

令和元年6月11日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10469

研究課題名(和文) 乳癌におけるタキサン耐性機序の解明と新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Exome sequencing of human breast cancer tissues resistant to taxanes.

研究代表者

遠藤 友美 (Endo, Yumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20566228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アンソラサイクリン系薬剤が著効したにもかかわらず、タキサン系薬剤を投与後、腫瘍が増大した6症例の凍結乳癌組織を使用して全エクソンシーケンスを行い、その結果からタキサン抵抗性へ関与が強いと思われる変異に絞り込んだ。その変異の存在する遺伝子はAPOBEC3FとATP6V1Aであった。その2遺伝子の機能解析のため、mRNAや蛋白発現と予後との相関を検討すると、この2遺伝子のmRNA発現が高値の症例は有意に無病生存期間(DFS)、全生存期間(OS)が不良であった。これら遺伝子の蛋白発現と予後には有意な相関はなかった。また、2遺伝子に存在する変異を検索したが、175症例にいずれも見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タキサン系薬剤抵抗性は、多くの癌種で問題となっている、さらに、ATP6V1AやAPOBEC3の遺伝子の異常は乳癌以外の癌でも多く観察されている。よって、本研究の実施により、いわゆる難治癌を含む多くの癌種に対する治療のブレイクスルーになることが期待できるため、社会的な意義はきわめて大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the mechanisms of taxane resistance using whole exon sequencing and expression analyses in human breast cancer tissues.

We selected six breast cancer patients whose tumors responded well to anthracycline treatment but suffered disease progression on taxane treatment. We then performed whole exon sequencing on these samples. In this way, we identified somatic mutations of candidate genes considered to be instrumental for mediating resistance to taxanes. These candidate genes were APOBEC3F and ATP6V1A. Kaplan-Meier analyses showed that high level mRNA expression of two genes were significantly associated with poorer disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). However, there were no significant correlations between protein expression levels and DFS and OS. We conducted a search for these two mutations about 122 breast cancers treated with taxanes. Among these patients, no mutations were found about both ATP6V1A and APOBEC3F.

研究分野：乳癌の生物学的特性について

キーワード：乳癌 薬剤耐性 体細胞変異

1. 研究開始当初の背景

タキサン系薬剤は、乳癌治療におけるキードラッグの一つであり、初発治療から再発治療に至るまですべての乳癌治療において重要な役割を担う薬剤である。しかしながら、タキサン系薬剤に耐性を示す乳癌がしばしば経験され、大きな臨床的課題となっている。タキサン系薬剤に対する耐性機序については、現在までに、様々な切り口から精力的に研究が進められてきたが、いまだその耐性機序は十分に明らかにされていない。

私たちは、乳癌に対する術前化学療法を行う際に、アンソラサイクリン系薬剤に著効したにもかかわらず、タキサン系薬剤を投与後、期待に反して、腫瘍が著明に増大してしまった症例を複数例経験した。このような症例の分子メカニズムを解明することで、乳癌治療において重要な役割を担うタキサン系薬剤の耐性克服ができないかと考え、本研究を立案した。

また、近年、次世代シーケンサーを用いた解析により、膨大かつ正確なゲノム情報が短時間に得られるようになり、様々な領域において新たな知見が次々と報告されてきた。乳癌領域においても、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析が行われ、DNA の変異やコピーナンバーの解析から、RNA 発現・メチル化・マイクロ RNA 発現・蛋白発現に至るまで、同時に解析した膨大な研究成果が報告された (The Cancer Genome Atlas Network, *Nature*, 2012)。このデータを元にして、HER2 陰性乳癌における HER2 遺伝子の体細胞変異が、HER2 に対する分子標的治療への効果や耐性に関与することが報告されるなど、次世代シーケンサーの登場が薬剤耐性メカニズムの解明に新たな展開をもたらした (Bose, *et al. Cancer Discovery*, 2012)。

2. 研究の目的

これらの研究報告と私たちの临床上直面した問題に着目して、タキサン系薬剤の耐性に癌細胞の体細胞変異が関与しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、複数のタキサン系薬剤抵抗性乳癌を対象に全エクソンシーケンス解析を行うことにより、共通する体細胞変異を見出し、その機能解析を通して、タキサン抵抗性メカニズムの解明とその克服を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

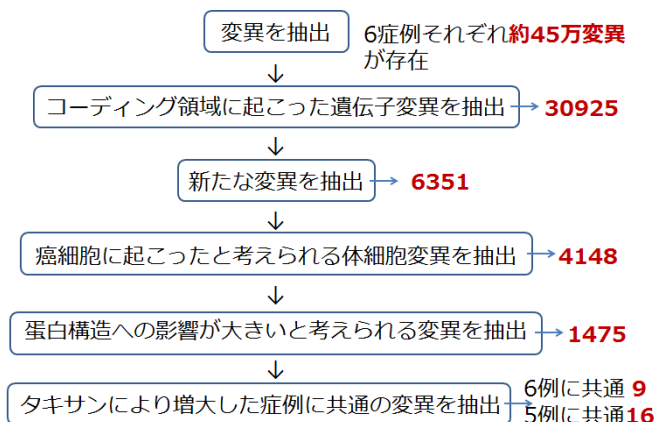
アンソラサイクリン系薬剤が著効したにもかかわらず、タキサン系薬剤を投与後、腫瘍が著明に増大してしまった6症例の凍結乳癌組織と、そのうち3症例の血液から DNA を抽出した。この計9検体を対象に HiSeq (Illumina) を使用して全エクソンシーケンスを行った。それらの結果から、生殖細胞変異の除外、すでに報告のある変異の除外、蛋白構造への影響の大きさの予測、共通の変異の抽出などを考慮して、タキサン抵抗性へ関与が強いと思われる変異に絞り込んだ。その変異の存在する遺伝子の機能解析のため、当院で周術期化学療法にてタキサン系薬剤を使用した乳癌症例を用いて、変異の存在する遺伝子の mRNA 発現や蛋白発現と予後との相関を検討した。その解析において、特に重要と考えられた *APOBEC3F*、*ATP6V1A* についてはさらに症例を増やして、予後との相関の検討、原因変異の頻度検索、蛋白構造解析を行った。

4. 研究成果

その結果、タキサン抵抗性症例において6例に共通する変異を9箇所、5例に共通する変異を16箇所見出した (Fig. 1)。変異の存在する遺伝子 *APOBEC3F*、*ATP6V1A* の mRNA 発現が高値の症例では、有意に無病生存期間 (DFS)、全生存期間 (OS) が不良であった (Fig. 2,3)。これら遺伝子の蛋白発現と予後には有意な相関はなかった (Fig. 4,5)。また、2 遺伝子に存在する変異を検索したが、175 症例にいずれも見いだせなかった。また、タキサン系薬剤を使用していない症例も含めた全症例 (n=442) における解析においても、*ATP6V1A* が高値の症例では有意に DFS が不良であった。

結果

Fig. 1



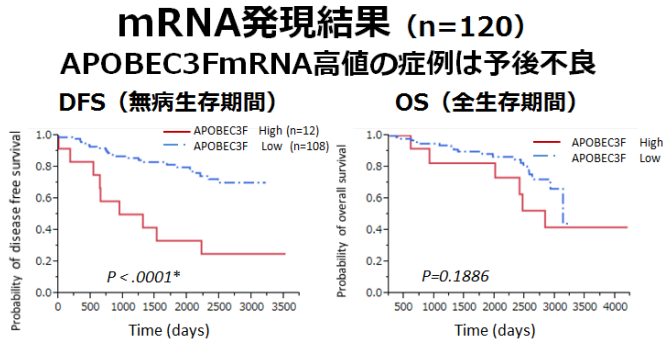


Fig. 2

APOBEC3F高値の症例は有意にDFSが不良であったがOSでは有意差をみとめなかった

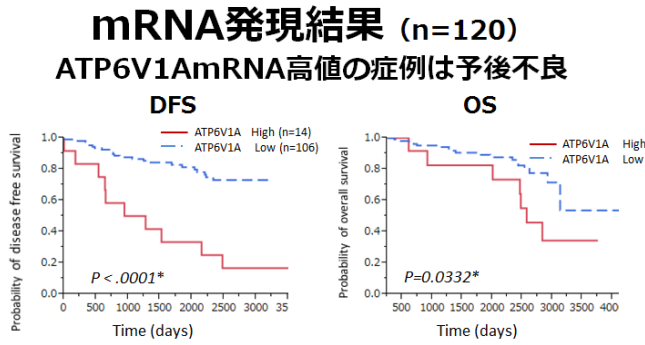
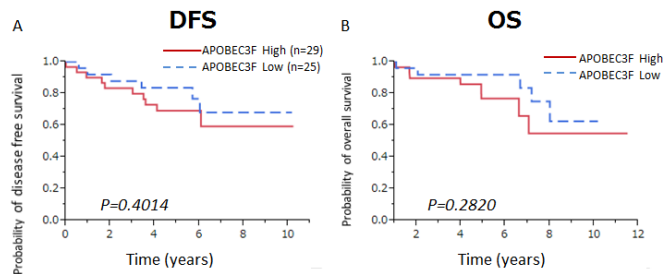


Fig. 3

ATP6V1A高値の症例は有意にDFS、OSが不良であった

蛋白発現結果 (n=60)
APOBEC3Fの蛋白発現と予後に相関を認めなかった

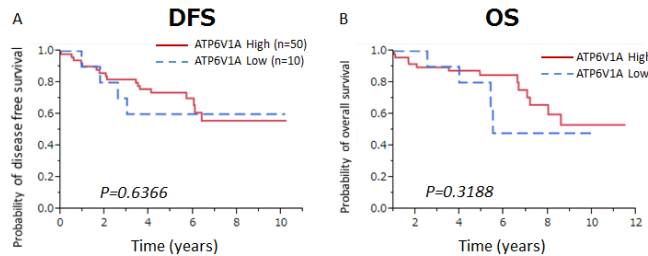
Fig. 4



APOBEC3Fの蛋白発現の値は、DFS、OSともに有意差をみとめなかった

蛋白発現結果 (n=61)
ATP6V1Aの蛋白発現と予後に相関を認めなかった

Fig. 5



ATP6V1Aの蛋白発現の値は、DFS、OSともに有意差をみとめなかった

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) ゲノム解析を用いた乳癌におけるタキサン抵抗性機序の解明
遠藤(鰐淵)友美、高橋 智、近藤直人、波戸ゆかり、久田知可、西本真弓、西川さや香、遠山竜也
第 26 回日本乳癌学会学術総会 2018 年 7 月
- (2) 乳癌におけるタキサン抵抗性機序の解明
遠藤友美、高橋 智、近藤直人、波戸ゆかり、久田知可、西本真弓、西川さや香、遠山竜也
第 25 回日本乳癌学会学術総会 2017 年 7 月
- (3) Exome sequencing analysis in human breast cancer tissues showing resistance for taxanes. Endo Y, Toyama T *et al.* San Antonio Breast Cancer Symposium, December 6, 2016 (San Antonio, USA)
- (4) 乳癌におけるタキサン抵抗性機序の検討
遠藤友美、近藤直人、吉本信保、波戸ゆかり、西本真弓、高橋智、遠山竜也
第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016 年 6 月
- (5) 次世代シーケンスを用いたタキサン系薬剤抵抗性に関わる遺伝子の探索
遠藤友美、高橋智、吉本信保、波戸ゆかり、西本真弓、董宇、遠山竜也
第 23 回日本乳癌学会学術総会 2015 年 7 月

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：遠山竜也

ローマ字氏名：Toyama Tatsuya

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30315882

研究分担者氏名：近藤直人

ローマ字氏名：Kondo Naoto

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：90529166

研究分担者氏名：吉本信保

ローマ字氏名：Yoshimoto Nobuyasu

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 10551244

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。