

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15324

研究課題名（和文）TN乳癌におけるエクソソームmiRNAを用いた治療抵抗性機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of treatment resistance using exosomal miRNAs in TN breast cancers

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） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：TN乳癌において、術前化学療法施行前後の血清エクソソームmiRNA発現と治療効果及び予後を検討した。治療後にnon-pCRであった症例において、再発群、無再発群を選別し、マイクロアレイ解析で発現を比較した。その結果、43miRNAにおいて有意な発現パターンの相違を認めた。ネットワーク解析では“pathway in cancer”，“focal adhesion”，“cell cycle”，“MAPK signaling pathway”などが、non-pCRで再発を来した症例において同定された。既存の治療に抵抗性のTN乳癌においては、細胞周期調整阻害剤などの適応を考慮すべきである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TN乳癌においては、既存の化学療法が標準治療とされているが、治療効果予測因子が見出されておらず、再発を来す予後不良な症例も多い。今回、エクソソーム由来miRNAという簡潔でかつリアルタイムで測定できるLiquid biopsyの手法を用いて、治療効果が乏しく再発を来しやすいmiRNA群の同定を試みた。術前化学療法後の検体を用いた検討であり、既存の治療薬での変化や、抵抗性機序に解明につながる結果であり、今後の新規薬剤の考案などに有益な成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the association between expression of exosomal miRNAs and treatment efficacy and prognosis for TN breast cancer. We selected the patients with residual tumors (non-pCR) after neoadjuvant chemotherapy and compared the miRNA profile using microarray analysis between the patients with recurrence and no-recurrence. As a result, there were significant difference in miRNA profile for 43 miRNAs. In network analysis, “pathway in cancer”, focal adhesion”, “cell cycle”, and “MAPK signaling pathway were identified as the crucial pathways in patients with non-pCR who developed recurrence. Taken together, we should consider a novel therapeutic strategy such as cell cycle regulators for TN breast cancers refractory to chemotherapy as anthracycline and taxane-containing agent.

研究分野：Liquid biopsy

キーワード：エクソソーム miRNA Liquid biopsy

1. 研究開始当初の背景

近年、癌特異的診断マーカーとして、エクソソーム由来 miRNA が注目されており、「Liquid biopsy」の手段の一つとして有用性が期待されている。腫瘍組織を直接採取する生検に比べ、侵襲的でかつリアルタイムに測定できる利点がある。ただ、臨床検体を用いた予後因子、治療効果予測因子としての意義についての報告は少ないのが現状である。

乳癌の中でもホルモン受容体陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ (TN) 乳癌は、悪性度が高く、他のサブタイプに比べ予後不良なものが多い。既存の化学療法が現在標準治療とされているが、この化学療法の治療効果を予測するバイオマーカーの同定がされておらず、再発率の高い TN 乳癌に対する治療戦略の構築が重要な課題である。TN 乳癌においては、術前化学療法を行った症例において、病理学的完全寛解 (pCR) が得られた症例では、得られなかった症例に比べ有意に無病生存率が良好であることが様々な臨床試験から示されている (von Minckwitz G et al. J Clin Oncol, 2012)。このため、pCR を指標に様々なバイオマーカーの検索が行われている。

我々は、先行研究で術前化学療法を行った TN 乳癌において、pCR と関連のあるエクソソーム由来 miRNA 群の同定を行った。この結果、16 の miRNA で pCR 例において有意な発現変化が見られ、その中でも 4 つの遺伝子 (miR-4448、miR-2392、miR-2467-3p、miR-4800-3p) を組み合わせて構築したモデルの pCR 予測能は AUC 0.77 であった。

2. 研究の目的

上述のように、血液中のバイオマーカーはリアルタイムでの測定が可能であり、治療前後でその変化が見られることも多い。治療による変化はその薬剤の効果や抵抗性機序と関連がある可能性もあり、既存の治療以外の治療法の構築に有用である。更に、近年では、術前化学療法による効果 (pCR) によって、その後の治療を選択する residual-disease guided treatment の有用性が示唆されており、例えば HER2 陽性乳癌において pCR が得られなかった症例において T-DM1 へ術後治療を変更することで再発率が低下することが示されている (von Minckwitz G et al., N Engl J Med, 2019)。つまり、標準治療を行った後の変化をバイオマーカーとして治療選択に利用できる可能性がある。本研究ではこの miRNA 群の治療前後の変化を検討することを目的とした。TN 乳癌において、標準的な化学療法であるアンスラサイクリン系、タキサン系薬剤で術前化学療法を施行した症例で pCR が得られなかった症例 (non-pCR) で再発を来す症例を選別することを目的とする。これにより TN 乳癌において既存の治療薬に対する抵抗性メカニズムの解明、新規薬剤の構築につながると考える。

3. 研究の方法

アンスラサイクリン系、タキサン系抗癌剤を術前に少なくとも 6 サイクル施行した TN 乳癌を選別し、治療効果との関連を検討する。Non-pCR 例において再発群、無再発群におけるバイオマーカーの検索を行う。

術前化学療法後の保存血清 500uL を用いて、エクソソームを抽出した (ExoQuick (SBI))。抽出されたエクソソームは Nanosight LM10 及び Western blotting 法により CD63 抗体にて確認した。回収されたエクソソームより miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。さらに、各 miRNA 発現においては miScript system を用いて qRT-PCR 法で検討した。

さらに、術前化学療法で non-pCR であった症例の中で再発した群、無再発の群でエクソソーム miRNA プロファイルの変化を比較するために、10 例程度でマイクロアレイ解析にて miRNA 発現比較を行った (3D-Gene Human miRNA Oligo Chip, 東レ)。

4. 研究成果

(1) 術前化学療法を施行した TN 乳癌において、再発群 (8 名)、無再発群 (8 名) を含む 16 名の non-pCR 症例患者を後ろ向きに選別した。この 16 名において、再発群、無再発群において臨床病理学的因子を比較したところ、再発群では Ki67 labeling index が高い傾向にあった (中央値 88% vs 60%, $p = 0.064$)。その他の背景因子に有意な違いは認めなかった。治療後血清からエクソソーム由来 miRNA を抽出し、再発に関連がある miRNA 群を同定するため、マイクロアレイ解析を行った。Non-pCR でかつ再発を来した症例では、non-pCR で無再発例と比べ 43 miRNA で発現変化を認めた。このうち、15 遺伝子では発現上昇しており、28 遺伝子では発現低下を認めた (図 1)。

発現上昇していた遺伝子の中で、miR-195-5p が最も fold change が高く (4.43, p = 0.02)、発現低下していた遺伝子の中では miR-548ab がもっとも高かった (0.23, p < 0.001)。

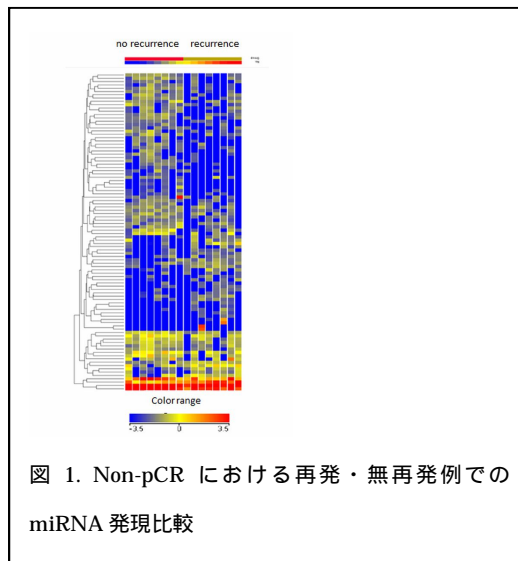


図 1. Non-pCR における再発・無再発例での miRNA 発現比較

(2) これら有意に発現変化が見られた 43 遺伝子において、どのような経路が TN 乳癌の治療抵抗性及び予後不良に関与しているか検討するために、Pathway 解析を行った (Diana Tool mirPath v.3 analysis, <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>)。non-pCR で再発を来す症例に関連が見られた主要な KEGG pathway を表 1 に示す

。

表 1. 43miRNA において Non-pCR, 再発例で関連がある 20 KEGG Pathway

KEGG pathway	p-value	number of genes	number of miRNAs
Pathways in cancer	1.67E-05	205	16
Epstein-Barr virus infection	0.000609499	108	16
Focal adhesion	0.007975254	104	16
Proteoglycans in cancer	7.85E-17	118	15
Protein processing in endoplasmic reticulum	6.33E-11	110	15
Viral carcinogenesis	6.33E-11	117	15
Cell cycle	9.00E-10	80	15
Hippo signaling pathway	5.70E-08	81	15
Oocyte meiosis	2.49E-05	64	15
Ubiquitin mediated proteolysis	4.18E-05	80	15
MAPK signaling pathway	0.020579636	118	15
Renal cell carcinoma	6.47E-06	44	14
RNA transport	0.000156208	93	14
Bacterial invasion of epithelial cells	0.000223901	46	14
mTOR signaling pathway	0.000234731	40	14
Sphingolipid signaling pathway	0.000267410	67	14
Endocytosis	0.000430289	109	14
HIF-1 signaling pathway	0.005019558	59	14

Spliceosome	0.011862044	68	14
Transcriptional misregulation in cancer	0.020622649	86	14

これらの中には、接着因子、細胞周期や MAPK 経路など癌の進行に関与するいくつかの経路が含まれていた。更に、mirTargetLing software (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>)を用いて、43miRNA が制御する可能性のある遺伝子の同定を試みた。この中で3つ以上の miRNA で制御され得る遺伝子を選別した(表2)。

表 2. 3 つ以上の miRNA で制御される遺伝子の内訳

Target genes	miRNAs
<i>BCL2</i>	hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-34b-3p
<i>CCND1</i>	hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-let-7f-5p
<i>CDK6</i>	hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-34b-3p
<i>MET</i>	hsa-miR-31-5p, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-7515
<i>VEGFA</i>	hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-34b-3p, had-miR-133a-3p
<i>WEE1</i>	hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p

これらの中で、miR16-5p、miR-195-5p が最も多くの遺伝子制御に関わる可能性が示唆されている。細胞周期に関与する遺伝子 (CCND1, CDK6) や、アポトーシスに関与するような遺伝子 (BCL2) などが同定されており、これらの経路や遺伝子発現が TN 乳癌の治療抵抗性と関連する可能性がある。実際、TN 乳癌の中には細胞周期調整阻害剤に感受性があるものが多いことも報告されており (Asghar US et al., Clin Cancer Res, 2017) 様々な CDK4/6 阻害剤を使用した研究が進行中である (Teo ZL et al., Cancer Res 2017, Cretella D et al., Sci Rep 2019)。

本研究により、既存の化学療法に治療効果が見られない症例 (non-pCR) において、特異的な miRNA 発現を示す患者に対しては、細胞周期チェックポイント阻害剤などを含めた代替治療薬の考案が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 未田 愛子
2. 発表標題 Triple negative乳癌におけるエクソソーム内miRNA発現と治療効果との関連
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 未田 愛子
2. 発表標題 Triple negative乳癌におけるエクソソーム由来miRNA発現と治療効果及び予後との関連
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 未田 愛子
2. 発表標題 Triple negative乳癌におけるエクソソーム内miRNA発現と治療効果との関連
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------