

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23591902
 研究課題名（和文） 乳癌におけるマイクロ RNA の解析と新規バイオマーカー、分子標的治療薬の開発
 研究課題名（英文） Analysis of microRNAs and development of novel therapeutic strategies in breast cancer
 研究代表者
 山下 啓子（YAMASHITA HIROKO）
 北海道大学・北海道大学病院・教授
 研究者番号：70332947

研究成果の概要（和文）：エストロゲンレセプター（ER）陽性乳癌において乳癌組織の ER、Ki67 の発現量は内分泌療法や化学療法の奏効性および予後に関与する。我々は、ER 高発現 Ki67 低発現（内分泌高感受性）乳癌と、ER 低発現 Ki67 高発現（内分泌低感受性）乳癌の乳癌組織を用いてマイクロ RNA と mRNA のマイクロアレイ解析を行い、ER 高発現 Ki67 低発現乳癌で有意に発現の低いマイクロ RNA、miR-1290 を同定した。

研究成果の概要（英文）：Expression profiles of microRNAs and mRNAs in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer tissue were compared between ER^{high} Ki67^{low} tumors and ER^{low} Ki67^{high} tumors by microRNA and mRNA microarrays. Unsupervised hierarchical clustering analyses revealed distinct expression patterns of miRNAs and mRNAs in these groups. We identified miR-1290 and its potential targets that might be associated with characteristics of ER-positive breast cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	4,200,000	1,260,000	5,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、マイクロ RNA、エストロゲンレセプター

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンレセプター（ER）陽性乳癌において乳癌組織の ER の発現量は内分泌療法や化学療法の奏効性および予後に関与する。また、ER 陽性乳癌には内分泌高感受性で Ki67 低発現である luminal A と内分泌低感受性で Ki67 高発現である luminal B サブタイプが存在することが明らかとなっている。我々は、遺伝子発現制御機構の一つとして最近注目されているマイクロ RNA (microRNA) について、ER 遺伝子の発現調節や ER 陽性乳癌の生物学的特性への関与に関する研究を行ってきた（Cancer Res 2008, Breast Cancer Res Treat 2011）。

- (1) 我々は、日本人女性において ER 陽性乳癌が著しく増加していることを見出した。
- (2) ER 陽性乳癌の発生・進展のメカニズム、生物学的特性（内分泌療法などの効果、予後など）に関与する因子は未だ見出されていない。
- (3) 我々は、乳癌組織における ER の発現量を調節する因子として、microRNA が関与する可能性について世界で初めて報告した（Kondo N, Yamashita H, et al. Cancer Res, 2008, priority report）。

- (4) 我々は、ER α の mRNA 3' 末端非翻訳領域に結合する microRNA (乳癌細胞を用いた基礎的検討により複数のマイクロ RNA が同定されている) の乳癌組織における発現を検討し、そのうちのひとつ (miR-18b) が ER 陽性乳癌の予後に関与することを見出した (Yoshimoto N, Yamashita H, et al. Breast Cancer Res Treat, 2011)。
- (5) 癌においてマイクロ RNA は増殖、アポトーシス、血管新生、浸潤、転移、ゲノム不安定性など様々な場面に関与していると考えられている。

2. 研究の目的

- (1) ER 陽性乳癌の発生・進展に関与するマイクロ RNA の同定
- (2) マイクロ RNA のバイオマーカー (診断、予後因子、治療効果予測因子) としての意義
- (3) マイクロ RNA の分子標的治療薬としての開発の可能性

3. 研究の方法

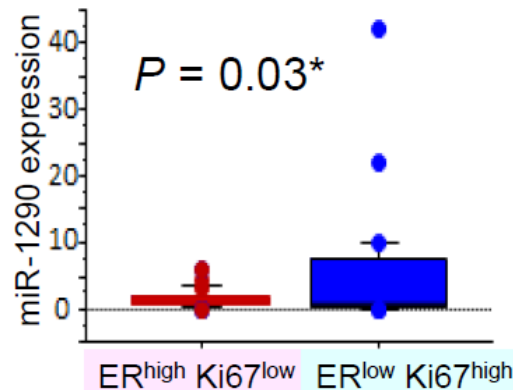
- (1) ER 高発現 Ki67 低発現 (内分泌高感受性) 乳癌と、ER 低発現 Ki67 高発現 (内分泌低感受性) 乳癌の乳癌組織を用いてマイクロ RNA と mRNA のマイクロアレイ解析
- (2) ER 陽性乳癌の生物学的特性に関与するマイクロ RNA を同定
- (3) 同定したマイクロ RNA の ER 陽性乳癌における役割について解析

4. 研究成果

- (1) ER 高発現 Ki67 低発現 (内分泌高感受性) 乳癌と、ER 低発現 Ki67 高発現 (内分泌低感受性) 乳癌とでマイクロ RNA と mRNA の発現パターンが異なる。
- (2) 内分泌高感受性/低感受性乳がんの典型症例と考えられる症例、それぞれ 4 例の凍結乳癌組織を用いて 1011 の microRNA のマイクロアレイ解析を行い、microRNA 発現プロファイルの比較解析を行い、内分泌高感受性/低感受性で発現の差をみとめた microRNA を 67 種類同定した。
- (3) 同じ典型症例において 25369 の mRNA のマイクロアレイ解析を行い、内分泌高感

受性/低感受性間で発現の差をみとめた mRNA を 657 種類同定した。

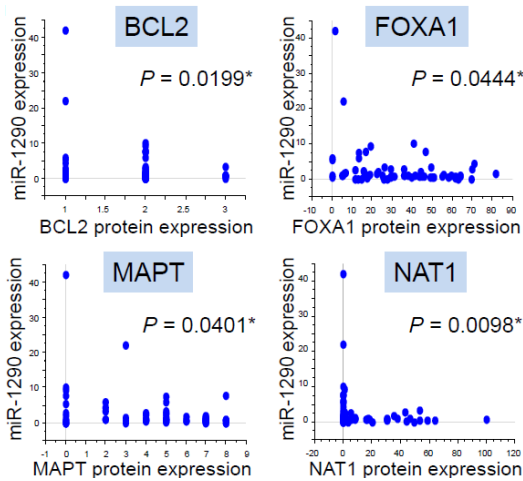
- (4) マイクロアレイ解析結果から、選出した 12 種類の microRNA の発現量を、内分泌高感受性 38 例、内分泌低感受性 26 例の乳癌組織において定量的 RT-PCR 法により解析した。内分泌高感受性群において有意に発現量の高い microRNA (let-7a, miR-15a, miR-26a, miR-34a, miR-193b and miR-342-3p) 同定した。また、内分泌高感受性群において有意に発現量の低い microRNA、miR-1290 を同定した。



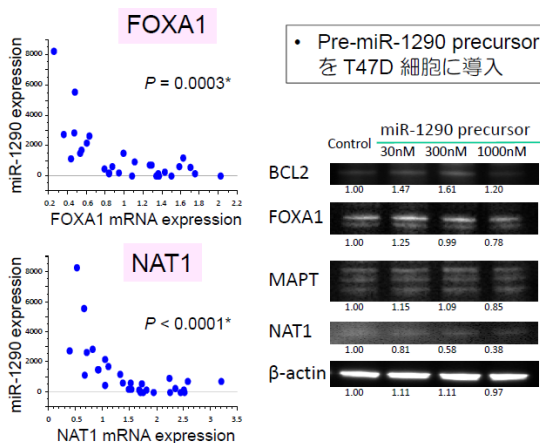
- (5) microRNA の発現量と臨床病理学的因子との相関を検討すると、内分泌高感受性で有意に高発現であった 6 つの microRNA は ER の発現量と有意に正相関していた。また、内分泌高感受性群で有意に低発現であった miR-1290 は Tumor grade と強く正相関していた。
- (6) 次に、mRNA のマイクロアレイ解析結果や、これまで同定した miRNAs の標的であるとコンピューター解析などにより予測した遺伝子の中から、11 種類の標的遺伝子候補 (ANKRD30A, BCL2, cyclinD1, FOXA1, GATA3, LIN28, MAPT, NAT1, RB1, p53, XBP1) を選出した。
- (7) これらの選出した遺伝子の蛋白発現を、ER 陽性乳癌の臨床症例をつかって、免疫組織化学染色により検討した。BCL2, FOXA1, GATA3, LIN28, MAPT and NAT1 の蛋白発現量は ER の発現量と有意に正相関していた。ANKRD30, BCL2, FOXA1, GATA3, LIN28, MAPT and NAT1 の蛋白発現量は PgR の蛋白発現量と有意に正相関していた。Tumor grade とは ANKRD30, BCL2 と TP53 の蛋白発現量は正相関していたが、CCND1, FOXA1, GATA3, LIN28, MAPT, NAT1、XBP1 の蛋白発現量は、grade と逆相関していた。LIN28 と TP53 の発現量は、Ki67 とは正相関し、MAPT と NAT1 の蛋白発現量は、Ki67

と正相関していた。ANKRD30, FOXA1, GATA3, LIN28, MAPT, NAT1, TP53, XBP1 の蛋白発現は腫瘍径と逆相関していた。

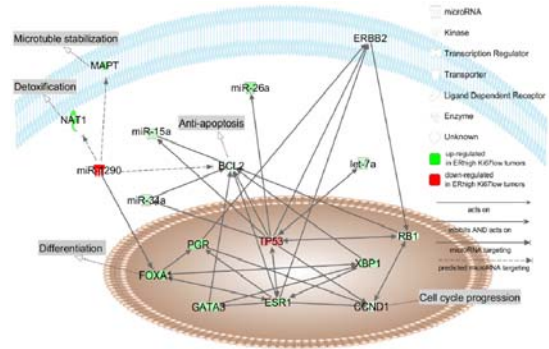
(8) 標的遺伝子候補の蛋白発現量と microRNA の発現量の相関を検査すると、ER 陽性乳癌組織において、内分泌高感受性群で有意に低発現であった microRNA、miR-1290 の発現量は、この microRNA の標的遺伝子候補である4つの蛋白 (BCL2, FOXA1, MAPT, NAT1) の発現と逆相関した。



(9) ER 陽性乳癌細胞株である T47D と MCF7 細胞に pre-miR-1290 precursor を導入した。miR-1290 の発現量と BCL2 など4つの標的遺伝子候補の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR 解析にて比較すると、miR-1290 の発現量は T47D 細胞では FOXA1, NAT1 mRNA 発現と有意に逆相関していたが、BCL2、MAPT mRNA 発現とは相関を認めなかった。ウェスタンブロット解析では、T47D に miR-1290 を導入し、48 時間培養したところ、miR-1290 は NAT1 の蛋白発現量を容量依存性に減弱させた。ER 陽性乳癌細胞において miR-1290 は FOXA1, NAT1 発現を抑制すると考えられた。



(10) ER 陽性乳癌の生物学的特性に関与するマイクロ RNA と標的遺伝子候補の細胞内シグナル経路を示す Pathway 解析



BCL2, MAPT, NAT1, FOXA1 は miR-1290 の標的遺伝子候補であり、これらの遺伝子、またそのパスウェイは、differentiation, detoxification, anti-apoptosis, cell cycle progression、microtubule stabilization など、様々な機能を持っている。幾つかのマイクロ RNA とその標的遺伝子が ER 陽性乳癌の生物学的特性に関与していると考えている。

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)

[雑誌論文] (計2件)

①Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H: MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 20: 91-102, 2013, DOI: 10.1530/ERC-12-0207 査読有

②山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美：エストロゲンレセプター陽性乳癌における microRNA の役割に関する研究 *日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌* 29:289-292, 2012、査読無

[学会発表] (計5件)

①Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H: MicroRNAs and their potential targets associated with characteristics of estrogen receptor- positive breast cancer. 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013, Mar 13-16, 2013, Olma-Messen St Gallen, Switzerland

②Yamashita H, Toyama T, Yoshimoto N, Endo

Y, Takahashi S: <Symposium: Breast cancer (Clinical research)> Role of microRNAs in estrogen receptor-positive breast cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (15th ICHSHC), Nov 15-17, 2012, ISHIKAWA ONGAKUDO, Kanazawa

③ Yamashita H, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Endo Y: <Workshop: Molecular targeted cancer therapy and histochemistry> Role of microRNAs in estrogen receptor α -positive breast cancer. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012), Aug 26-29, 2012, Kyoto International Conference Center, Kyoto

④ 山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美、岩佐麻衣、浅野倫子、小林俊三: <プレジデンシャルシンポジウム バイオロジーからみた乳癌の治療戦略> エストロゲンレセプター陽性乳癌のバイオロジーに関する基礎的研究 第20回日本乳癌学会総会 2012年6月28-30日、ホテル日航熊本(熊本)

⑤ 山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美、岩佐麻衣、浅野倫子、小林俊三: <シンポジウム 乳癌診療の未来> エストロゲンレセプター陽性乳癌における microRNA の役割に関する研究 第24回日本内分泌外科学会総会 2012年6月8-9日、名古屋国際会議場(名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 啓子 (YAMASHITA HIROKO)
北海道大学・北海道大学病院・教授
研究者番号：70332947

(2) 研究分担者

遠山 竜也 (TOYAMA TATSUYA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30315882
(H22のみ)

吉本 信保 (YOSHIMOTO NOBUYASU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10551244
(H22のみ)

(3) 連携研究者

なし