

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 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659183

研究課題名（和文） microRNA を用いた乳癌検査ツールの開発

研究課題名（英文） microRNA analysis as the predictive tool of the breast cancer treatment

研究代表者

笹野 公伸 (SASANO HIRONOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50187142

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ホルマリン固定・パラフィン包埋を行った乳癌組織標本を用い、新たな検査ツールとしての miRNA の可能性を明らかにした。主な本研究成果は以下の 3 つである。1) RNA 結合タンパクである LIN28 と let-7 family の相関 2) 癌増殖マーカーである Ki-67 と相関する miRNA 群の同定 3) 乳癌治療標的因子である HER2 の発現と相関する miRNA 群の同定。本研究ではいくつかの miRNA を同時に評価することで、より安定した検査ツールの開発が十分可能であることを示すデータを得た。

研究成果の概要（英文）：

A new molecular technique as a breast cancer diagnosis is attracting a great deal of attention. In this research, I clarified relation between miRNA expression and pathological biomarkers using breast cancer tissues. These main results of this research are as follows: 1) LIN28 correlated with let-7 family 2) Identification of miRNAs related with Ki-67, which is proliferation marker. and 3) Identification of miRNAs related with HER2, which is targeting molecule for breast cancer therapy. The results from our research suggest the possibility of the miRNA analysis as an novel diagnosis tool for 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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：乳癌・microRNA・LIN28・Ki-67・HER2

1. 研究開始当初の背景

マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング解析によって、乳癌は Luminal A 型、Luminal B 型、human EGFR-related 2 (HER2) 型、Basal-like 型の 4 つ (Perou CM., et al, Nature, 2000)、さらに Unclassified 型を加えた 5 つに分類される。この分類は免疫組織化学等を用いた病理学的分類とも非常に相関を得ている。遺伝子発現解析の臨床応用については、MammaPrint (Van' t Veer L. J., et al., Nature 2002) と Oncotype DX (Paik S., et al., N Engl J Med. 2004) が商品化され

ており、本邦においてもその成果は注目されている。MammaPrint 検査には新鮮な標本が必要であるのに対し、Oncotype DX 検査では 10%ホルマリン固定/パラフィン包埋標本 (F/P 標本) を使用し、定量的 PCR にて目的の遺伝子の発現を評価する。ヒト組織を用いた遺伝子解析では、凍結組織が通常用いられるが、retrospective な解析を試みるのには困難な点が多い。一方、一般に病理組織検査に用いられる組織は、10%ホルマリン固定/パラフィン包埋標本 (F/P 標本) として保存され、この F/P 標本を使用することによって、大規

模な解析を retrospective に行うことができる。しかし、F/P 標本中の RNA は高度に分解されており、一般的な遺伝子発現解析を行う事は難しく、たとえデータが得られたとしてもその解釈には注意を有する。

2. 研究の目的

microRNA (miRNA) は生体内で様々な遺伝子の発現を抑制する分子として、近年、その医学への応用が注目されている。我々はこれまでに乳癌や剖検例の種々の F/P 標本中に miRNA が分解を受けずに保存されている事を明らかにし、F/P 標本を用いた miRNA 解析の有用性を報告してきた(日本病理学会、2008)。また乳癌培養細胞と F/P 標本を用い、乳癌薬物療法に関わる miRNA やエストロゲン枯渇下における miRNA の変動等を検討してきた(日本癌学会、2009, 2010; 国際内分泌学会、2009)。本研究では、我々のこれまでの乳癌研究の経験、また数百例に及ぶ膨大な乳癌 F/P 標本/臨床データベースを生かし、microarray による乳癌 miRNA 発現プロファイル (miRNA プロファイル) を作成する。各症例の標的因子発現、予後・再発、さらには阻害剤の効果に関わる miRNA プロファイルをそれぞれ構築する。microarray 解析から抽出した miRNA を、簡便かつ正確に検査するための PCR array の開発を目指す。

3. 研究の方法

乳癌症例：

東北公済病院で外科的切除された乳癌組織 21 症例を PCR array 解析に用いた。本研究は東北公済病院倫理委員会 (H17.8.5) 及び東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会 (No. 2010-572) の承認を得ている。東北公済病院及び東北大学病院の乳癌症例はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織として用いた。これら FFPE 組織については全て浸潤性乳癌 (いずれも女性) だった。

免疫組織化学：

免疫組織化学には Histofine SAB - PO kit (Nichirei Co Ltd., 東京) を用いた。HER2 タンパクの発現はハーセプチンにて評価し、乳癌細胞の表面の発現を 0、1+、2+、3+ の 4 段階で判定し、Negative (0, 1+) と Positive (3+)、さらに intermediate (2+) の 3 群に分類した。LIN28A/B の評価は発現強度により Score 0 : Negative, 1 : Weakly positive, 2 : Strongly positive の 3 段階に評価した。ER, PR 及び Ki 67 についての評価は 1,000 個

中の細胞における陽性細胞の割合を Labeling Index (LI) を用いて 10 % 以上を陽性とした。

Laser Capture Microdissection (LCM) :

FFPE 組織を 8 μ m に薄切し、メンブレンスライド (Molecular Machines and Industries, Glattbrugg, Switzerland) に載せて 60°C のインキュベーターで 3 時間加温し、パラフィンを融解除去した。LCM は MMI Cellcut (Molecular Machines and Industries) を用いて行い、トルイジンブルー染色を行った標本から顕微鏡下で癌細胞のみを回収した。回収した癌細胞から Pure Link miRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。cDNA の作製には RT 2 miRNA First Strand Kit (QIAGEN) を用いた。

RT 2 miRNA PCR Array :

PCR Array には Human Cancer RT 2 qPCR Array (RT 2 Profiler PCR Array System, QIAGEN) を用いて行った。Human Cancer RT 2 qPCR Array は癌に関連があると報告されている 88 種の miRNA と 4 種の内部コントロール遺伝子、逆転写コントロールと陽性コントロールが含まれている。PCR 反応には、ABI 17500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。各 RNA の発現量は、RT2 qPCR Array Data Analysis (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) を用いて解析した。

統計解析：

統計解析には Stat View 5.0 J Software (SAS Institute, NC, USA) を用いた。免疫組織化学における臨床病理学的因子との相関は、 χ^2 検定を用いて解析した。P 値が 0.05 未満のものを有意差ありと判断した。PCR Array の解析には階層的クラスタ解析を用いて行い、Tree View (Stanford University, California, USA) を用いて樹形図を作成した。また、免疫組織化学と PCR Array の結果の比較には Bonferroni / Dunn 及び Mann Whitney U test を用いた。

4. 研究成果

- (1) PCR アレイ解析による let-7 ファミリーの発現と LIN28 の相関
LIN28A および LIN28B の免疫染色結果に基

づいて、それぞれを陽性群と陰性群に分類し、Let-7 family の階層的クラスター解析を行った。LIN28A 陽性群では Let-7 family は低発現である傾向が見られたが、LIN28B については Let-7 family の発現との関係は認められなかった。さらにそれぞれの Let-7 family の発現量を LIN28A の陽性または陰性群と比較したところ、LIN28A 陽性群では陰性群と比べて Let-7d または f の発現が有意に高かった。

LIN28 は RNA 結合タンパクとして miRNA の発現を調節していることが知られており (Heo J., et al., Mol Cell 2008)、本研究結果は病理組織標本上で両者の関係を示した初めての解析である。また、FFPE 組織からの網羅的 miRNA 解析と免疫組織化学によるタンパク評価を組み合わせた本研究の解析手段が、適切に両者の関係の評価していることを示すデータである。

(2) Ki-67 と miRNA 発現プロファイル

Ki-67 は癌増殖の病理マーカーとして、乳癌を含めた多くの固形癌の増殖を評価するために用いられている。今回、Ki-67 LI を 0-14% (Control)、15-24% (Low)、25%以上 (High) の 3 群に分けて、miRNA 発現プロファイルの比較を行った。

let-7 family は Control グループでの発現が高く、Ki-67 が発現するグループ (Low と High) ではその発現が低かった。let-7 は Tumor suppressor として働くことが知られており (Barh D., et al., Current Oncol. 2010)、増殖の低い癌では let-7 が機能している可能性が考えられる。低かった。また、Low および High グループでは、Control グループと比較して 6 つの miRNA の発現高値が認められ、6 つのうち特に miR-96a は癌増殖との関係が示唆されている (Guttilla IK, White BA. J Biol Chem. 2009)。最近我々は、Luminal A 症例で化学療法の上乗せ効果の予測において、Ki-67 LI のカットオフ値が DFS の低下する 20-25%であることを推測し、報告した (Tamaki K., et al., Breast Cancer. 2012)。以上のことから、今回得られた Ki-67 関連 miRNA プロファイルは、化学療法の効果予測としての性質を有すると期待される。

(3) HER2 と miRNA 発現プロファイル

Negative グループでは 5 つの miRNA の発現が高く、Positive グループでは 5 つの miRNA の発現が低かった。これらの miRNA と HER2 の発現との関連は報告されていないため、現在、乳癌培養細胞株を用いた検討を行っている。HER2 遺伝子 (HER2/neu, c-erbB-2) はヒト上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子と類似の構造を有する癌遺伝子として同定さ、一般に HER2 タンパクの過剰発現は遺伝子の増幅によるものであると理解されている。本研究結果から、HER2 遺伝子増幅に加え、miRNA による発現抑制機構の存在が示唆される。ハーセプチンにて 2+の症例については FISH 法を用いた遺伝子増幅試験が行われるが、本研究で得られた HER2 2+関連 miRNA 群を評価することで、HER2 2+症例に対する HER2 阻害剤適応の新たな分類につながる可能性が示唆される。

HER2 は乳癌の予後因子であるとされており、特にリンパ節転移陽性例では、HER2 陽性例の予後が有意に不良であることが知られている (Dawood S., et al., J Clin Oncol 2010)。また、化学療法剤の効果に関連することも報告されている (Di Leo A., et al., J Clin Oncol 2008)。本研究で得られた HER2 関連 miRNA 群を評価することで、HER2 阻害剤の効果予測、化学療法効果予測に関する検査ツールの開発につながると期待される。以上、本研究では新たな乳癌検査ツールの開発にまでは至らなかったものの、いくつかの miRNA を同時に評価することで、より安定した分子生物学的検査ツールの開発が十分可能であることを示すデータが得られた。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Stebbing J, Filipovic A, Lit LC, Blighe K, Grothey A, Xu Y, Miki Y, Chow LW, Coombes RC, Sasano H, Shaw JA, Giamas G. LMTK3 is implicated in endocrine resistance via multiple signaling pathways. *Oncogene*. 査読有 2013. (in press) doi: 10.1038/onc.2012.343. <http://www.nature.com/onc/journal/vaop>

/ncurrent/pdf/onc2012343a.pdf

2. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, Kongdan Y, Wang L, Takagi K, Mayu T, Nakamura Y, Suzuki T, Nemoto N, Miyashita M, Tamaki K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: Its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci*. 査読有 2013 May;104(5):639-646. doi: 10.1111/cas.12121.
3. Samarajeewa NU, Yang F, Docanto MM, Sakurai M, McNamara KM, Sasano H, Fox SB, Simpson ER, Brown KA. HIF-1alpha stimulates aromatase expression driven by prostaglandin E2 in breast adipose stroma. *Breast Cancer Res*. 査読有 2013 Apr 8;15(2):R30. <http://breast-cancer-research.com/content/pdf/bcr3410.pdf>
4. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読有 2013 Jan;133:66-76. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.08.007.
5. Shibahara Y, Miki Y, Ishida T, Nakamura Y, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. Immunohistochemical analysis of aromatase in metastatic lymph nodes of breast cancer. *Pathol Int*. 査読有 2013 Jan;63(1):20-28. doi: 10.1111/pin.12015.
6. Chan MS, Wang L, Felizola SJ, Ueno T, Toi M, Loo W, Chow LW, Suzuki T, Sasano H. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients—a immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers*. 査読有 2012 Dec 27;27(4):e295-304. doi: 10.5301/JBM.2012.10439.
7. Masuda M, Miki Y, Hata S, Takagi K, Sakurai M, Ono K, Suzuki K, Yang Y, Abe E, Hirakawa H, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. An induction of microRNA, miR-7 through estrogen treatment in breast carcinoma. *J Transl Med*. 査読有 2012 Sep19;10 Suppl 1:S2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=An+induction+of+microRNA%2C+miR-7+through+estrogen+treatment+in+breast+carcinoma>
8. Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS, Yiu CC, Loo TY, Nakamura Y, Akahira J, Ishida T, Abe K, Hirakawa H, Chow LW, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1. *J Pathol*. 査読有 2012 Jul;227(3):357-366. doi: 10.1002/path.4019.
9. Ebata A, Suzuki T, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Nakamura Y, Fujishima F, Ishida K, Watanabe M, Tamaki K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Oestrogen-induced genes in ductal carcinoma in situ: their comparison with invasive ductal carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 査読有 2012 Jul 18;19(4):485-496. doi: 10.1530/ERC-11-0345.
10. Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, Amari M, Tadano-Sato A, Takahashi Y, Watanabe M, McNamara K, Ohuchi N, Sasano H. Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer*. 査読有 2012 Jul doi:10.1007/s12282-012-0387-5 <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12282-012-0387-5.pdf>

[学会発表] (計 14 件)

1. Minako SAKURAI, Yasuhiro MIKI, Yukiko SHIBAHARA, Hisashi HIRAKAWA, Noriaki Ouchi, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO : LIN28B as a Potential Prognostic Marker of Breast Cancer Patients : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer : 2012. 11. 17 : 金沢市
2. Yukiko SHIBAHARA, Yasuhiro MIKI, Shuko HATA, Yoshiaki ONODERA, Noriaki OHUCHI, Hironobu SASANO : Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1 : 第 71 回日本癌学会学術総会 : 2012. 9. 20 : 札幌市
3. Sarah Q TO, Kiyoshi TAKAGI, Yasuhiro MIKI, Koyu SUZUKI, Eriko ABE, Yang YANG, Hironobu SASANO, Evan R SIMPSON, Colin D CLYNE, Kevin C KNOWER : Methylation and expression of the prostanoid receptor EP2 in ER+ breast cancer : 第 71 回日本癌学会学術総会 : 2012. 9. 19 : 札幌市
4. 柴原裕紀子、三木康宏、端秀子、小野寺好明、中村保宏、赤平純一、阿部佳子、笹野公伸 : 乳癌におけるアロマターゼ阻害剤投与による microRNA の変動および Let-7f による CYP19A1 の制御に関する検討 : 第 101 回日本病理学会総会 : 2012. 4. 26 : 東京都
5. Yukiko SHIBAHARA, Yasuhiro MIKI, Yoshiaki ONODERA, Shuko HATA, Hironobu SASANO : Aromatase inhibitor increases let-7f which targets CYP19A1 in Human Breast Cancer : Global breast cancer conference 2011 : 2011. 10. 6 : Seoul (Korea)
6. Minako SAKURAI, Yasuhiro MIKI, Mariko MASUDA, Hisashi HIRAKAWA, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO : LIN28 regulates tumor suppressing activity of let-7 miRNA in human breast cancer : 第 70 回日本癌学会学術総会 2011. 10. 3 : 名古屋市
7. 江幡明子、鈴木 貴、高木清司、三木康宏、五十嵐やよい、中村保宏、石田和之、渡辺みか、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸 : 非浸潤性及び浸潤性乳癌組織におけるエストロゲン作用 : 第 19 回日本乳癌学会学術総会 : 2011. 9. 2 : 仙台市
8. 櫻井美奈子、三木康宏、石田孝宣、鈴木 貴、大内憲明、笹野公伸 : ヒト乳癌における Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3) 発現の意義 : 第 19 回日本乳癌学会学術総会 : 2011. 9. 2 : 仙台市
9. 増田真理子、三木康宏 (発表)、端 秀子、鈴木 貴、石田孝宣、平川 久、大内憲明、笹野公伸 : ヒト ER 陽性乳癌におけるエストロゲン誘導性 microRNA-7 と EGFR 発現 : 第 19 回日本乳癌学会学術総会 : 2011. 9. 2 : 仙台市
10. 柴原裕紀子、三木康宏、工藤陽花子、小野克彦、石田孝宣、笹野公伸 : 乳癌原発巣および転移リンパ節でのアロマターゼ免疫染色の比較検討 : 第 19 回日本乳癌学会学術総会 : 2011. 9. 2 : 仙台市
11. 櫻井美奈子、三木康宏、増田真理子、柴原裕紀子、平川久、鈴木 貴、笹野公伸 : ヒト乳癌における LIN28 による let-7 発現抑制 : 第 12 回ホルモンと癌研究会 : 2011. 7. 15 : 東京都
12. 櫻井美奈子、三木康宏、石田孝宣、鈴木 貴、大内憲明、笹野公伸 : 乳癌における Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS3) の発現意義 : 第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー : 2011. 7. 8 : 仙台市
13. 柴原裕紀子、三木康宏 (発表)、小野克彦、工藤陽花子、中村保宏、笹野公伸 : エストロゲン陽性乳癌における原発巣と転移リンパ節のアロマターゼ比較検討 : 第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー : 2011. 7. 8 : 仙台市
14. 柴原裕紀子、三木康宏、阿部佳子、笹野公伸 : 乳癌における原発巣および転移リンパ節のアロマターゼ免疫染色の比較検討 : 第 100 回日本病理学会総会 : 2011. 4. 28 : 横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 公伸 (SASANO HIRONOBU)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50187142

(3) 連携研究者

石田 孝宣 (ISHIDA TAKANORI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00292318

(3) 連携研究者

鈴木 貴 (SUZUKI TAKASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10261629

(3) 連携研究者

三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)
東北大学・災害科学国際研究所・講師
研究者番号：50451521

(3) 連携研究者

小野 克彦 (ONO KATSUHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・技術専門
職員
研究者番号：80466531