、その治療効果が予後を反映することが示唆されている。ホルモン受容体陽性、HER2 陰性の triple negative(TN)乳癌は、悪性度が高いサブタイプであるが、術前化学療法の効果が得られた症例では予後が良好であることが示されている¹⁾。しかしながら TN 乳癌の中でも治療効果を予測するバイオマーカーで確立されたものはなく、現在様々な因子が模索されている。近年、いわゆる liquid biopsy による RNA や CTC, cell-free DNA, エクソソームなどを用いた評価が有用である可能性が示唆されているが、この中で、エクソソームに内包される miRNA がバイオマーカーとして有用であるかを検討することを目的とした。当初は前述のように、術前化学療法を施行された TN 乳癌において、治療効果を予測するエクソソーム miRNA を同定することを予定していたが、TN 乳癌は全乳癌の 15%と少なく、さらに標準治療を完遂した症例に限定すると、本研究期間での症例蓄積が不十分であった。そのため、原発乳癌症例において、エクソソーム由来 miRNA が予後予測因子として有用であるかをまず評価することとした。その後、症例の蓄積が得られた時点で、TN 乳癌術前化学療法症例における研究を開始した。

2. 研究の目的

(1)

原発乳癌症例におけるエクソソーム由来 miRNA と、予後(再発)との関連を検討する。再発例、無再発例で、治療前の患者血清からエクソソームを抽出し、再発例で変化がある miRNA を同定する。これらと既知の臨床病理学的因子との相関なども検討し、再発予測において精度の高いリスク予測モデルの構築を目的とする。

またエクソソームは原発腫瘍組織から受動的または能動的な機序で分泌されていると考えられる。治療前の原発組織内の miRNA 発現も評価し、エクソソーム由来 miRNA と発現プロファイルを比較検討する。

(2)

術前化学療法症例のうち TN 乳癌において病理学的完全寛解(pCR), non-pCR 例それぞれにおいてエクソソーム miRNA 発現を比較検討する。

最終的には TN 乳癌の治療効果予測ツールを作成することが目的である。

3. 研究の方法

(1)

当院で手術及び治療を施行された原発乳癌のうち、再発例 16 例、無再発例 16 例を選別し、治療前の血清からエクソソームを抽出した。両群で臨床病理学的因子、乳癌サブタイ

プは相違がないよう一致させた。エクソソームは、患者血清 500uL から ExoQuick® (System Bioscience) を用いて回収し、SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit (System Bioscience) を用いて全 RNA を回収した。その後 miScript RT kit (Qiagen) で cDNA へ変換し、miRNA PCR array (Qiagen) を用いて 384 遺伝子について、再発、無再発例での発現パターンを比較した。発現比較は delta CT 法で行った。

原発腫瘍内の miRNA 発現に関しては、治療前の腫瘍組織から、AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal kit (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出し、同様に cDNA へ変換した。その後、RT-PCR 法で各 miRNA 発現を評価する。発現比較は同様に delta CT 法で行った。

(2)

TN 乳癌においてアンスラサイクリン系及びタキサン系薬剤を用いて術前化学療法を施行した患者を選別した。治療前の患者血清 500uL を用いて、前述と同様の方法でエクソソームを回収した。pCR 例 12 例、non-pCR 例 12 例において miRNA 発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した(東レへ委託)。

4. 研究成果

(1) 原発乳癌症例における検討

観察期間中央値は 100 か月であった。全 32 例の患者背景において、再発例、無再発例で有意な違いは見られなかった。いずれの群においても luminal type は 56%, HER2 タイプは 25%, TN タイプは 19%とサブタイプは統一させた。これら患者の治療前血清より得られたエクソソーム miRNA を PCR array で評価した。

384 遺伝子のうち、11 遺伝子で両群に有意差を認めた(図 1)。

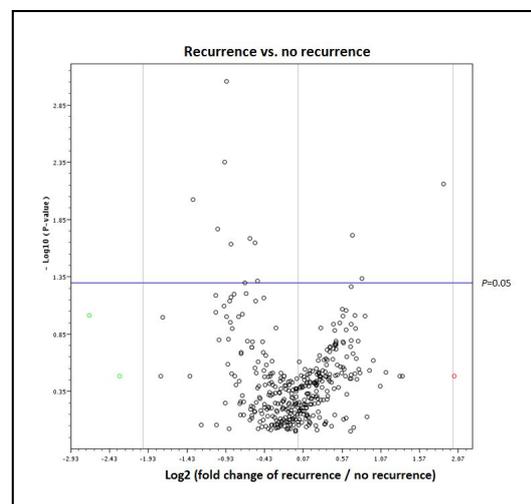


図 1

再発例では、無再発例に比べ、miR-338-3p、miR-340-5p、miR-124-3p の発現が有意に高く、miR-29b-3p、miR-20b-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、miR-18a-5p、miR-195-5p、miR-486-5p、miR-93-5p の発現が有意に低下していた。これら同定された miRNA について、原発腫瘍組織内での発現を比較した。症例を更に追加し、計 74 例（再発例 35 例、無再発例 39 例）で検討を行った。上記 PCR array で同定された遺伝子のうち、miR-340-5p においては、再発例で有意に上昇していたが、miR-195-5p、miR-17-5p、miR-93-5p、miR-130a-3p は再発例で有意に低下していた（図 2）。腫瘍径を含めた多変量解析では miR-93-5p のみ統計的に有意な結果であった。

エクソソーム内及び原発腫瘍組織内で miRNA 発現パターンの相違がみられたことは、注目すべき点である。詳細なメカニズムの解明が必要であるが、癌細胞が自身の増殖や進展に必要とする miRNA と、周囲への微小環境を整えていくために必要とする miRNA が異なる可能性が示唆される。

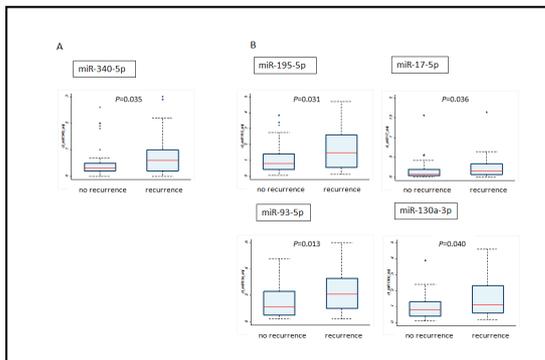


図 2

(2) TN 乳癌における術前化学療法症例の検討

pCR, non-pCR 症例それぞれ 12 例において治療前血清中のエクソソーム由来 miRNA 発現を比較した。pCR、non-pCR 群の平均年齢はそれぞれ 46 歳、56 歳であり ($p=0.037$) その他の臨床病理学的因子（腫瘍径、リンパ節転移、核グレード、病理組織型）において有意差は認めなかった。

マイクロアレイ解析の結果、16 遺伝子で発現パターンの相違を認めたと（図 3）。pCR 群では、non-pCR 群に比べて、miR-1273e、miR-4448、miR-2392、miR-2467-3p、miR-4800-3p の発現が有意に高く、miR-637、miR-874-3p、miR-423-5p、miR-1203、miR-3918、miR-4419a、miR-3177-5p、miR-4707-3p、miR-4740-3p、miR-210-5p、miR-6796-3p の発現が有意に低い結果であった。これらマイクロアレイ解析の結果得られた miRNA について RT-PCR 法での

validation study を現在行っているところであるが、前述のように症例の蓄積が不十分である。今後更なる症例を蓄積し検討を進める。これらの結果から得られた miRNA 群と、既知の臨床病理学的因子を用いて、治療に難渋する TN 乳癌の治療効果予測ツールを構築する予定である。

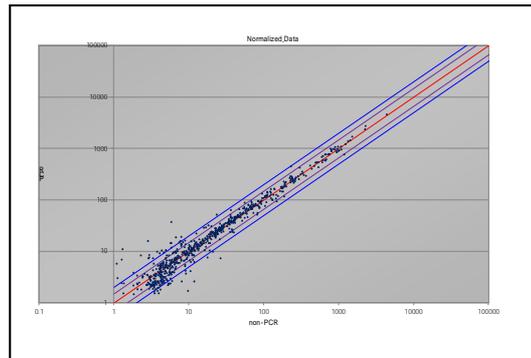


図 3

< 引用文献 >

1) J Clin Oncol. 20;30(15):1796-804, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 末田愛子、Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with recurrence and no-recurrence、第 39 回 San Antonio Breast Cancer Symposium、2016 年 12 月 7 日、サンアントニオ（米国）

2. 末田愛子、乳癌の再発に関する血中エクソソーム miRNAs の同定、第 24 回日本乳癌学会学術総会、2016 年 6 月 17 日、東京ビッグサイト（東京）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末田 愛子 (SUETA AIKO)
熊本大学 大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70749720

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協協力者 なし