

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10558

研究課題名(和文) 乳癌に対する新規治療薬の開発を目的としたマイクロRNA-569ノックダウン療法

研究課題名(英文) TP53INP1 gene in estrogen receptor alfa-positive breast cancer patients

研究代表者

西本 真弓(Nishimoto, Mayumi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：00757883

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)：TP53INP1(Tumor protein p53-induced nuclear protein 1)は、様々な癌の増殖を抑制する働きを持つことが知られている。本研究では、術後の観察期間が約10年の長期フォローアップを施行した乳癌患者453例を対象に、TP53INP1発現と予後および臨床病理学的因子との関連性について検討した。その結果、特に、術後内分泌療法を施行した乳癌患者において、TP53INP1低発現は独立した予後不良因子であり、TP53INP1が内分泌療法施行患者に対する治療標的となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、長期フォローアップを施行した乳癌患者のサンプルを用いたTP53INP1遺伝子発現解析を行うことで、特にエストロゲン受容体陽性乳癌において独立した予後因子であることを示し、TP53INP1が乳癌に対する治療標的になる可能性を示したことに意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) is a key stress protein with tumor suppressor function. In this study, we investigated the correlations of TP53INP1 mRNA expression in breast cancer tissues with prognosis in breast cancer patients with long follow-up. We found positive correlations between low expression of TP53INP1 mRNA and shorter disease-free survival and overall survival in breast cancer patients in estrogen receptor (ER)-positive patients receiving adjuvant endocrine therapy. We show that low expression of TP53INP1 is an independent factor of poor prognosis in breast cancer patients, especially ER-positive patients. TP53INP1 might be a promising candidate biomarker and therapeutic target in ER-positive breast cancer patients.

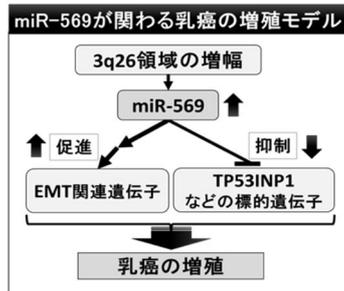
研究分野：乳癌

キーワード：乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性が最も多く罹患する悪性疾患であり、死亡数も増加の一途を辿っている。3番染色体長腕(3q26)領域の増幅の頻度が、乳癌組織において高いことは以前より報告されていたが、その意義は不明であった。しかし、最近、マイクロRNA「miR-569」の発現亢進が、3番染色体長腕(3q26)の増幅によって引き起こされ、その結果、乳癌細胞の増殖が促進されることがわかった(文献1)。



miR-569が、乳癌の増殖を促進する機序(左図)として、TP53INP1(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1)を含む標的遺伝子の発現を抑制したり、癌の浸潤・転移を促進する上皮間葉転換(EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition)への関連などが考えられている。したがって、TP53INP1は、miR-569の最も重要な標的遺伝子と考えられている。TP53INP1を制御するマイクロRNAとしては、miR-569以外にmiR-155も報告されている。

外にmiR-155も報告されている。

乳癌組織において、3番染色体長腕(3q26)領域の増幅によりmiR-569の発現亢進が起こり、TP53INP1を含むmiR-569の標的遺伝子の発現低下とEMTの促進を来し、結果として、ホルモン療法への感受性の低下が引き起こされるのではないかと、この仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、長期のフォローアップを行った乳癌症例を用いて、TP53INP1遺伝子発現と臨床病理学的因子および予後等との関連について検討することを目的とした。

(2) また、TP53INP1発現を調節することが報告されているmiR-569およびmiR155発現と、TP53INP1発現および臨床病理学的因子および予後等との関連について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象患者と腫瘍組織: 2000~2007年の間に当院にて手術を施行した原発性乳癌453例の乳癌組織を用いてTP53INP1 mRNAの発現解析を施行した。これらの症例のフォローアップ期間中央値は9.0年(1.0-194.4ヶ月)であった。また、2003~2007年の間に当院にて手術を施行した原発性乳癌でRNA抽出可能であった291例の乳癌組織を用いてmiR-569、miR-155およびSNAI1、SNAI2、VIM(vimentin)の発現解析を行った。これらの症例のフォローアップ期間中央値は8.9年(1.0-158.2ヶ月)であった。

(2) RNAの抽出と定量的RT-PCT法: Total RNAとmiRNAは、miRNeasy Mini Kitを用いて抽出した。mRNA発現解析は、7500 Fast Real-time PCR System および 7500 ABI PRISM Sequence Detector Systemを用いて、TaqMan Gene Expression Assays および TaqMan MicroRNA Assays を使用して行った。カットオフ値の設定は、receiver operating characteristic (ROC) analysisで行った。

(3) エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2に対する免疫組織化学法: パラフィン包埋標本ブロックを用いて、ER、PgR、HER2のタンパク発現の解析を行った。ER、PgRの発現の評価は、Allred法にて行った。HER2発現は、HercepTestスコア法を用いて評価した。

(4) 統計解析: 生存曲線は、Kaplan-Meier法にて解析し、log-rankテストにて評価した。無病

生存期間 (DFS: disease-free survival) について、もし患者が無再発で生存している場合は最終来院日をもって「打ち切り」とした。全生存期間 (OS: overall survival) については、患者が生存していれば「打ち切り」とした。TP53INP1 等と臨床病理学的因子との解析は 2 検定および Fisher's exact probability test にて行った。また、単変量および多変量解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。統計解析ソフトは、JMP12.2 を使用した。

4. 研究成果

(1) TP53INP1 mRNA 発現と乳癌の予後:

最初に、TP53INP1 mRNA 発現レベルと乳癌の予後について検討した。対象とした乳癌症例は 453 例であり、その患者背景は、Table 1 に示す。

TP53INP1 低発現症例は、組織悪性度が高く、ER 陰性で、PgR 陰性である割合が高かった。

Figure 1AB に示すように、Kaplan-Meier 法から、TP53INP1 低発現症例は、有意に DFS と OS が短いことが示された。

TP53INP1 発現が、ER 発現、PgR 発現、組織腫瘍と相関があったため、304 例の術後内分泌療法を施行した ER 陽性乳癌を対象に、予後との関連を検討した。その結果、Figure 1CD に示すように、全症例と同様に、TP53INP1 低発現症例は、有意に DFS と OS が短いことが示された。また、興味深いことに、ER 陰性症例では、TP53INP1 発現と予後に相関を認めなかった (Figure 1EF)。

次に、TP53INP1 mRNA 発現と、EMT に関連する SNAI1、SNAI2、VIM の 3 遺伝子発現に関連性があるかどうかを検討したが、これら 3 遺伝子発現と TP53INP1 発現に相関は認めなかった。

全乳癌を対象に、臨床病理学的因子を DFS および OS との相関について、Cox 比例ハザードモデルを用いて、単変量・多変量解析を行った (Table 3)。その結果、TP53INP1 mRNA 発現は、腋窩リンパ節転移状況とともに、独立した予後因子であることが示された。次に、術後内分泌療法を施行した ER 陽性

Table 1. Association between TP53INP1 mRNA expression and clinicopathological characteristics in all breast cancer patients

	All patients n (%)	TP53INP1 mRNA expression		P value
		High n (%)	Low n (%)	
Patients	453	272	181	
Age	55 (25-94)	55 (28-83)	55 (25-94)	
Menopause status				0.56
Pre	190 (42)	111 (41)	79 (44)	
Post	263 (58)	161 (59)	102 (56)	
Tumor size				0.051
≤2 cm	188 (42)	123 (45)	65 (36)	
>2 cm	263 (58)	147 (54)	116 (64)	
Unknown	2 (0.4)	2 (1)	0	
Node status				0.92
Negative	232 (51)	139 (51)	93 (51)	
Positive	188 (42)	111 (41)	77 (43)	
Unknown	33 (7)	22 (8)	11 (6)	
Grade				<0.0001
1	136 (30)	105 (39)	31 (17)	
2	111 (25)	64 (24)	47 (26)	
3	200 (44)	99 (36)	101 (56)	
Unknown	6 (1)	4 (1)	2 (1)	
Histology				0.009
IDC	397 (88)	242 (89)	155 (86)	
ILC	17 (4)	14 (5)	3 (2)	
Others	37 (8)	14 (5)	23 (13)	
Unknown	2 (0.4)	2 (1)	0	
ERα status				<0.0001
Positive	340 (75)	231 (85)	109 (60)	
Negative	96 (21)	29 (11)	67 (37)	
Unknown	17 (4)	12 (4)	5 (3)	
PgR status				<0.0001
Positive	299 (67)	204 (75)	95 (52)	
Negative	137 (30)	56 (21)	81 (45)	
Unknown	17 (4)	12 (4)	5 (3)	
HER2 status				0.88
Positive	54 (12)	31 (11)	23 (13)	
Negative	357 (79)	210 (77)	147 (81)	
Unknown	42 (9)	31 (11)	11 (6)	
Adjuvant therapy				<0.0001
ET alone	177 (39)	123 (45)	54 (30)	
CT alone	86 (19)	24 (9)	62 (34)	
ET + CT	154 (34)	103 (38)	51 (28)	
None	31 (7)	19 (7)	12 (7)	
Unknown	5 (1)	3 (1)	2 (1)	

ERα, estrogen receptor α; PgR, progesterone receptor; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ET, endocrine therapy; CT, chemotherapy.

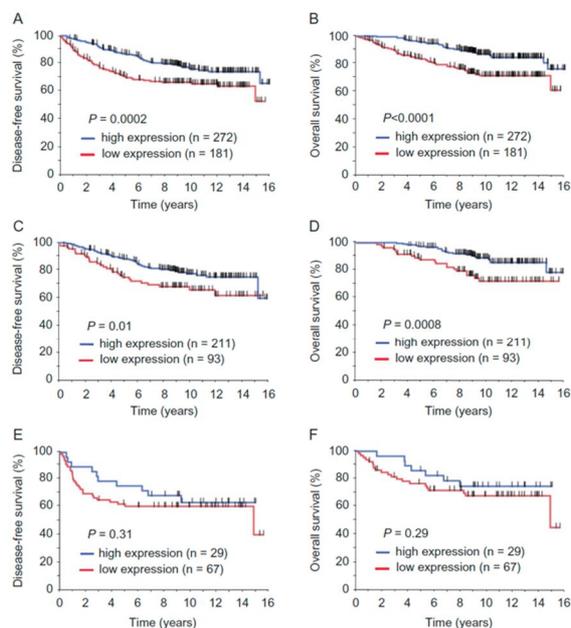


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves according to TP53INP1 mRNA expression levels. Graphs show DFS and OS curves, respectively, for all breast cancer patients (A and B), ERα-positive breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy (C and D) and ERα-negative breast cancer patients (E and F).

乳癌症例を対象に検討した結果、全症例を対象とした場合と同様に、TP53INP mRNA 発現は、腋窩リンパ節転移状況とともに、独立した予後因子であることが示された。

(2)乳癌組織における miR-469 と miR-155 発現：

今までの他のグループの報告で、miR-469 と miR-155 は TP53INP1 発現を制御することが示されていたため、実際の乳癌症例を用いて、これらのマイクロ RNA 発現と TP53INP mRNA 発現の関連を検討した。しかしながら、これらのマイクロ RNA 発現と TP53INP mRNA 発現の間には有意な相関を認めなかった。

また、miR-469 と miR-155 発現と乳癌の予後との関連について検討したが、これらのマイクロ RNA 発現と DFS および OS との間には有意な相関は認めなかった (Figure 4)。

< 引用文献 >

1. Chaluvally-Raghavan P, *et al. Cancer Cell*, 2014;26:863-79.

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression analysis of factors associated with prognosis in all breast cancer patients

Variables	n (%)	Univariate (DFS)	Univariate (OS)	Multivariate (DFS)		Multivariate (OS)	
		P value	P value	P value	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)
Tumor size							
≤2 cm	188 (42)				1 (Reference)		1 (Reference)
>2 cm	263 (58)	0.002	0.034	0.13	1.46 (0.88-2.47)	0.83	1.07 (0.58-1.99)
Node status							
Negative	232 (51)				1 (Reference)		1 (Reference)
Positive	188 (42)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	4.46 (2.72-7.48)	<0.0001	3.96 (2.17-7.51)
Grade							
1 and 2	247 (55)						1 (Reference)
3	200 (44)	0.08	0.043			0.56	1.20 (0.65-2.21)
ER status							
Positive	340 (75)				1 (Reference)		1 (Reference)
Negative	96 (21)	0.001	0.0002	0.06	2.18 (0.97-5.12)	0.09	2.41 (0.88-7.14)
PgR status							
Positive	299 (66)				1 (Reference)		1 (Reference)
Negative	137 (30)	0.02	0.012	0.91	0.96 (0.44-2.00)	0.63	0.79 (0.29-1.94)
HER2 status							
Positive	54 (12)						1 (Reference)
Negative	357 (79)	0.08	0.03			0.19	0.58 (0.26-1.34)
TP53INP1 mRNA							
High	272 (60)				1 (Reference)		1 (Reference)
Low	181 (40)	0.005	0.0005	0.043	1.68 (1.01-2.77)	0.014	2.13 (1.17-3.92)

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; ERα, estrogen receptor α; PgR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

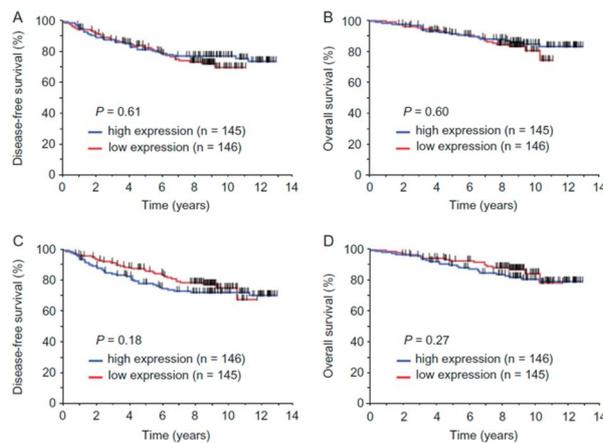


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves according to miR-155 or miR-469 expression levels. Graphs show DFS (A) and OS (B) according to miR-155 expression level and DFS (C) and OS (D) according to miR-469 expression level.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mayumi Nishimoto, Sayaka Nishikawa, Naoto Kondo, Yumi Wanifuchi-Endo, Yukari Hato, Tomoka Hisada, Yu Dong, Katsuhiko Okuda, Hiroshi Sugiura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi, Tatsuya Toyama	4. 巻 49
2. 論文標題 Prognostic impact of TP53INP1 gene expression in estrogen receptor -positive breast cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 567-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西本真弓、近藤直人、遠藤友美、波戸ゆかり、久田知可、西川さや香、遠山竜也
2. 発表標題 TP53INP1遺伝子の低発現はエストロゲン受容体陽性乳癌における独立した予後不良因子である
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	遠山 竜也 (Toyama Tatsuya) (30315882)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	近藤 直人 (Kondo Naoto) (90529166)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	

