

令和元年6月10日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10468

研究課題名(和文) ホルモン療法抵抗性乳癌における骨髄転移メカニズムの解明と新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) The elucidation of the metastasis in bone marrow mechanism in hormonal therapy-resistant breast cancer and development of the new molecular target drug

研究代表者

近藤 直人 (KONDO, NAOTO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90529166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織におけるRAI2 mRNAの低発現症例は高発現症例に比べて、DFS・OSともに有意に予後不良であった(ともに $P < 0.0001$)。エストロゲン受容体陽性乳癌(N=256)を対象とした検討においても、RAI2 mRNAの低発現症例は高発現症例に比べてDFS・OSともに有意に予後不良であった(それぞれ $P=0.0004$ 、 $P=0.0008$)。ER陽性症例をのみ対象とした臨床病理学的因子との検討では、RAI2低発現症例が、有意に組織学的グレードが高かった($P=0.028$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討により、骨髄転移抑制遺伝子候補であるRAI2がER陽性乳癌の予後に関連することが示された。これをもとに、今後は、乳癌細胞株を用いて、RAI2を強制発現およびノックダウンした場合のホルモン療法薬への影響を検討している。

研究成果の概要(英文)：A total of 451 invasive breast cancer tissues was available for analysis of RAI2 mRNA. We also sought correlations between clinicopathological factors and levels of RAI2 expression in these samples. The expression of markers associated with tumor-initiating capacity, such as SNAI1, SNAI2 and VIM was also analyzed. The median follow-up period was 9.0 years. Results: We found positive correlations between low expression of RAI2 mRNA and shorter disease-free survival and overall survival in breast cancer patients ($P=0.003$, $P<0.0001$, respectively), which was limited to ER-positive patients ($P=0.04$, $P=0.0009$, respectively), and not seen in ER-negative patients ($P=0.52$, $P=0.27$, respectively). Low RAI2 mRNA levels were positively correlated with high grade, ER-negativity and PgR negativity. Multivariate analysis indicated that low level RAI2 mRNA expression was an independent factor for survival both overall in breast cancer and in ER-positive breast cancer patients.

研究分野：乳癌外科

キーワード：breast cancer RAI2

1. 研究開始当初の背景

乳癌全体の約 80% を占めるエストロゲン・レセプター (ER) 陽性乳癌のなかには、早い段階から骨髄転移を来し、予後不良なものがあることが知られており、その転移メカニズムの解明と治療成績の向上が緊急課題となっている。最近、ER 陽性乳癌の骨髄転移には転移抑制遺伝子 (RAI2 : Retinoic Acid-Induced 2) が深く関与していることが報告された。私たちは ER 陽性乳癌の予後と RAI2 発現を検討し、RAI2 低発現の患者が予後不良であることを見出した。これらの研究結果を踏まえ、本研究では、アデノ随伴ウイルスを用いて、RAI2 遺伝子を標的とした新規分子標的治療薬の開発を目指すことを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、長期フォローアップ(中央値約 10 年)をした乳癌症例を対象に、乳癌組織における RAI2 発現と予後ならびに臨床病理学的因子との相関を検討する。次に、アデノ随伴ウイルスを用いて、RAI2 遺伝子を標的とした新規分子標的治療薬の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

当施設で 2000 年～2007 年に手術を施行した初発乳癌 478 例を対象に、乳癌組織より RNA を抽出し、TaqMan real-time PCR システムを用いて、RAI2 遺伝子の mRNA 発現を定量的に測定した。次に、RAI2 mRNA 発現レベルと無再発生存期間 (DFS) および全生存期間 (OS) との相関、および臨床病理学的因子との関連性について検討した。

乳癌細胞株に対する RAI2 遺伝子強制発現の影響に関する検討。A: RAI2/CtBP2 の標的遺伝子の検討。ER 陽性乳癌細胞株 (MCF7、T-47D、BT-483、ZR-75-1) および ER 陰性乳癌細胞株 (MDA-MB-231) のうち、RAI2 低発現の細胞株を用いて、RAI2 遺伝子の強制発現による RAI2/CtBP2 の標的遺伝子 (FOXA1、GATA3、GRHL2) 発現の変化を、mRNA は RT-PCR システムを用いて、蛋白発現はウエスタンブロットにて解析する。B: 上皮・間葉系マーカーの検討。実験 4-A の細胞株を用いて、RAI2 遺伝子を強制発現した場合の上皮系マーカー (CDH1) および間葉系マーカー (Vimentin、ZEB1、Snail1、Snail2) の発現変化を mRNA および蛋白発現レベルにて検討する。C: 細胞遊走能・浸潤能の検討。実験 4-A の細胞株を用いて、RAI2 遺伝子を強制発現した場合の細胞遊走能の変化を専用キット Oris Cell Migration Assay Kit (Platypus Technologies 社) を用いて計測する。また、浸潤能は 24 well Cell Invasion Assay (TREVIGEN 社) を用いて解析する。D: ホルモン療法の効果の検討。最後に、実験 4-A の細胞株を用いて、RAI2 遺伝子の強制発現時における、ホルモン療法薬 (抗エストロゲン薬: タモキシフェン、フルベストラント) の効果に及ぼす影響について観察する。

乳癌細胞株に対する RAI2 遺伝子ノックダウンの影響に関する検討。ER 陽性乳癌細胞株を用いて、RAI2 遺伝子ノックダウンによる影響について、A) RAI2/CtBP2 の標的遺伝子、B) 上皮・間葉系マーカー、C) 細胞遊走能・浸潤能、D) ホルモン療法の効果について、それぞれ実験 4-A、B、C、D の方法に準じて解析する。なお、RAI2 発現のノックダウンに使用する RAI2 shRNA Plasmid (RAI2 shRNA Plasmid (h)-SH) はすでに Santa Cruz 社より購入済みである。6. Xenograft モデルを用いた検討: ノードマウスへ移植した乳癌細胞に対する RAI2 遺伝子強制発現の増殖抑制効果に関する検討。1) 緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を導入した ER 陽性乳癌細胞株 (既に購入済み) に、実験 3 で作製したアデノ随伴ウイルス RAI2 遺伝子発現ベクターを導入する。2) RAI2 遺伝子高発現細胞株およびコントロールの親株を 6 週齢雌ノードマウスの皮下組織に

植え付ける。3)抗エストロゲン薬を投与する群としない群に分けて、腫瘍量を、翌日より30日まで計測し、ER陽性乳癌への抗エストロゲン薬による腫瘍増殖抑制効果について、RAI2遺伝子高発現細胞株およびコントロールの親株で比較検討する。

4. 研究成果

乳癌組織におけるRAI2 mRNAの低発現症例は高発現症例に比べて、DFS・OSともに有意に予後不良であった(ともに $P < 0.0001$)。エストロゲン受容体陽性乳癌(N=256)を対象とした検討においても、RAI2 mRNAの低発現症例は高発現症例に比べてDFS・OSともに有意に予後不良であった(それぞれ $P=0.0004$ 、 $P=0.0008$)。】今回の検討により、骨髄転移抑制遺伝子候補であるRAI2がER陽性乳癌の予後に関連することが示された。今後は乳癌細胞株を用いて、RAI2を強制発現およびノックダウンした場合のホルモン療法薬への影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

Nishikawa S, Kondo N, Endo Y, Hato Y, Hisada T, Nishimoto M, Toyama T, The prognostic impact of Retinoic Acid-Induced 2(RAI2) expression in ER α -positive breast cancer patients. 2017 Annual San Antonio Breast Cancer Symposium

西川さや香、近藤直人、遠藤友美、波戸ゆかり、久田知可、西本真弓、遠山竜也 骨髄転移抑制遺伝子RAI2発現はエストロゲン・レセプター陽性乳癌の予後に影響する。

第25回日本乳癌学会総会、2017年

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：遠山竜也

ローマ字氏名：Toyama Tatusya

所属研究機関名：名古屋市立大学・大学院医学研究科

部局名：乳腺外科

職名：教授

研究者番号(8桁): 30315882

研究分担者氏名：遠藤友美

ローマ字氏名：Endo Yumi

所属研究機関名：名古屋市立大学・大学院医学研究科

部局名：乳腺外科

職名：講師

研究者番号(8桁): 20566228

研究分担者氏名：吉本信保

ローマ字氏名：Yoshimoto Nobuyasu

所属研究機関名：名古屋市立大学・大学院医学研究科

部局名：乳腺外科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 10551244

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西川 さや香

ローマ字氏名：Nishikawa Sayaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。