

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月13日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591674

研究課題名（和文）乳癌に対するマイクロRNAを用いたエストロゲンレセプター・ノックダウン療法

研究課題名（英文）Estrogen receptor knock down therapy using microRNA for breast cancer patients

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ER α を標的とすると報告されたマイクロRNA(miR-18a、miR-18b、miR-22、miR-193b、miR-206、miR-221/222、miR-302c)の乳癌組織における発現を定量的RT-PCR法にて解析し、臨床病理学的因子との関連性について検討した。その結果、miR-18aおよびmiR-206はER陽性乳癌よりER陰性乳癌において高発現していた。しかし、miR-193bとmiR-221の発現レベルは、逆に、ER陽性乳癌よりER陰性乳癌において低発現していた。miR-22およびmiR-302c発現レベルは、ER発現レベルと相関は認めなかった。また、ER陽性乳癌細胞株(MCF-7)にmiR-206を強制発現させると、濃度依存性、時間依存性に細胞増殖が抑制されることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Several microRNAs (miRNAs) that directly target ER α have been identified. In this study, expression levels of miRNAs that directly target ER α , including miR-18a, miR-18b, miR-22, miR-193b, miR-206, miR-221/222 and miR-302c, were analyzed in human breast cancer samples by quantitative reverse transcription-PCR analysis. Correlations between the expression levels of these miRNAs and clinicopathological factors were analyzed. miR-18a expression was much higher in ER α -negative than in ER α -positive tumors, with the expression levels of miR-18a not differing in ER α -positive breast cancer as a function of ER α protein level. Surprisingly, the expression levels of miR-193b and miR-221 were significantly lower in ER α -negative than in ER α -positive tumors, and the levels of these miRNAs gradually increased as ER α protein expression increased. Our results suggest that miR-206 could be a novel candidate for endocrine therapy that targets only ER α in breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

乳癌は女性の代表的な悪性疾患であり、乳癌による死亡数は近年増加傾向にある。乳癌の約 70%において ER α の過剰発現が認められるが、これら ER α 陽性乳癌は、エストロゲン依存性の増殖を示すため、約 70~80%の症例においてホルモン治療が有効である。しかし、乳癌細胞における ER α の発現調節メカニズムはいまだ不明である。

以前より、機能不明なタンパク質に翻訳されない約 22 塩基の二重鎖 RNA の存在が知られていたが、この短い RNA 群は、「マイクロ RNA」と呼ばれ、遺伝子発現の調節に重要な役割を担っていることが近年分かってきた。マイクロ RNA は、それぞれの標的遺伝子の発現調節をすることが知られている。最近、複数のマイクロ RNA (miR-18a, miR-18b, miR-22, miR-193b, miR-206, miR-221/222, miR-302c) が、ER α を標的とし、ER α の発現を抑制していることが細胞株を用いた研究により報告された。

われわれは、これらのマイクロ RNA を用いて、ホルモン療法のターゲットである ER α の発現を完全に抑制するホルモン療法剤が開発できないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

乳癌治療においてホルモン療法は重要な治療手段である。従来のホルモン療法は、ターゲットであるエストロゲン・レセプター (ER) α の働きを抑制したり、エストロゲンの量を抑制したりするものであるが、その効果は十分であるとは言い難い。本研究は、マイクロ RNA という全く新しい手段を用いて ER α の発現そのものを抑制するという新規ホルモン療法剤の開発を目的としたものである。

3. 研究の方法

本研究「乳癌に対するマイクロ RNA を用いたエストロゲンレセプター・ノックダウン療法」の要旨を下記に記す。

(1) 乳癌臨床検体を用いた各種マイクロ RNA (miR-18a, miR-18b, miR-22, miR-193b, miR-206, miR-221/222, miR-302c) と ER α 発現の関連性についての検討。

(2) 乳癌細胞株を用いたマイクロ RNA の ER α 発現と細胞増殖に及ぼす影響に関する検討。

4. 研究成果

(1) miR-18a および miR-206 は ER 陽性乳癌より ER 陰性乳癌において高発現していた (表 1、

図 1)。しかし、miR-193b と miR-221 の発現レベルは、逆に、ER 陽性乳癌より ER 陰性乳癌において低発現していた (表 1、図 1)。miR-22 および miR-302c 発現レベルは、ER 発現レベルと相関は認めなかった。miR-18b も ER 発現レベルと相関は認めなかったが、予後解析では、miR-18b 発現が低い群は有意に予後良好であった (図 2、表 2)。マイクロ RNA は複数の遺伝子発現調節を行っているため、ER α を標的のすると報告されたマイクロ RNA は、ER 発現調節に直接関わっているわけではないことが分かった。

(2) ER 陽性乳癌細胞株 (MCF-7) に miR-206 を強制発現させると、濃度依存性、時間依存性に細胞増殖が抑制されることがわかった (図 3)。また、miR-206 強制発現により、ER α 下流遺伝子である PgR、サイクリン D1、pS2 mRNA 発現が抑制されることもわかった (図 3)。

表 1 : ER α 陽性乳癌組織および ER α 陰性乳癌組織における各種 miRNA 発現レベル

	ER α negative (mean \pm SE)	ER α positive (mean \pm SE)	P
miR-18a	37.5 \pm 10.4	1.27 \pm 0.17	<0.0001*
miR-18b	0.11 \pm 0.03	0.16 \pm 0.04	0.30
miR-22	4.30 \pm 0.90	6.30 \pm 1.42	0.25
miR-193b	24.4 \pm 5.71	133.4 \pm 29.5	0.0015*
miR-221	5.33 \pm 1.17	13.0 \pm 2.07	0.0045*
miR-222	2.32 \pm 0.75	3.77 \pm 0.40	0.066
miR-302c	0.0004 \pm 0.0002	0.001 \pm 0.0001	0.47
miR-206	0.016 \pm 0.002	0.008 \pm 0.001	0.003*

図 1. (a) miR-18a と ER α 発現との関連、(b) miR-18a と PgR 発現との関連、(c) miR-193b と ER α 発現との関連、(d) miR-221 と ER α 発現との関連

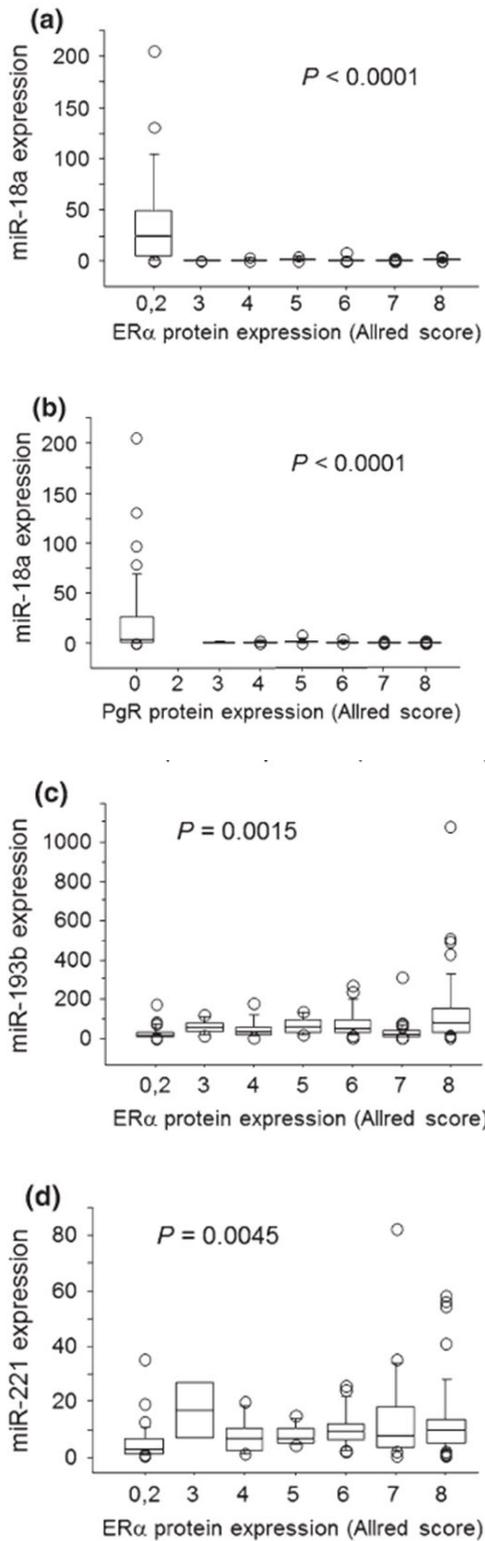


図 2. miR-18b 低発現症例が無病生存率(a) および全生存率(b)において良好な結果を示した。

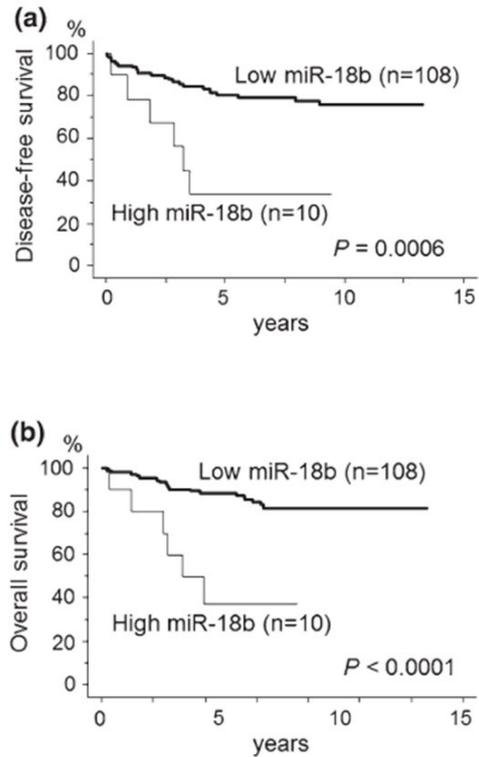
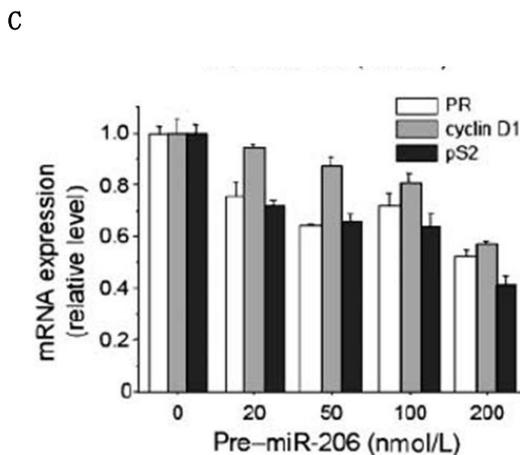
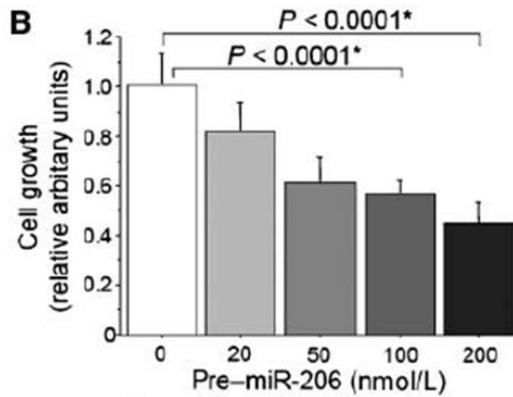
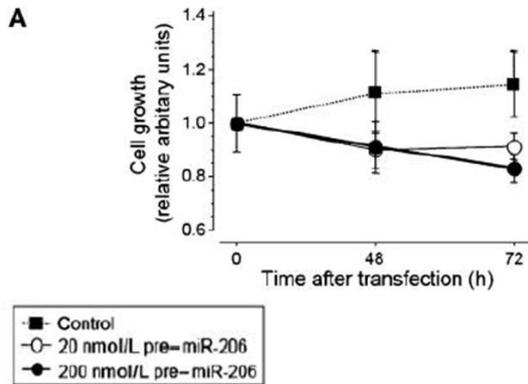


表 2: 単変量および多変量解析解析

Factor	Univariate			Multivariate		
	RR ^a	95% CI ^b	P	RR ^a	95% CI ^b	P
Tumor size, cm (≤ 2 , 2-5, >5)	2.04	1.19-3.50	0.0099*	1.21	0.61-2.39	0.59
Lymph node status (0, 1-3, 4-9, ≥ 10)	1.88	1.38-2.56	<0.0001*	2.21	1.43-3.41	0.0003*
Tumor grade (1, 2, 3)	2.10	1.24-3.57	0.0060*	1.26	0.57-2.80	0.57
ER α (score)	0.83	0.75-0.93	0.0009*	0.95	0.80-1.13	0.55
PgR (score)	0.78	0.79-0.87	<0.0001*	0.80	0.67-0.97	0.024*
miR-18a	1.00	0.99-1.01	0.89			
miR-18b	13.1	2.35-72.7	0.0033*	54.86	5.63-534.6	0.0006*
miR-22	0.99	0.92-1.05	0.67			
miR-193b	1.00	0.99-1.00	0.14			
miR-221	0.94	0.88-1.00	0.06			
miR-222	1.08	0.96-1.21	0.22			
miR-206	-	-	0.68			

図 3. (A) (B) miR-210 を ER α 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に形質導入すると濃度依存性に細胞増殖が抑制される。(C) また、ER α 下流遺伝子発現も抑制される



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 1 件)

①Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, Fujii Y, Yamashita H. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor α in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 130(1):331-9, 2011

[学会発表] (計 3 件)

①Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, Takahashi S, Iwase H, Fujii Y, Yamashita H: Low Expression of microRNA-210 Is an Independent Good Prognostic Factor in Japanese Triple-Negative Breast Cancer Patients, 34rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, December 6-10, 2011. (San Antonio, USA)

②Yamashita H, Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, Fujii Y: Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor in human breast cancer. Advances in Breast Cancer Research, American Association for Cancer Research (AACR) Special Conference in Cancer Research, October 12-15, 2011 (San Francisco, U.S.A.)

③吉本信保、遠山竜也、杉浦博士、遠藤友美、岩佐麻衣、藤井義敬、山下啓子: 乳癌のエストロゲンレセプター α の発現調節に関与する microRNA の解析、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26-28 日(東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/mammal.dir/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山下 啓子 (YAMASHITA Hiroko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70332947

(2) 研究分担者

杉浦 博士 (SUGIURA Hiroshi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：20381882