

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07456

研究課題名（和文）次世代シーケンサーと連動させたTN乳癌のパネル診断と組織解析

研究課題名（英文）TN breast cancer histological analysis using the next generation PCR to create cancer gene panel testing

研究代表者

小山 徹也（OYAMA, TETSUNARI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50233622

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）：前回の科研費によって培養細胞を使ったshRNA解析およびRNA sequence解析によりTN乳癌関連遺伝子を発見し、両方法で重複した7遺伝子が同定された。その候補を臨床検体の免疫組織学的解析およびCell Lineを用いた機能解析を加えた。TN乳癌の組織学的亜分類など形態学的所見への回帰が重要な目的であったが、解析がその複雑さのため、最終段階には至らなかった。しかし今後は、候補の多重染色解析とAIを用いた解析が必要であるという方針のもと、すでに研究を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TN乳癌は多様な種類の癌を含む一群で、ホルモン療法、分子標的療法抵抗性で、特に治療に関連した組織学的亜分類を見出すことが重要である。今回TN乳癌に関連する複数の遺伝子を見出し、臨床病理学的検討を加え、できればパネル診断まで発展できればと研究を進めた。今後の方針として、候補遺伝子の多重染色とAIを用いた解析が必要と考える。

研究成果の概要（英文）：The new molecular candidates targeting TNBC were selected from 23,609 genes using transcriptome analysis in breast cancer cell lines, shRNA library targeting the TNBC cell lines and a public database of transcriptome analysis in normal tissues. The seven candidates selected were associated with TNBC viability and expressed highly in TNBC cells compared with their expression in non TNBC cells and in normal tissues. Using the selected genes, we tried to create new "panel" diagnosis methods of TNBC and histological characteristics of the new classified TNBC.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 トリプルネガティブ 次世代PCR パネル診断 病理組織

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. 研究当初の背景

研究目的は、すでに前回の科学研究費によって培養細胞を使った shRNA 解析で TN 乳癌に特異的な 252 遺伝子、RNA sequence により 13 遺伝子が候補として、発見し、両方法で重複した遺伝子として CASP14 IGFBP3 ADAM1 CPA4 HMGA2 FBN2 KLK5 の 7 遺伝子が抽出された。次に候補遺伝子を tissue microarray を利用した臨床検体の免疫組織学的解析で臨床的意義が検索し、一方 Cell Line を用いた抑制実験、機能解析を加えて、Caspase 14 に関してはすでに一定の成果を得た。

2. 研究の目的

今回はさらにこれまでの候補遺伝子の解析を継続し、一方これらの蛋白を統合、分類し、これまでに得られた複数の候補遺伝子を統合して、機能解析及び形態学的知見への還元へと進むことを目的としている。最終的には研究者が初期の段階で行った TN 乳癌の組織学的亜分類のごとく、形態学的所見への回帰が一つの重要な目的である。

1) 候補遺伝子の機能解析には主に培養細胞を使った実験系を用いる。

2) 候補遺伝子の Tissue microarray (TMA) 使用した候補遺伝子の増殖能や浸潤・転移関連蛋白の免疫染色を利用した発現検索と臨床病理学的な検討

3. 研究の方法

今回の検討ではさらに CPA4, IGF2BP3, ADAM12, FBN2 に関して、論文化・学会発表を行い、一定の結果を得た。しかし当初の目的である候補遺伝子のグループ化と形態学的所見への還元に関する研究を未完成に終わった。TN 乳癌の組織学的亜分類など形態学的所見への回帰が重要な目的であったが、解析が最終段階には至らなかった。しかし今後の方針として、候補の多重染色解析と AI を用いた解析が必要であるという方針のもと、すでに研究を開始している。以下には個々のシーズの検討結果を掲載する。

4-1. 研究の成果

CASP14

[結果]

CASP14 は主に癌細胞質、核内で発現し非癌乳腺組織、間質細胞では低発現であった。また CASP14 高発現群は TNBC 症例で有意に多く、乳癌において高核異型度、EGFR、ALDH1、CD44 および CD24 と関連した。同様に TN 乳癌において、claudin1 発現、androgen receptor と関連した。CASP14 発現は乳癌患者の予後とは有意な相関がみられた。CPA14 は TN 乳癌の増殖と関連し、予後のマーカーとなる。

Carboxypeptidase A4 (CPA4)

[結果]

CPA4 は主に乳癌細胞の細胞質で高発現していた。TNBC 症例での解析では CPA4 高発現群は低発現群と比較して E-cadherin 低発現が多く EMT との関連が示唆され、stem cell marker である高 CD44 低 CD24 発現と相関した。CPA4 発現は有意に予後不良であった。培養細胞では CPA4 抑制によって、viability と migration が抑制され、E-cadherin 発現が上昇した。これらの結果は CPA4 の EMT inducer としての役割は示され、治療候補になる可能性がある。

IGF2BP3

[結果]

免疫染色で IGF2BP3 高発現群は TNBC 症例で有意に多く遺伝子検査の結果を検証できた。IGF2BP3 高発現群は低発現群と比較して ER、PgR、HER2 陰性、EGFR、CK5/6 高発現、Ki67 LI 高値症例が有意に多く、癌の悪性度との関連が示唆された。TNBC 特異的治療標の候補として IGF2BP3 を同定し、その発現意義を臨床検体で検証することができた。現在、乳癌細胞株での IGF2BP3 機能解析研究を含めて、さらに検討中する予定である。

Fibrillin 2 (FBN2)

【結果】

FBN2 は細胞外基質の糖タンパク質であるが、乳癌細胞の細胞質での発現が認められた。乳癌 213 症例において FBN2 高発現群は低発現群と比較して Ki67 LI が高値であった。また Vimentin や静脈侵襲との関連が認められ、予後に関しても低発現群と比べて不良であった。FBN2 は TGF β との相互作用が報告されており、乳癌における FBN2 の発現は増殖や転移に寄与していると考えられる。したがって FBN2 は予後不良マーカーとなる可能性がある。

4-2 研究の成果 関連論文

1: Handa T, Katayama A, Yokobori T, Yamane A, Horiguchi J, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Bao P, Gombodorj N, Altan B, Kaira K, Asao T, Kuwano H, Nishiyama M, Oyama T. Caspase14 expression is associated with triple negative phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients. *J Surg Oncol*. 2017 Nov;116(6):706-715. doi: 10.1002/jso.24705. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28570747.

2: Horigome E, Fujieda M, Handa T, Katayama A, Ito M, Ichihara A, Tanaka D, Gombodorj N, Yoshiyama S, Yamane A, Yamada K, Horiguchi J, Shinozuka K, Oyama T, Nishiyama M, Rokudai S. Mutant TP53 modulates metastasis of triple negative breast cancer through adenosine A2b receptor signaling. *Oncotarget*. 2018 Oct 2;9(77):34554-34566. doi: 10.18632/oncotarget.26177. PMID: 30349649; PMCID:PMC6195371.

3: Handa T, Katayama A, Yokobori T, Yamane A, Fujii T, Obayashi S, Kurozumi S, Kawabata-Iwakawa R, Gombodorj N, Nishiyama M, Asao T, Shirabe K, Kuwano H, Oyama T. Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Int J Oncol*. 2019 Mar;54(3):833-844. doi: 10.3892/ijo.2019.4675. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30628666; PMCID: PMC6365037.

2019 Mar;54(3):833-844. doi: 10.3892/ijo.2019.4675. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30628666; PMCID: PMC6365037.

4. 半田 正, 片山 彩香, 横堀 武彦, ゴンボドルジ・ナフチャ, 山根 有人, 川端 麗香, 藤井 孝明, 佐野 孝昭, 西山 正彦, 小山 徹也 Triple negative 乳癌における Carboxypeptidase A4(CPA4)発現の臨床的意義 日本病理学会会誌 107(1) 429-429 2018 年 4 月

5. 金澤 彩乃, 半田 正, 片山 彩香, 横堀 武彦, 山根 有人, 川端 麗香, 藤井 孝明, 佐野 孝昭, 西山 正彦, 小山 徹也 Triple negative breast cancer(TNBC)における新規治療標的候補 Fibriillin 2(FBN2)発現の臨床的意義 日本病理学会会誌 109(1) 494-494 2020 年 3 月

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Handa T, Katayama A, Yokobori T, Yamane A, Fujii T, Obayashi S, Kurozumi S, Kawabata-Iwakawa R, Gombodorj N, Nishiyama M, Asao T, Shirabe K, Kuwano H, Oyama T.	4. 巻 Mar;54(3)
2. 論文標題 Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 833-844.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4675.	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 -

1. 著者名 Hirakata T, Fujii T, Kurozumi S, Katayama A, Honda C, Yanai K, Tokuda S, Nakazawa Y, Obayashi S, Yajima R, Kaira K, Oyama T, Shirabe K.	4. 巻 Jun;181(2)
2. 論文標題 FDG uptake reflects breast cancer immunological features: the PD-L1 expression and degree of TILs in primary breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Res Treat.	6. 最初と最後の頁 331-338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-020-05619-0.	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 -

1. 著者名 Honda C, Kurozumi S, Katayama A, Hanna-Khalil B, Masuda K, Nakazawa Y, Ogino M, Obayashi S, Yajima R, Makiguchi T, Oyama T, Horiguchi J, Shirabe K, Fujii T.	4. 巻 Dec;15(6)
2. 論文標題 Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2414.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金澤彩乃 半田正 片山彩香 小山徹也 他
2. 発表標題 Triple negative breast cancer (TNBC)における新規治療標的候補Fibrillin 2 (FBN2)発現の臨床的意義
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 半田正 横堀武彦 片山彩香 金澤彩乃 尾林紗耶香 藤井孝明 調憲 小山徹也
2. 発表標題 乳癌サブタイプにおけるリン酸化STMN1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第33関東、甲信越支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒住 献, 本田 周子, 片山 彩香, 渡辺 由佳子, 関根 速子, 川端 麗香, 横堀 武彦, Graham Ball, 藤井 孝明, 浅尾 高行, 小山 徹也, 堀口 淳
2. 発表標題 AI診断の新たな展望 乳がんの分子病理学的特徴の解明のためのデジタルテクノロジーを用いた新たな医学研究手法の開発
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2021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	片山 彩香 (katayama ayaka) (60815695)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	

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