

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18065

研究課題名（和文）増殖因子受容体経路を標的としたホルモン療法抵抗性乳癌に対する革新的治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Therapeutic Agent for Hormone-Resistant Breast Cancer by Targeting the Growth Factor Receptor Pathway

研究代表者

久田 知可（HISADA, TOMOKA）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：30781835

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）：長期フォローアップを行った乳癌症例を対象としてRIN1遺伝子mRNAの発現と臨床病理学的因子および予後との検討を行った。RIN1の発現低下が全乳癌症例、またER陽性乳癌症例において有意差を持って予後不良であった。またER陰性乳癌や、トリプルネガティブ乳癌では有意差を認めなかった。仮説に転移との関連を立てたが、腋窩リンパ節転移陽性例とRIN1の発現には関連性を認めず、予後（DFS・OS）にも、関連を認めなかった。ホルモン療法の抵抗性に関してはタモキシフェンとアロマターゼ阻害薬に分けて解析したところ、アロマターゼ阻害薬の投与症例において、RIN1の発現低下は生存期間の短縮と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RIN1がER陽性乳癌の転移遊走能とホルモン療法抵抗性に影響しているのではないかと仮説のもと本研究が計画したが、RIN1発現と腋窩リンパ節転移の有無に関連を認めなかった。ホルモン療法の抵抗性の解析では、臨床的に一般的に使用されるアロマターゼ阻害薬投与症例においてRIN1発現と全生存期間に相関を認めたため、その原因について検討する予定である。

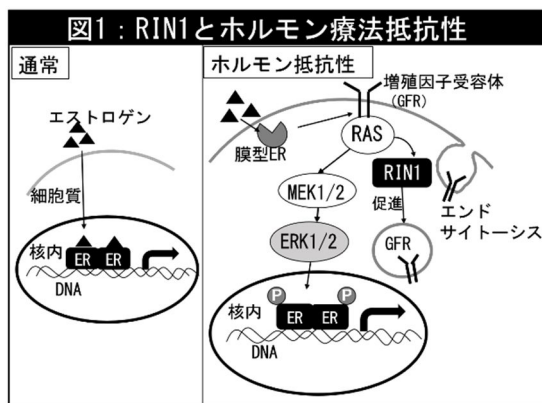
研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between RIN1 mRNA expression and clinicopathological factors and prognosis in breast cancer patients with long-term follow-up. As in previous reports, decreased RIN1 expression was associated with significantly poorer prognosis in all breast cancer patients and in ER-positive breast cancer patients. No significant difference was observed in ER-negative or triple-negative breast cancer. The hypothesis of an association with metastasis was formulated, but no association was found between axillary lymph node-positive cases and RIN1 expression, nor was there any association with prognosis (DFS/OS). Regarding resistance to hormone therapy, we analyzed the results separately for tamoxifen and aromatase inhibitors, and found that lower RIN1 expression was associated with shorter survival in patients treated with aromatase inhibitors.

研究分野：ER陽性乳癌

キーワード：RIN1 ER陽性乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳がんは、日本人女性が最も多く罹患する悪性疾患であり、死亡数も増加の一途をたどっている。乳がんの約80%は、エストロゲン受容体(ER)を発現し、エストロゲン依存性に増殖する。ここで問題なのは、ER陽性乳がんの約30%の症例は、ホルモン療法の効果がきわめて低く予後不良であることで、このホルモン療法抵抗性を示すER陽性乳がんに対する治療成績の向上が喫緊の臨床課題となっている。



最近、乳がん組織において、がん遺伝子 Ras の下流シグナルに関与する遺伝子である RIN1 (Ras and Rab interactor 1) の発現が低下しているものがあることが報告された(図1)。Rasは、「増殖因子受容体シグナル経路」に関与する重要な因子である。ER陽性乳がんにおけるホルモン療法抵抗性のメカニズムにおいて、「増殖因子受容体シグナル経路」が重要と考えられている。

膜型ERが何らかの原因で活性化すると、細胞膜に存在する増殖因子受容体を介して、その下流シグナル経路(Ras MEK1/2 ERK1/2)が活性化される。その結果として、核内ERがリン酸化を受けて、ERの転写が活性化される。

RIN1は、増殖因子受容体の「エンドサイトーシス」を促進することで、増殖因子受容体を減らして、がん細胞の増殖を抑制する働きをする(図1)。さらに、RIN1は、チロシンキナーゼの活性化により、がん細胞の細胞解離・遊走能の獲得を抑制することで、がん細胞の浸潤を抑制することも報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、RIN1遺伝子を標的とした、乳がんに対する新たな分子標的治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象患者と腫瘍組織：1992～2008年の間に当院にて手術を施行した原発性乳癌625例の乳癌組織を用いてFBP1 mRNAの発現解析を施行した。これらの症例のフォローアップ期間中央値は9.0年(1.0-194.4ヶ月)であった。

(2) 定量的RT-PCT法：mRNA発現解析は、7500 Fast Real-time PCR Systemを用いて、TaqMan Gene Expression assays (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。二重定量RT-PCRアッセイは、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いて実施した。反応は、LLGL2またはSLC7A5用のFAM標識プローブ(Thermo Fisher Scientific)およびGAPDH用のVIC標識プローブ(Thermo Fisher Scientific)を用いて、各サンプルについて単一アッセイとして解析された。

(3) エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2に対する免疫組織化学法：パラフィン包埋標本ブロックを用いて、ER、PgR、HER2のタンパク発現の解析を行った。ER、PgRの発現の評価は、Allred法にて行った。HER2発現は、HercepTestスコア法を用いて評価した。

(4) 統計解析：生存曲線は、Kaplan-Meier法にて解析し、log-rankテストにて評価した。無病生存期間(DFS: disease-free survival)について、もし患者が無再発で生存している場合は最終来院日をもって「打ち切り」とした。全生存期間(OS: overall survival)については、患者よびFisher's exact probability testにて行った。また、単変量および多変量解析は、Cox比例ハザードモデルを用いて行った。統計解析ソフトは、jmpを使用した。

4. 研究成果

(1) RIN1 mRNA発現と臨床病理学的因子との相関：

最初に、RIN1 mRNA発現レベルと乳がんの予後について検討した。対象とした乳癌症例429例。

RIN1 発現低下はエストロゲンレセプター (ER) の発現と、HER2 の発現に関連していた。ER 陽性乳癌 333 例においても同様に、RIN1 低発現症例は、組織悪性度が高く、HER2 陽性の割合が高かった。腋窩リンパ節転移に関しては発現に偏りを認めなかった。また、乳癌のサブタイプ別での検討では、いずれにも差を認めなかった。

Table1: Patients characteristics in all breast cancer patients

		RIN1		P value
		Low n (%)	High n (%)	
Patients		146	283	
Menopausal status	Pre	59 (41)	128 (45)	0.24
	Post	87 (54)	150 (53)	
	Unknown	0	5 (2)	
Tumor size	≤2cm	49 (34)	104 (37)	0.51
	>2cm	97 (66)	179 (63)	
Nodal status	Negative	67 (48)	150 (63)	0.12
	Positive	71 (49)	110 (39)	
	Unknown	8 (5)	23 (8)	
Grade	1+2	68 (47)	162 (58)	0.0005
	3	77 (52)	116 (40)	
	Unknown	1 (1)	5 (2)	
Histology	IDC	133 (91)	247 (87)	0.60
	ILC	4 (3)	13 (5)	
	Others	9 (6)	22 (7)	
	Unknown	0	1 (1)	
ER status	Positive	101 (70)	232 (82)	0.0026
	Negative	45 (30)	51 (18)	
	Unknown	0	0	
HER2 status	Positive	23 (16)	27 (10)	0.04
	Negative	120 (83)	235 (83)	
	Unknown	1 (1)	21 (7)	
Adjuvant therapy	ET alone	44 (25)	125 (44)	
	CT alone	36 (30)	45 (16)	
	ET+CT	54 (37)	93 (33)	
	None	8 (5)	18 (6)	
	Unknown	4 (3)	2 (1)	

ERα, estrogen receptor α; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ET, endocrine therapy; CT, chemotherapy.
P<0.005 was considered statistically significant

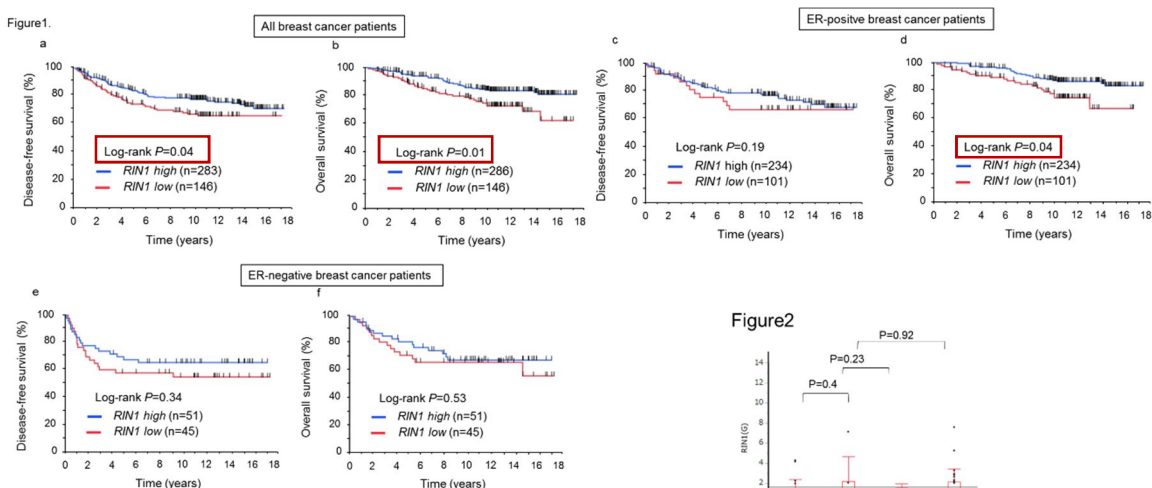
Table2: Patients characteristics in ER-positive breast cancer patients

		RIN1		P value
		Low n (%)	High n (%)	
Patients		101	232	
Menopausal status	Pre	46(46)	111 (48)	0.77
	Post	55 (54)	119 (51)	
	Unknown	0	2 (1)	
Tumor size	≤2cm	37 (37)	89 (39)	0.76
	>2cm	64 (63)	143 (61)	
Nodal status	Negative	48 (48)	118 (51)	0.22
	Positive	49 (29)	93 (40)	
	Unknown	4 (3)	21 (9)	
Grade	1+2	56 (56)	152 (65)	0.015
	3	44 (43)	77 (33)	
	Unknown	1 (1)	3 (2)	
Histology	IDC	91 (90)	205 (88)	0.83
	ILC	4 (4)	13 (6)	
	Others	6 (6)	13 (6)	
	Unknown	1 (1)	0	
PgR status	Positive	86 (85)	198 (85)	0.96
	Negative	15 (15)	34 (15)	
	Unknown	0	0	
HER2 status	Positive	10 (10)	15 (6)	0.04
	Negative	91 (90)	201 (87)	
	Unknown	0	16 (7)	
Adjuvant therapy	ET alone	43 (42)	122 (53)	
	CT alone	4 (4)	13 (6)	
	ET+CT	49 (49)	82 (35)	
	None	1 (1)	14 (6)	
	Unknown	4 (4)	1 (1)	

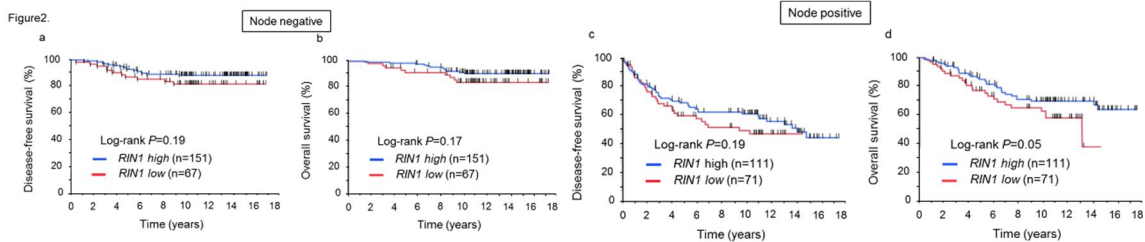
PgR, progesteron receptor; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ET, endocrine therapy; CT, chemotherapy.
P<0.005 was considered statistically significant

(2) RIN1 mRNA 発現と乳癌の予後： Figure 1 に示すように、全乳癌(a, b)および ER 陽性(c, d)、ER 陰性症例(e, f)を対象として、カットオフ値を high:low = 2:1 として検討した結果、全乳癌を対象とした検討において、RIN1 低発現群において DFS および OS が短く、ER 陽性において OS が短かった。これは ER 陰性では差を認めず RIN1 の低発現が ER 陽性乳癌の予後因子となる可能性が示唆された。

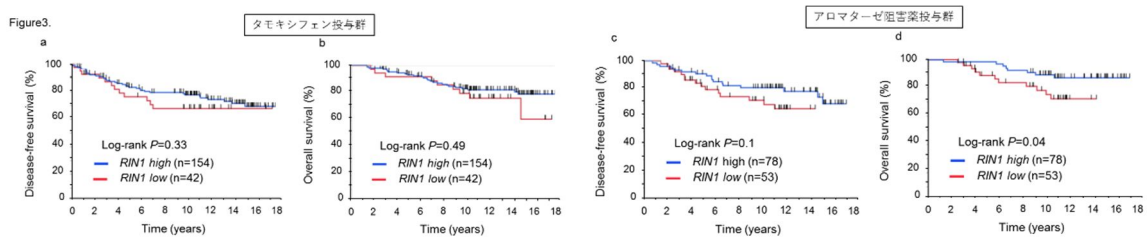
各サブタイプ別に RIN1 の発現を検討した結果は Figure2 に示す。各サブタイプ別では特にそれぞれに発現の程度は差を認めない結果であった。



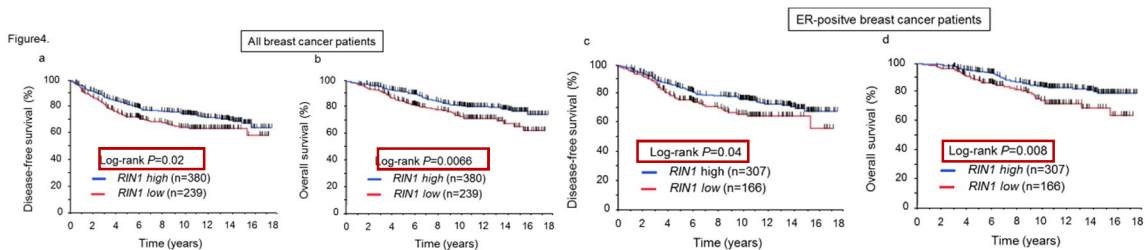
既報告で、RIN1 はがん細胞の遊走能を抑制することに言及されていたので、続いてリンパ節転移の陽性症例と陰性症例において検討を行った。その結果は Figure2 に示すが、特に有意差を認めなかった。



ホルモン療法の抵抗性を調べるために、タモキシフェン投与群(a, b)とアロマターゼ阻害薬(c, d)の投与群に分けて検討を行った。いずれの薬剤も使用歴がある症例を解析対象として含めた。タモキシフェン投与症例の検討では DFS も OS も RIN1 発現で有意な差を認めず、アロマターゼ阻害薬投与症例の検討において下記に示すように、OS 有意な差をみとめた。DFS に統計学的な差を認めなかったが、RIN1 低発現群で予後は不良な傾向があり、症例数が少ないことが原因であったかもしれない。



上記結果を踏まえ、症例を増やして検討をおこなった。(N=619)
症例数を増やした検討したところ、全乳癌の DFS/OS とともに RIN1 低発現の予後は不良で有り、ER 陽性乳癌においても同様の結果を認めた。



(3) まとめ

RIN1 がホルモン療法抵抗性に関与しているという仮説のもと本研究を計画した。本研究で RIN1 の低発現が ER 陽性乳癌の予後不良因子であることを突き止めた。また、RIN1 の低発現は、ホルモン療法の中でもアロマターゼ阻害薬に対する抵抗性に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------