

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16290

研究課題名(和文) 乳癌術前薬物療法における血漿エクソソーム由来microRNAの有用性の検討

研究課題名(英文) Exosomal miRNA profiles for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

研究代表者

松本 暁子(Matsumoto, Akiko)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：70573418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性乳癌患者における術前化学療法(NAC)の治療効果予測因子としてのmicroRNA(miRNA)の有用性を検討した。Luminal、triple negative、HER2陽性症例の計98例において、NAC前後および手術1か月後に血漿サンプルを採取した。そのうちtriple negative症例30例のNAC前の血漿サンプルと健康人8例の血漿サンプルを用いて、治療効果モニタリングmiRNAパネルの検証を行った。その結果、miR-142-5p、miR-23a-3p、miR-19a-3p、miR-130a-3pは、非奏効群において奏効群および健康人と比較して有意に発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後更なる化学療法や分子標的薬の開発が進むことが予想される中で、治療効果予測バイオマーカーとしてのmiRNAの意義が示されれば、適切な治療対象群の絞り込みが可能となり、患者の有害事象の軽減、医療経済的な負担軽減につながる事が予想される。また、予後予測因子としては、pCRやki67など腫瘍組織における指標が用いられてきたが、血漿中miRNA発現の有用性が示されれば、術前治療開始前により低侵襲に予後予測が可能となる。本研究が個別化治療の実現に寄与し、乳癌の更なる治療成績向上につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the validity of exosomal miRNAs as biomarkers for the therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy (NAC) in patients with primary breast cancer. Plasma samples were collected before and after NAC and one month after surgery in 98 cases with luminal, triple-negative, and HER2 positive types. Microarray-based expression profiling of miRNAs derived from exosomes in prior-NAC plasma samples of 30 triple-negative patients and plasma samples of 8 healthy controls. In the miRNA microarray analysis, the exosomal miR-142-5p, miR-23a-3p, miR-19a-3p, and miR-130a-3p levels showed marked upregulation in the non-responding group as compared with the responding group and the healthy samples.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 microRNA エクソソーム 術前薬物療法 化学療法 内分泌療法

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性における最も罹患率の高い悪性腫瘍であり、世界中で年間 140 万人以上が新たに罹患している。薬物療法の進歩にも関わらず、約 30% が再発しており、毎年 45 万人以上が死亡している。現在、乳癌においては、免疫組織化学的方法 (IHC 法) により ER、PgR などのホルモン受容体 (HR) や HER2 などの発現を検索し、それらの組み合わせにより分類されたサブタイプによって内分泌療法や化学療法、分子標的療法などが選択されている。しかし、近年の網羅的遺伝子解析などにより、腫瘍組織内における遺伝子レベルでの差異、すなわち intratumoral heterogeneity の存在が注目されている。例えば、IHC 法で triple negative に分類される乳癌は、遺伝子発現によりさらに 7 つのサブタイプに分類され、術前化学療法による病理学的完全奏効 (pCR) 率もサブタイプごとに異なることが報告されている (Masuda H, et al. Clin Cancer Res. 2013)。このように、intratumoral heterogeneity が治療効果あるいは抵抗性と関連する可能性が考えられ、薬物療法が多様化している現在、適切な対象群の選択のためには、治療効果予測のための新たなバイオマーカーの開発が不可欠である。

近年、がん患者の血液や体液を用いた liquid biopsy が、従来から行われている腫瘍組織などからの侵襲的な生検と同等の有用性を持つ可能性が示唆され、かつ患者への負担の少ない検査法として期待されている。microRNA (miRNA) は非翻訳領域の約 20 数塩基からなる RNA であり、遺伝子転写発現制御により発生・細胞増殖・分化・アポトーシス・代謝などの生命事象に広く関与していることが明らかとなってきている。miRNA は体内で組織、体液のエクソソームに極めて安定的な形で存在しており、エクソソーム由来の miRNA が様々ながん種において、その発生および進行に関与していることが示され、新たなバイオマーカーとしての有用性が期待されている。

我々は、2012 年より自主研究「微量癌細胞およびマイクロ RNA を介した癌転移カスケードの解明と臨床的意義の検討」を開始し、大腸癌、肺癌、乳癌、胃癌、食道癌、膵癌、肝癌の組織、血液検体のバンキングを行ってきた。そして、これまでに大腸癌や肺癌、胃癌における miRNA と臨床病理学的因子および予後との関連性を報告してきた (Shibuya H, et al. Oncology 2010, Iinuma H, Watanabe T, et al. JCO 2011, Iinuma H, Ikeda T, et al. Br J Cancer 2012, Yokobori T, Cancer Res 2013, Iwaya T, et al. Clin Can Res 2013, Sugimachi K, et al. Ann Surg Oncol 2014, Fukushima Y, et al. Oncol Reports 2015, Mastumura T, et al. Br J Cancer 2015, Dejima H, et al. Oncol Letters 2016, Tsukamoto M, et al. Oncology 2017)。乳癌においては、浸潤癌、非浸潤癌、健常人の血漿エクソソーム miRNA を miRNA アレイにより解析し、浸潤癌の症例において、非浸潤癌および健常人と比較して miR-223 が有意に高発現であること、病期の進行とともに有意に発現が上昇することを明らかにした (Yoshikawa M, et al. Oncol Lett. 2018)。

これまで得られた知見から本研究においては、多様化している乳癌術前薬物療法における miRNA の有用性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

原発性乳癌においては、乳房温存率の向上や薬剤感受性の確認を目的に術前化学療法 (NAC) の適応が拡大してきている。特に悪性度の高い triple negative や HER2 陽性 type の乳癌では、NAC による病理学的完全奏効 (pCR) が予後予測因子となることが示されているが、non-pCR 症例に対する更なる治療成績の向上が課題となっている。

一方、比較的増殖能が低いとされる HR 発現陽性の luminal 乳癌の多くにおいては、術前・術後補助療法として内分泌療法が選択される。しかし、当初から内分泌療法に反応しない denovo 耐性や治療経過中に抵抗性を示す獲得耐性による再発が問題となっている。また、術前内分泌療法施行例における予後予測因子としては、増殖能マーカーである ki67 の可能性が示されており、術前内分泌療法開始後 2 週間時点の腫瘍における ki67 発現の高値群は低値群と比較して、有意に再発率が高いと報告されている (Dowsett M, et al. J Natl Cancer Inst. 2007)。ただし、ki67 は固定、染色、評価法における精度管理が課題となっており、治療開始前の ki67 値の効果予測因子としての有用性は確立されていない。

そこで本研究では、これまでに集積したサンプルおよび今後収集予定のサンプルを用いて、血漿中の miRNA を解析し、術前薬物療法の治療効果および予後との関連性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) NAC を施行した stage - 乳癌を対象とし、計 98 症例において NAC 開始前、NAC 終了後、手術終了 1 か月後に血漿サンプルを採取した。乳癌に対する治療歴のある症例、重複癌の症例は除外とした。また、健常人 8 人の血漿サンプルも採取した。研究参加については、事前に文書で

説明し本人から同意を得た。

(2) Triple negative 症例 30 例と健常人 8 人の血漿サンプルから超遠心(100,000 x g, 70 分)によりエクソソームを分離した。PBS で洗浄し、マイクロアレイおよび RT-qPCR 分析のために-80 で保存した。

(3) miRNeasy serum/plasma kit(Qiagen)を用いて、エクソソームから RNA を分離した。Agilent 2100 バイオアナライザ(Agilent Technologies)で電気泳動を行い、抽出した RNA の品質を確認した。

(4) エクソソーム由来の miRNA 発現プロファイルは、3D-Gene Human miRNA Oligo chip ver.22 (搭載プローブ数 2632, Toray) を使用して検証した。RNA を蛍光標識後、ハイブリダイゼーション(32 16 時間)を行い、3D-Gene Scanner (Toray) を用いてスキャンし分析した。各チップの数値データからバックグラウンド値を減算後、グローバルノーマライズ(チップ内シグナル強度の中央値を 25 に調整)により正規化した。

(5) エクソソーム由来の miRNA 発現を、TaqMan RT-qPCR (ThermoFisher Scientific) を行い分析した。エクソソームサンプルの内部コントロールとして、Cel-miR39 を用いた。miRNA 発現の相対的定量化は、Cq 法を用いて計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 患者背景

血漿サンプルが得られた全 98 例の患者背景を表 1 に示す。年齢中央値は、53.5 歳、T2 症例が最も多く(62.2%)、リンパ節転移陽性例は 42 例(42.9%)だった。サブタイプの内訳は luminal が 32.7%、triple negative が 30.6%、HER2 陽性が 13.3%、luminal/HER2 が 23.5%だった。

表 1. 患者背景

年齢	中央値(範囲)	53.5 (20-85)	
T stage	T1	17	17.3%
	T2	61	62.2%
	T3	10	10.2%
	T4	10	10.2%
リンパ節転移	あり	42	42.9%
核グレード	1	23	23.5%
	2	27	27.6%
	3	46	46.9%
	不明	2	2.0%
ER	陽性	52	53.1%
PgR	陽性	42	42.9%
HER2	陽性	36	36.7%

##### (2) triple negative 症例における miRNA 発現

Triple negative 症例 30 例のうち、NAC 奏効例(pCR が得られた症例)3 例、非奏効例(病理学的効果判定 Grade0 または 1a)3 例と健常人 3 人の血漿サンプルから抽出したエクソソームより、NAC の治療効果に関連する miRNA 発現プロファイル进行分析した(表 2)。miR-19a-3p、miR-130a-3p、miR-23a-3p、miR-142-5p は、NAC 非奏効群において、奏効群および健常人と比較して有意に発現が上昇していた。miR-23a-3p、miR-142-5p について、triple negative 症例 24 例と健常人 5 例で TaqMan RT-qPCR による miRNA 発現进行分析した。NAC 奏効の有無による有意差は認められなかった(miR-23a-3p : p=0.545、miR-142-5p : p=0.567)が、更に症例数を蓄積して更なる検証を行う予定である。

低侵襲に採取可能であるエクソソーム由来 miRNA 発現を解析し、乳癌の薬物療法の効果予測を行うことで、個別化治療に寄与し治療成績向上につながることを期待される。

表 2. NAC 非奏効例における miRNA プロファイル

miRNA	Fold-change (対奏効群例)	Fold-change (対健常人)
miR-19a-3p	5.54	7.14
miR-130a-3p	5.11	8.33
miR-23a-3p	4.15	6.67
miR-142-5p	4.05	9.09

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 3件）

1. 発表者名 Akiko Matsumoto
2. 発表標題 Predicting Axillary Pathologic response to Neoadjuvant Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer: Clinical predictive model by Using MRI and Ultrasound.
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Matsumoto
2. 発表標題 Omission of Axillary Dissection after Neoadjuvant Chemotherapy for Node-Positive Primary Breast Cancer.
3. 学会等名 European Breast Cancer Conference (EBCC 12) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Matsumoto
2. 発表標題 Validity of Omission of Axillary Lymph Node Dissection after Neoadjuvant Chemotherapy for Node-Positive Primary Breast Cancer
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
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
---------	---------