

令和 4 年 9 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09049

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌・機能性RNA統合理解による治療標的分子経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of therapeutic target molecular pathway by understanding tripli  
negative breast cancer and functional RNA integration

研究代表者

戸田 洋子(Toda, Hiroko)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：90814301

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)：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)の治療標的を見つけ出す事を目的に、マイクロRNAを起点とした解析を行った。マイクロRNA発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されているmiR-101-5pに着目した。The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベース解析から、miR-101-5pの発現抑制は、乳癌患者の予後に影響を与えている事を認めた。機能解析から、miR-101-5pは癌抑制型マイクロRNAである事を明らかにした。miR-101-5pの標的分子として、DNA複製に関与するGINS complex subunit 1 (GINS1)を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌患者の約20%を占めるトリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、明確な治療標的分子が見つかってない為、ホルモン療法や分子標的薬の治療効果が期待できない。その為、他のタイプの乳癌に比べ予後不良である。TNBC細胞の分子生物学的な特徴を明らかにし、治療法の開発に向けた基礎研究を行う事は社会的に重要である。

研究成果の概要(英文)：To identify therapeutic targets for triple-negative breast cancer (TNBC), we created microRNA (miRNA) expression signature using RNA-sequencing technology. Analysis of the signature revealed that expression of miR-101-5p was significantly reduced in breast cancer (BrCa) tissues. The Cancer Genome Atlas (TCGA) database showed that low expression of miR-101-5p predicted poor prognosis in patients with BrCa (overall survival rate:  $p = 0.0316$ ). Ectopic expression of miR-101-5p attenuated aggressive phenotypes, e.g. proliferation, migration, and invasion, in BrCa cells. We identified that GINS complex subunit 1 (GINS1) was directly regulated by miR-101-5p in BrCa cells. Knockdown assays showed that downregulation of GINS1 inhibited the malignant features of BrCa cells. Moreover, aberrant expression of GINS1 observed in BrCa clinical specimens, and high GINS1 expression significantly predicted poor prognosis in patients with BrCa (overall survival rate:  $P = 0.0126$ ).

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 トリプルネガティブ マイクロRNA miR-101-5p GINS1

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の乳癌患者は、年々増加しており（毎年7万人以上が罹患）、女性の癌罹患率の第1位であり、女性の癌罹患全体の20%を占める。日本における乳癌の生涯罹患率は9%で、11人に1人が乳癌になると推定さる。欧米では生涯罹患率は5-10人に1人とされており、欧米とほぼ同じ程度になってきている。

乳癌は、分子生物学的な特徴から、幾つかのサブタイプに分類（ルミナルA、ルミナルB、ホルモン受容体陽性・HER2陽性、ホルモン受容体陰性・HER2陽性、トリプルネガティブ）され、その分類に基づき最適な治療法が提供される。この中で、乳癌患者の約20%を占めるトリプルネガティブ乳癌（TNBC）は、明確な治療標的分子が見つからない為、ホルモン療法や分子標的薬の治療効果が期待できない。また、TNBCは再発の頻度が高く、再発例では他のサブタイプの患者より明らかに予後が不良である。TNBCにおける治療標的分子を見つけ出す事は、患者の予後改善に不可欠である。

ヒトゲノムプロジェクトの研究成果として、ヒトゲノム中には、蛋白をコードしないRNA分子が存在し、実際に細胞内で機能している事が判明した。このようなRNA分子は機能性RNAと呼ばれ、現在、機能性RNA分子に対する研究が世界規模で行われている。マイクロRNAは、機能性RNAの1種であり、19~23塩基程度の1本鎖RNA分子である。マイクロRNAの特徴は、1種類のマイクロRNAが、極めて多くの蛋白コード遺伝子の発現を制御している事である。そのため、マイクロRNAの発現異常が、細胞内の分子ネットワークの破綻を誘発し、ヒト疾患の原因となっている事が明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究では、TNBCを含む乳癌患者の臨床検体を用いて、RNAシーケンスにより「乳癌・マイクロRNA発現プロファイル」を作成し、マイクロRNAを起点とした解析から、TNBCの治療標的分子を探索する事を目的とした。

- (1) マイクロRNA発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されているマイクロRNAを探索し、その癌抑制機能を明らかにする。
- (2) マイクロRNAが制御する遺伝子（群）を探索し、その中から、TNBC細胞の増殖や浸潤に関与する遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

- (1) RNAシーケンスによりマイクロRNA発現プロファイルを作成した。
- (2) マイクロRNAおよび標的遺伝子の発現は、The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースを用いて解析した。
- (3) マイクロRNAが結合する可能性のある遺伝子について、TargetScan database (release 7.2)と、遺伝子発現データを組み合わせて探索した。
- (4) マイクロRNAおよび標的遺伝子の機能解析は、LUSQ細胞株に、マイクロRNAまたは

siRNA (small interfering RNA) を核酸導入し、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を検討した。

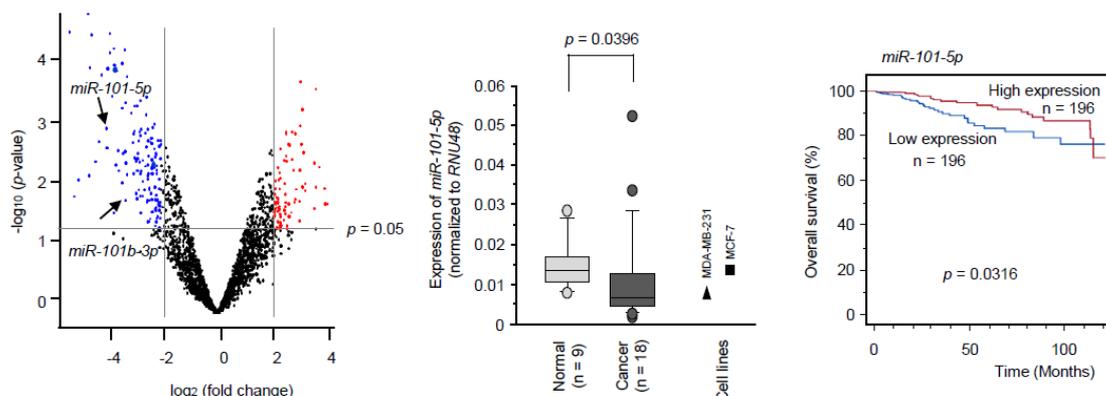
#### 4. 研究成果

##### (1) RNA シークエンスによる「乳癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」の作成

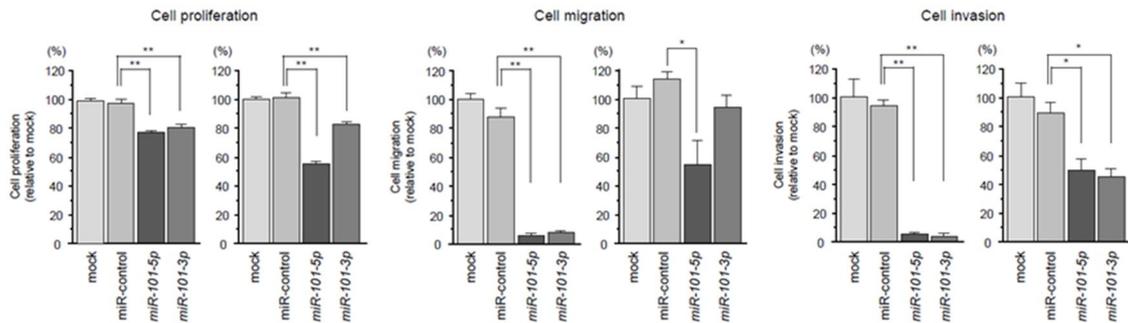
TNBC を含む、乳癌患者検体 15 例と正常乳腺組織 5 例について、RNA シークエンスにより「乳癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。解析の結果、癌組織において、64 種類のマイクロ RNA の発現が抑制されていた。特筆すべき点は、11 種類のマイクロ RNA は、マイクロ RNA の前駆体から派生するガイド鎖とパッセンジャー鎖が、癌組織において、共に発現抑制されていた点である。これまでのセオリーでは、マイクロ RNA の生合成において、ガイド鎖のみが、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、標的遺伝子の発現制御を行う。それに対して、パッセンジャー鎖は分解されて機能を有しないとされている。本研究では、マイクロ RNA 発現プロファイルから miR-101-5p (パッセンジャー鎖) に着目し、乳癌細胞における機能解析を施行した。

##### (2) TNBC 細胞における miR-101-5p の機能解析

プロファイルを検証するため、新たに、乳癌組織 10 症例と正常組織 9 例について、PCR で発現を調べた。その結果、miR-101-5p は、miR-101-3p (ガイド鎖) と共に、癌組織で発現抑制されている事を確認した。更に、TCGA データベース解析から、これら 2 種類のマイクロ RNA の低発現は、患者の予後に影響を与えている事が明らかとなった。



次に、乳癌細胞株 (MDA-MB-231 および MCF-7) に miR-101-5p を核酸導入する事により、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。これらの事から、miR-101-5p は、乳癌細胞において、癌抑制型マイクロ RNA として機能している事が明らかとなった。

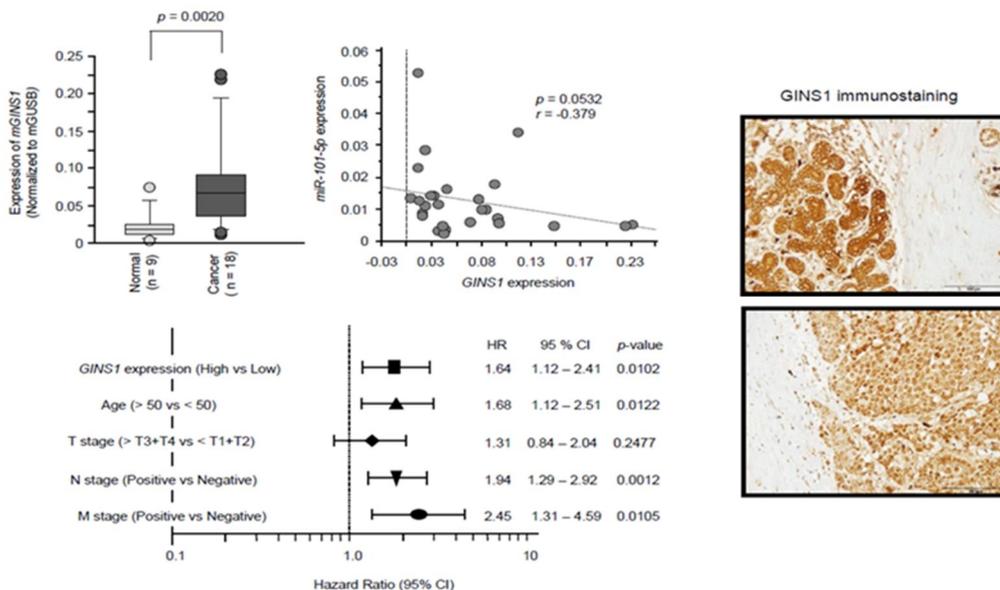


### (3) miR-101-5p が制御する癌側隠遺伝子の探索

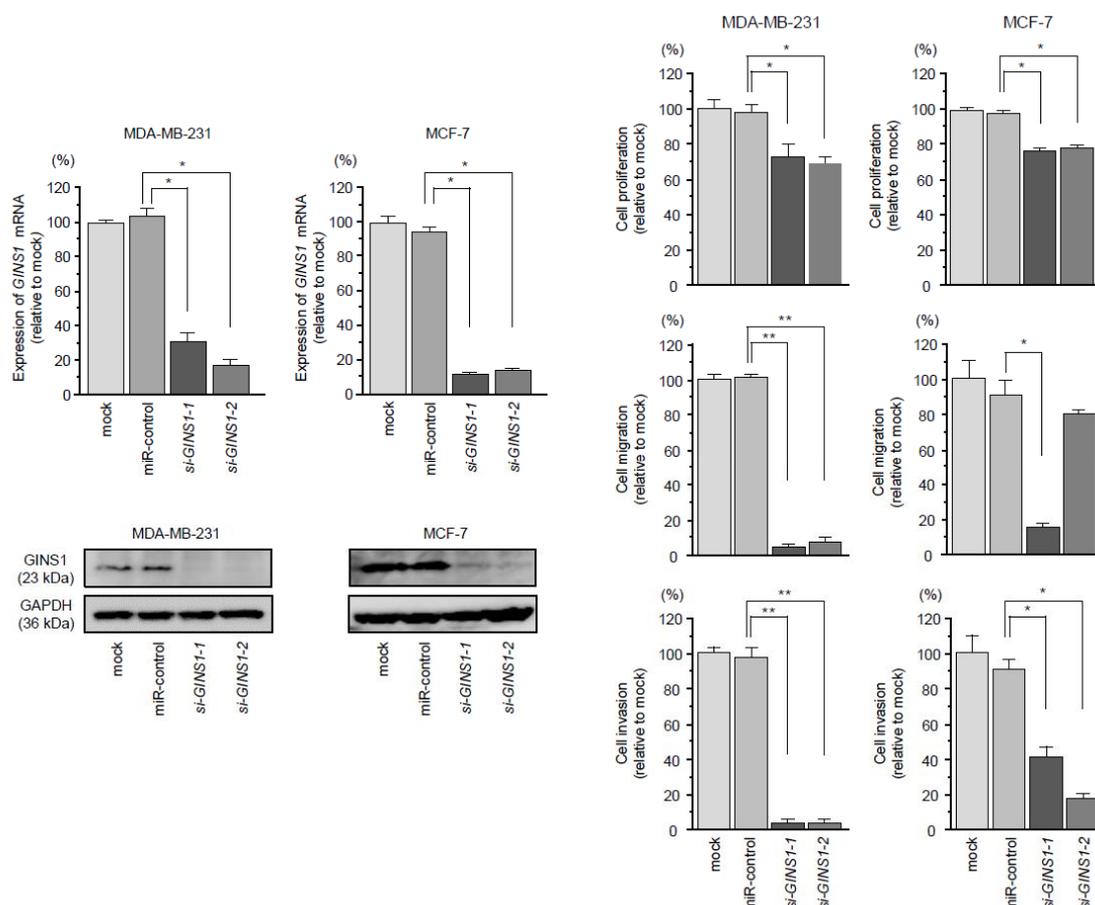
パッセンジャー鎖である miR-101-5p が、乳癌細胞において癌抑制機能を有している事は新しい発見である。そこで、乳癌細胞において、miR-101-5p が制御する遺伝子について探索を行った。探索の条件は、遺伝子の 3'UTR 領域に、miR-101-5p の結合配列を有する事。乳癌組織で発現が上昇している事である。その結果、104 種類の遺伝子が候補になった。更に、TCGA データベース解析から、7 種類の遺伝子 (HMGB3、ESRP1、GINS1、TPD52、SRPK1、VANGL1、MAGOHB) の高発現が、患者の予後に影響を与えている事が明らかとなった。

### (4) TNBC 細胞における GINS complex subunit 1 (GINS1)の機能解析

7 種類の遺伝子の中で、乳癌との関連が殆ど報告されていない GINS1 に着目し、乳癌細胞における機能解析を施行した。GINS1 は、DNA 複製に關与する遺伝子である。乳癌臨床検体で、GINS1 の発現を調べた結果、癌組織において有意に発現が亢進しており、miR-101-5p の発現と負の相関が認められた。また、多変量解析の結果、GINS1 の発現は、乳癌患者の独立した予後予測因子である事が明らかとなった。また、乳癌組織に対して、GINS1 の免疫染色を施行した結果、癌部に強い染色を認めた。



次に、乳癌細胞株 (MDA-MB-231 および MCF-7) に対して、small interfering RNA を用いて GINS1 の発現をノックダウンし、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について解析を行った。その結果、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。これらの事から、GINS1 の発現異常は、乳癌細胞の悪性化を促進する機能を有している事が明らかとなった。



## (5) 研究のまとめ

TNBC を含む、乳癌患者検体を用いて、RNA シークエンスにより「乳癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。プロファイルに基づき、miR-101-5p (パッセンジャー鎖) に着目し、癌抑制型マイクロ RNA である事を明らかにした。miR-101-5p が制御する癌促進型遺伝子として、7 種類の遺伝子 (HMGB3, ESRP1, GINS1, TPD52, SRPK1, VANGL1, MAGOHB) を探索した。その中で、DNA 複製に関与する GINS1 は、乳癌組織で発現が亢進しており、その高発現は、乳癌患者の独立した予後予測因子であった。また、small interfering RNA から、GINS1 の高発現は、乳癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を促進する事を明らかにした。癌抑制型マイクロ RNA を起点として、乳癌の分子ネットワークの探索が可能であった。今回、RNA シークエンスで作成した「乳癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づく解析により、本疾患の分子病理の理解が加速すると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Shinden Yoshiaki, Hirashima Tadahiro, Nohata Nijiro, Toda Hiroko, Okada Reona, Asai Shunichi, Tanaka Takako, Hozaka Yuto, Ohtsuka Takao, Kijima Yuko, Seki Naohiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of breast cancer: impact of miR-99a-5p and miR-99a-3p regulation on oncogenic genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 519 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00865-y	査読の有無 無
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 Kijima Yuko, Hirata Munetsugu, Higo Naotomo, Toda Hiroko, Morise Zenichi, Shinden Yoshiaki, Natsugoe Shoji	4. 巻 50
2. 論文標題 Oncoplastic breast surgery combining partial mastectomy with a triangular skin resection and re-centralization of the nipple-areola	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1707 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02041-3	査読の有無 無
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 Kijima Yuko, Hirata Munetsugu, Higo Naotomo, Toda Hiroko	4. 巻 -
2. 論文標題 Oncoplastic breast surgery combining partial mastectomy with V-rotation mammoplasty for breast cancer on the upper inner area of the breast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02152-x	査読の有無 無
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 Toda Hiroko, Seki Naohiko, Kurozumi Sasagu, Shinden Yoshiaki, Yamada Yasutaka, Nohata Nijiro, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Maemura Kosei, Fujii Takaaki, Horiguchi Jun, Kijima Yuko, Natsugoe Shoji	4. 巻 14
2. 論文標題 RNA sequence based microRNA expression signature in breast cancer: tumor suppressive miR 101 5p regulates molecular pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 426 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12602	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 戸田 洋子、黒住 献、新田 吉陽、平田宗嗣、肥後直倫、藤井 孝明、堀口 淳、喜島祐子
2. 発表標題 マイクロRNA発現プロファイルに基づく トリプルネガティブ乳癌の 機能性RNAネットワーク解析
3. 学会等名 乳癌学会 中部地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroko Toda, Sasagu Kurozumi, Yoshiaki Shinden, Munetugu Hirata, Naomichi Higo, Takaaki Fujii, Jun Horiguchi, Yuko Kijima1
2. 発表標題 The microRNA expression signature in TNBC based on Next Generation Sequencer: Impact of miR-204-5p regulatory networks
3. 学会等名 藤田医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田 洋子
2. 発表標題 マイクロRNA発現プロファイルに基づくトリプルネガティブ乳癌の機能性RNAネットワーク解析
3. 学会等名 日本乳癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田 洋子
2. 発表標題 NGSによるTNBC・マイクロRNA発現プロファイルの作成：miR-204-5pが制御する癌促進型遺伝子の検索
3. 学会等名 日本癌転移学会
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
研究分担者	新田 吉陽  (Shinden Yoshiaki)  (20725733)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員   (17701)	
研究分担者	関 直彦  (Sekino Naohiko)  (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授   (12501)	
研究分担者	喜島 祐子  (Kijima Yuko)  (60381175)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	
研究分担者	夏越 祥次  (Natsugoe Shouji)  (70237577)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	

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