

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591899

研究課題名(和文) 乳癌におけるCRMPの発現と臨床病理学的因子との相関の検討

研究課題名(英文) Investigation of the biological significance of collapsin response mediator protein (CRMP) in breast cancer

研究代表者

石川 孝 (Takashi, Ishikawa)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：80275049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：CRMP1からCRMP5までの5つのサブタイプの内、CRMP2 mRNAのみが正常乳腺と乳癌でその発現に差を認め、乳癌において有意に発現低下を認めた。ティッシュマイクロアレイ173例のIHCでは、乳癌においてCRMP2の発現低下とリン酸化型CRMP2発現の上昇を認めた。また乳癌の臨床病理学的因子との相関の検討では、悪性度が高いとされる組織学的グレードの高い乳癌およびトリプルネガティブの乳癌において核内のリン酸化型CRMP2の発現が特に上昇する傾向を認め(た $p < 0.001$ )。CRMP2の低下とリン酸化型CRMP2の上昇は乳癌のprogressionに関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression of CRMP2 mRNA was significantly decreased in breast cancer tissues, while that of the other CRMPs was similar between normal and breast cancer tissues. Immunohistochemistry revealed that CRMP2 protein expression was also decreased in breast cancer tissues ( $P < 0.001$ ). Phosphorylated CRMP2 was observed in the nuclei of breast cancer cells but not in normal mammary cells ( $P < 0.001$ ). Furthermore, nuclear phosphorylated CRMP2 expression was increased in proportion to the histological grade and triple-negative subtype. Reduced CRMP2 expression and elevated expression of nuclear phosphorylated CRMP2 may be associated with breast cancer progression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：CRMP2 リン酸化型CRMP2 乳癌 乳腺 タキサン

1. 研究開始当初の背景

1995年に分子量62kDaのCRMP-62を同定して以来(Nature 376:509-14,1995), CRMPは、神経細胞軸索退縮因子である分泌型蛋白セマフォリンの細胞内シグナル伝達を媒介する分子として盛んに研究が行われてきた。哺乳類におけるCRMPsは現在までにCRMP1~5までの5つのサブタイプが単離・同定されており、特にCRMP-2はCRMPsファミリーの中で最もユビキタスに神経組織で発現しており、この発現は、神経細胞分化の初期過程では大部分の神経細胞に認められる。またCRMPsはGSK3、Cdk5によりリン酸化され、セマフォリン情報伝達を媒介することが知られている。CRMPsの生物学的動態には未解決な部分も多いが、CRMPsが神経細胞の極性形成や軸索の伸展を制御する細胞内蛋白の一つとして、中枢神経組織の分化発達において重要な役割を果たしている報告が多数みられ(Adv Exp Med Biol 600:1-11,2007) 神経学的分野においてその詳細な分子機構の解明が進んでいる。神経学的分野において研究が盛んなCRMPsであるが、近年、CRMPsが癌の診断、悪性度や予後に関連しているとの報告が散見される。Shih JYらは肺非小細胞癌の浸潤抑制因子としてCRMP1を報告しており、CRMP1 mRNA発現量は肺非小細胞癌の予後に影響を与える因子であると報告している(J Natl Cancer Inst 93:1392-400,2001)。またChih-Ching Wuらは、CRMP2の大腸癌における診断的バイオマーカーとしての有用性を報告している(Proteomics 8:316-322,2008)。以上のようにCRMPsと癌との関連が示唆されているが、まだその詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

乳癌におけるCRMPsの位置づけの解明と、乳癌における悪性度評価因子や予後予測因子としての可能性の検証

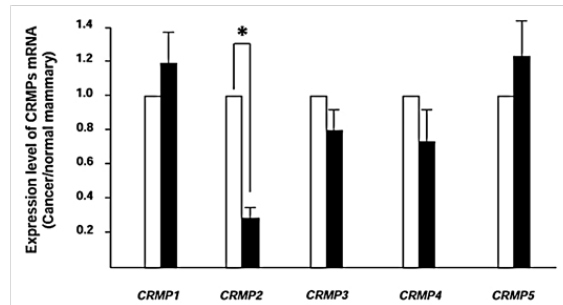
3. 研究の方法

CRMPsと乳癌の臨床病理学的因子の関連を検討し、CRMPsの乳癌における悪性度評価因子や予後予測因子としての可能性を検証する。その方法として、主にRT-PCR法と免疫組織化学手法によりCRMPs発現を確認する観察実験( )を計画する。24症例の乳癌組織凍結組織片の定量的RT-PCR法によるCRMPs mRNAの定量化と各症例の臨床病理学的因子との関連の検討。約200の乳癌症例の組織マイクロアレイ作成し、画一的な免疫組織化学染色によるCRMP蛋白発現のスコアリング化と各症例の臨床病理学的因子との関連の検討。

4. 研究成果

qRT-PCRによって得られた正常乳腺と乳癌組織におけるCRMPs mRNAの発現比

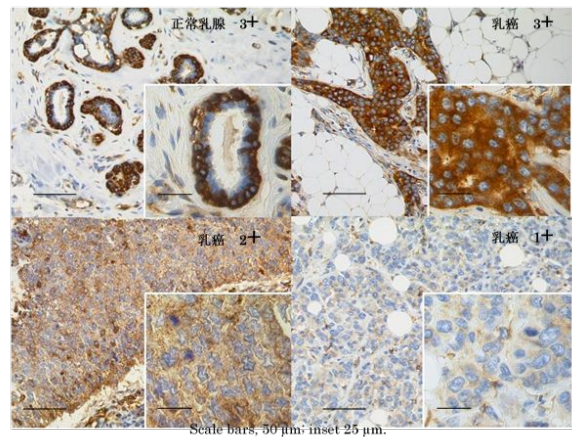
( Ct 法 )



結果は、正常乳腺におけるCRMP1~5 mRNAのそれぞれの発現量を1(白棒)とした場合、乳癌での相対的な発現量(黒棒)はCRMP1が1.118, CRMP2が0.271, CRMP3が0.806, CRMP4が0.721, CRMP5が1.205であった。この内、組織間での発現に統計学的有意差を認めたサブタイプはCRMP2のみであった(\*P = 0.015)。

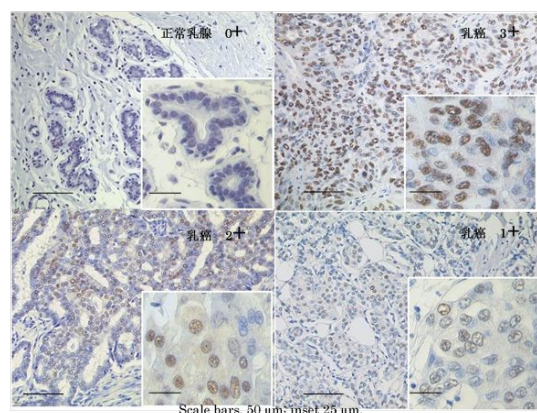
次にCRMP2とリン酸化型CRMP2の発現状況と、乳癌の臨床病理学的因子との相関を解析するために症例数を大幅に増加させて検討したティッシュマイクロアレイの免疫組織化学染色(IHC)結果を示す。

IHC ( CRMP2 )



CRMP2は正常乳腺の乳管上皮細胞、乳癌細胞の細胞体に認められた。

IHC ( リン酸化型 CRMP2 )



リン酸化型 CRMP2 の発現状況は正常乳腺では認めなかったのに対して、乳癌組織で高発現を認め、その局在は核内であった。

次にティッシュマイクロアレイ IHC における CRMP2 とリン酸化型 CRMP2 の発現をスコアリング化して組織ごとの発現状況を解析した。

組織	n	CRMP2		p-value*	リン酸化型 CRMP2		p-value*
		高発現	低発現		高発現	低発現	
正常乳腺	173	144	29		0	173	
乳癌	173	49	124	<0.001	52	121	<0.001

CRMP2 の発現は、正常乳腺では 173 例中 144 例（83.2%）と高率に高発現であったのに対して乳癌では 173 例中 124 例(71.7%)が低発現であった。リン酸化 CRMP2 の発現に関しては、正常乳腺では全て低発現であったのに対して乳癌においては 173 例中 52 例(30.0%)が高発現群となり有意差を認めた。

次に乳癌 173 例の臨床病理学的因子と CRMP2、リン酸化型 CRMP2 の相関を示す

臨床病理学的因子	n	CRMP2		p-value*	リン酸化型 CRMP2		p-value*
		高発現	低発現		高発現	低発現	
組織学的グレード							
1, 2	112	30	82		14	98	
3	61	19	42	0.598	38	23	<0.001
IHC サブタイプ							
Lumina A	119	33	86		28	91	
Luminal B	7	1	6		0	7	
HER2	6	2	4		1	5	
TNBC	20	9	11	0.075	13	7	<0.001
腫瘍径(mm)							
≤20	100	30	70		32	68	
>20	73	19	54	0.345	20	53	0.615
組織型							
NST	135	40	95		43	92	
Other	38	9	29	0.545	9	29	0.424
リンパ節転移							
Negative	148	42	106		42	106	
Positive	25	7	18	1	10	15	0.247
脈管侵襲							
Absent	124	39	86		36	89	
Positive	48	10	38	0.193	16	32	0.582
病期							
0-IB	101	29	72		29	72	
IIA-IV	72	20	52	1	23	49	0.737

CRMP2 の発現状況と臨床病理学的因子の間にはいずれも相関を認めなかったが、リン酸化型 CRMP2 の発現は、組織学的グレードと IHC サブタイプに相関を認めた。つまり組織学的グレードが高い乳癌と ER, PgR, HER2 の発現をいずれも認めない TNBC サブタイプであるほど、CRMP2 のリン酸化が核内で亢進していることが明らかとなった。

以上より、CRMP2 の低下とリン酸化型 CRMP2 の上昇は乳癌の progression に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Breast Cancer. 2013 Feb 5. [Epub ahead of print]

Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression.

[雑誌論文](計 1 件)

[学会発表](計 1 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

横浜市立大学附属市民総合医療センター

乳腺甲状腺外科

(1)研究代表者

(石川 孝)

研究者番号:

(2)研究分担者

(千島隆司)

研究者番号: 80275049

(3)連携研究者

(五嶋良郎・長嶋洋治)

研究者番号: