

令和 6 年 9 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07328

研究課題名(和文) 乳癌における遺伝子多型の解明及び薬剤感受性とPrecision Medicine

研究課題名(英文) Association between gene analyzing method, drug sensitivity and precision medicine in breast cancer

研究代表者

岡野 泰子 (OKANO, Yasuko)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：70438133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体(ER)陽性乳がんは、乳がんの中で最も一般的(>70%)であり、最も進行性の低いサブタイプでもある。これらの腫瘍は、術前化学療法に対する反応も不良である。NRF2遺伝子は、活性酸素に反応して抗酸化遺伝子の発現を制御するなど細胞の防御に重要な役割を果たす一方がん細胞の増殖や抗がん剤への抵抗性にもかかわることが知られている。そのため Eprobe-PCRを用いてNRF2を高感度、迅速かつ正確に検出する新しいバイオマーカーを開発した。その結果、NRF2のSNP(c.-617C > A)は乳がんリスクと関連しているが、乳がん患者の生存率とは関連を示さないことを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER陽性乳癌の罹患率は、近年、女性の臓器別の高いがん罹患率を占めており、ER陽性乳癌のリスクを早期に検出するバイオマーカーが確立され、遺伝子多型の検出診断法キットが開発されることで、今後臨床の現場で、Precision Medicineの推進が可能となり最適な治療に結びつき、生命の尊厳につなげ、多様性を生かし重んじる共存共生による生活環境やライフスタイルに合わせた疾病予防や治療を行うという新しい医療概念として治療成績が向上し医療費削減にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Estrogen receptor (ER)-positive breast cancer is both the most common (>70%) and least aggressive subtype of breast cancer⁴). These tumors also have a poor response to neoadjuvant chemotherapy. The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 gene (NRF2) plays important roles in cellular defense, tumor suppression, and oncogenesis. We have developed a simple and dependable single-tube reaction method, namely, the Eprobe-mediated polymerase chain reaction (PCR) method (Eprobe-PCR) for the screening and quantitative detection of fusion gene transcripts. The simplicity and high sensitivity of Eprobe-PCR may be suitable in a clinical setting that requires swift and accurate NRF2 detection. Taken together, SNP(c.-617C>A) of NRF2 is significantly associated with breast cancer risk but not with the survival of breast cancer patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 遺伝子多型 薬剤感受性 エストロゲンレセプター NRF2

1. 研究開始当初の背景

乳がんは、女性に最も多くみられるがんの一つである。乳がんには、年齢、遺伝子変異、家族歴、マンモグラフィ乳房密度、酸化ストレスなど、多くの危険因子が確立されている。乳がんの死亡率と罹患率は年々低下しており、生存率が徐々に上昇していることを示している。エストロゲン受容体(ER)陽性乳がんは、乳がんの中で最も一般的(>70%)であり、最も進行性の低いサブタイプでもある。これらの腫瘍は、術前補助化学療法に対する反応も不良である。そのためER陽性乳がんのバイオマーカーの開発を目指した。

NRF2遺伝子は、標的遺伝子の調節領域におけるいくつかの抗酸化応答要素(ARE)の発現を制御することにより、転写に関与している。重要なことは、がん細胞における持続的なNRF2シグナル伝達が、最終的に悪性の進行と治療抵抗性の発現を促進し、発がん性プログラムのオーケストレーションに役立つ可能性があることがよく認識されていることである。我々は、NRF2が非喫煙女性の肺腺がん患者の全生存率と関連していることを報告した。最近の研究では、NRF2 rs2886162 AA遺伝子型バリエーションが、化学療法または放射線療法を受けた患者の生存率の低下を独立して予測することが実証された。山本らは、2004年にNRF2の構造を初めて報告し、その制御領域に3つの一塩基多型(SNP)(-653A>G、-651G>A、および-617C>A)と1つのトリプレットリピート多型を発見した。Marzecらは、これらのSNPがNRF2発現の調節に及ぼす影響を示した。その結果、SNP -617C>Aは、一過性トランスフェクションアッセイにおいて、*in vitro*でNRF2レベルとNRF2機能に有意な影響を与えることがわかった。SNP -617C>Aは、ヒトにおけるオキシダント誘発性急性肺障害のリスクが高いことが報告されている。しかし、NRF2のSNP-617C>A(rs6721961)と乳がんリスクとの関連は、日本人集団では不明である。

我々は、融合遺伝子転写産物のスクリーニングと定量検出のために、簡便で信頼性の高いシングルチューブ反応法、すなわちEprobe媒介ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法(Eprobe-PCR)を開発した。Eprobeは、Eprobe一本鎖オリゴヌクレオチドの条件下で2つの色素部分を消光するハイブリダイゼーション依存性蛍光プローブであり、リアルタイムPCR装置を使用して、同じ反応チューブ内での連続定量PCRおよび融解曲線分析に適用できる。これにより、SNPの対立遺伝子特異的識別やゲノムコピー数多型の決定など、高感度で特異性の高いPCRアッセイの設計が可能になる。

2. 研究の目的

日本人において、NRF2のSNP(c.-617C>A)と乳癌患者および健康な対照被験者の乳がんリスクとの関連を検討する。さらに、NRF2はHO-1、CYP2A6など多くの酸素応答性遺伝子をトランス活性化することが報告されている。肺がん患者におけるCYP2A6遺伝子型とNRF2遺伝子型の間に強い関連があることを報告している。したがって、Eprobe-PCRによって検出されたNRF2のSNP(c.-617C>A)の遺伝子多型およびCYP2A6、HO-1の遺伝子多型と関連因子との関係について検討した。

3. 研究の方法

(1) 症例対照研究の対象

この症例対照研究には、神奈川県立がんセンターと理化学研究所との共同研究を行った。神奈川県立がんセンターにおいて1994年から2010年の間に、免疫組織化学的染色法によって決定されたエストロゲン受容体(ER)陽性サブタイプの乳がんの女性患者から、合計146例の乳がん患者がランダムに選択された。対照群は、横浜市立大学の先端医療研究センターのバイオバンク検体を使用し、乳がん患者と年齢が一致するがんの既往歴のない健康な女性101例であった。すべての患者と対照群は、この研究に参加するために書面によるインフォームドコンセントを実施。横浜市立大学ゲノム倫理委員会と神奈川県がんセンター倫理委員会が審査し、承認した(承認番号A200900002、Ethics-2019_82 September 2020)。NRF2、CYP2A6、HO-1のジェノタイプリングは、理化学横浜研究所と横浜市立大学の研究倫理委員会によって承認された。

(2) Eprobe とリアルタイム PCR の設計

SNP(c.-617C>A)のヒトNRF2特異的プライマーは、図1Aおよび124-bpのDNA断片に基づいているプライマーおよびプローブ設計ツール(Edesign)を使用して、すべてのプライマーおよびプローブを設計した。

(3) SNP/遺伝子変異解析

NRF2の遺伝子多型は、乳癌患者の末梢血抽出DNAおよび横浜市立大学内の先端医療研究センターバイオバンクから採取した健康者の血清からcfDNAを抽出しEprobe法を用いて解析した(図1B)。CYP2A6の遺伝子多型はwhole delationの検出用プライマーを使用した。

HO-1 の(GT)_n リピートを含む部分ゲノム DNA を PCR で増幅し、蛍光プローブ標識センスプライマー-p1-s および非標識アンチセンスプライマー-p1-as を用いて増幅した。これらのプライマーは、以前に報告された配列に従って設計した。得られた PCR 産物は、エチジウムブロマイドを含む 3% アガロースゲル中で電気泳動によって可視化された。

4. 研究成果

乳がん患者の平均年齢が 47.6 歳(31~58 歳)、対照患者の平均年齢が 46.3 歳(40~64 歳)であったことを示し有意差はなかった。

我々は NRF2 中の SNP(c.-617 C>A)を検出するための Eprobe-PCR 法を検証した。Eprobe-PCR 解析の結果から、対照群の遺伝子型の分布は、CC/CA で 88(87%)、AA で 13(13%)であった。対照的に、乳がん患者は CC/CA で 138 人(95%)、AA で 8 人(5%)であった。乳がん患者の遺伝子型分布は、対照群の遺伝子型分布と有意に異なっていた($P<0.040$ 、調整 OR = 2.55; 95% CI: 1.02-6.40) (表 1)。

NRF2 の遺伝子型(-617 CC、CA、または AA)と p ステージ($P=0.326$)、PR ステータス($P=0.347$)、HER2 ステータス($P=0.648$)、CYP2A6($P=0.393$)、HO-1($P=0.121$)、または補助療法($P=0.207$)との間に有意な相関は見られなかった。

表 2 において、無病生存期間および全生存期間の危険因子を決定するための多変量解析により、p 病期(Exp.(B)=3.044, $P<0.014$)および p-病期(Exp.(B)=3.124, $P<0.013$)が最も有意な因子であることが示された。しかし、NRF2 の SNP(c.-617 C>A)は無病生存期間と相関しなかった(Exp.(B)=2.780, $P<0.348$)および全生存期間(Exp.(B)=2.811, $P<0.012$)は、多変量解析によって決定された。Kaplan-Meier 解析では、NRF2 の SNP(c.-617 C>A)が無病生存期間($P=0.798$ 、ログランク検定)と全生存期間($P=0.828$ 、ログランク検定)をそれぞれ図 2A および図 2B に示した。

Figure 1A

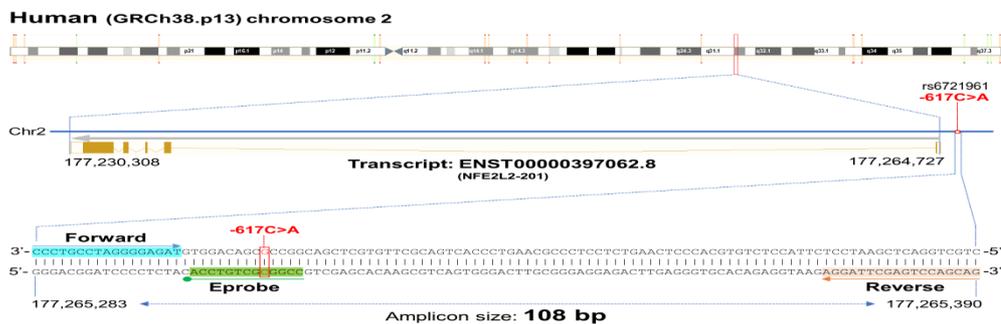


Figure 1B

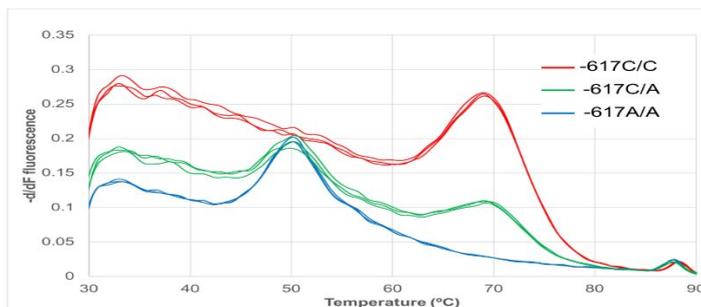


図 1. NRF2 の SNP(c.-617C>A)のプライマーセットと Eprobe デザイン

(A)フォワードプライマー、リバースプライマー、OP、および Eprobe プライマーのアニーリングサイトの模式図

(B)NRF2 の SNP ジェノタイピングのための Eprobe-PCR の温度に対して -dF/dT をプロットした融解曲線解析の結果。CC タイプと AA タイプの比率、100%CC タイプ、50%CC タイプ、50%AA タイプ、100%AA タイプは色で示されている

表 1. 乳癌患者および対照被験者における NRF2 遺伝子型および対立遺伝子頻度

パラメーター	乳がん患者	対照群	P 値 ¹
年齢	47.6±6.5	46.3±5.0	
CC (%)	76(52%)	52(52%)	
CA (%)	62(42%)	36(36%)	
AA (%)	8(6%)	13(13%)	0.103
CC/CA (%)	138(95%)	88(87%)	
AA (%)	8(5%)	13(13%)	0.040
CC (%)	76(52%)	52(51%)	
CA/AA (%)	70(48%)	49(49%)	0.929
C 遺伝子型(%)	214(73%)	140(69%)	
A 遺伝子型(%)	78(27%)	62(31%)	0.334

表 2 乳がん患者 146 例の無病生存期間および全生存期間の危険因子の多変量解析

変数	SE	p 値	経験値(B)	経験値(B)の 95% 信頼区間	
無病生存期間					
NRF2 ステータス(陽性/陰性)	1.090	0.348	2.780	0.328	23.560
P ステージ	0.453	0.014	3.044%	1.253	7.396
HO-1 ステージ	0.084	0.135	0.883	0.749	1.040%
PR ステータス (-/+)	0.753	0.102	0.292	0.067	1.279%
HER2 ステータス(-/+)	0.725	0.260	0.441	0.107	1.829%
全生存期間					
NRF2 ステータス(陽性/陰性)	1.092	0.344	2.811%	0.330	23.919
P ステージ	0.458	0.013	3.124	1.273	7.663
HO-1 ステージ	0.084	0.119	± 0.878	0.745	1.034
PR ステータス (-/+)	0.747	0.102	0.295	0.068	1.276%
HER2 ステータス(-/+)	0.717	0.256	0.443	0.109	1.804%

Figure 2 A

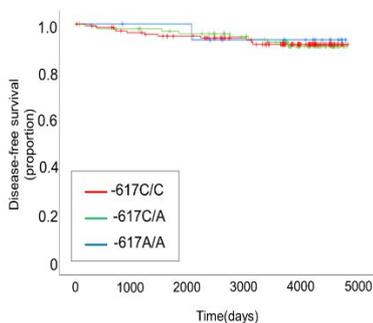


Figure 2 B

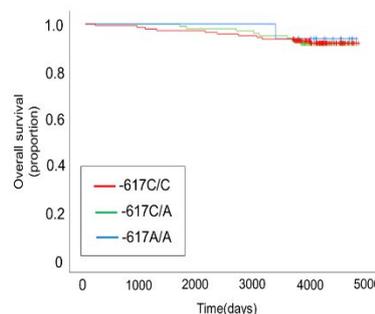


図 2 NRF2 遺伝子型(-617C/A)をもつ乳がん患者における Kaplan-Meier の無病生存曲線と全生存曲線 (A)無病生存期間。(B)全生存曲線

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 1件）

1. 著者名 OKANO Yasuko, USUI Kengo, HANAMI Takeshi, TAGURI Masataka, YAMASHITA Toshinari, MIYAGI Yohei	4. 巻 55
2. 論文標題 Association Between Polymorphisms of NRF2 and Breast Cancer Risk in Japanese Population	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Rinsho yakuri/Japanese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 67～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3999/jscpt.55.2_67	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野泰子
2. 発表標題 NRF2遺伝子多型：乳癌発症リスクに関する新規バイオマーカー
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野泰子
2. 発表標題 NRF2遺伝子多型は日本人集団における乳癌リスクに関する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野 泰子
2. 発表標題 NRF2遺伝子多型：乳癌発症に関する新規バイオマーカー
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野 泰子
2. 発表標題 NRF2遺伝子多型の解析 - 日本人集団における乳癌の新規予後予測バイオマーカー
3. 学会等名 第17回かながわ薬剤師学会大会
4. 発表年 2019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	市川 靖史 (ICHIKAWA YASUSHI) (70254208)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

	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
研究協力者	宮城 洋平 (MIYAGI YOUHEI) (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長 (82713)	
研究協力者	臼井 健吾 (USUI KENGO) (10525372)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ユニットリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------