

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19899

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌における生物学的多様性の分子機序解明と新規治療への展開

研究課題名(英文)Elucidation of Molecular Mechanisms of Biological Heterogeneity and Its Clinical Application in Triple-Negative Breast Cancer.

研究代表者

山下 奈真(YAMASHITA, Nami)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60608967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は有効な治療が確立されておらず、その分子機序の解明と新たな治療標的の同定が急務である。近年、乳癌の浸潤様式にも多様性があることが分かってきた。その最たるものがEMTや、collective invasionである。これらの浸潤形態が同時に起こるものか、相互排他的な現象かは未だ不明である。E-cadherin、vimentinの発現パターンを原発巣・転移巣で共焦点顕微鏡下で詳細に調べた所、E-cadherin、vimentinを同一細胞内に共発現するタイプが最も予後が悪いことが判明した。浸潤転移メカニズムの解明はTNBCを制御する創薬のターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：The treatment of patients with TNBC has been challenging due to the absence of these molecular targets and the heterogeneity of the disease. Multiple mechanisms have emerged to address how epithelial breast tumors invade. The aim of our study is to elucidate the clinical importance of the expression of E-cadherin and vimentin in breast cancer. Co-expression of E-cadherin and vimentin seems to be associated with the most aggressive phenotype and poorest prognosis in breast cancer. Moreover, co-localization of E-cadherin and vimentin within the same breast cancer cells indicates the existence of heterogeneity in breast cancer invasion. The therapeutic targeting of aggressive subpopulation may provide a positive impact on improving the outcomes of breast cancer patients.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 EMT collective invasion E-cadherin vimentin BRCAness

1. 研究開始当初の背景

TNBC は従来より生物学的悪性度が高いこと、早期再発、予後不良という特徴があり、その治療選択肢も化学療法のみと狭いことから、治療に難渋する例が多い。一方、多くの TNBC はホルモン受容体陽性乳癌よりも化学療法への感受性が高い事も知られ、triple negative paradox と表現される。これは TNBC が stemness、EMT と関連が深い basal-like 型、claudin-low 型などを含むヘテロな集団であることを示唆し、中でも化学療法感受性が低い subgroup を把握し、特異的な分子標的の同定、新しい化学療法レジメンの模索が急務である。また BRCA1 遺伝子変異乳癌の多くは TNBC であり、若年発症である事が特徴である。BRCA1 機能不全を呈する患者は DNA 傷害性の薬剤 (PARP 阻害剤、白金製剤など) に高感受性を示すと考えられるため、BRCA1 機能不全の臨床像を正確に捉えることは極めて重要である。

2. 研究の目的

切除された TNBC の組織を用いて浸潤・転移に関連する因子、染色体異常や BRCA1 機能異常を解析し、TNBC の多様性の分子機序を解明する。

3. 研究の方法

① 乳癌細胞の浸潤・転移に関する研究:

EMT マーカー、basal マーカーの mRNA 発現解析については切除された乳癌症例における EMT マーカーである E-cadherin, vimentin, Axl, SPARC, Brachyury 等の mRNA 発現を定量的に解析する。これらの遺伝子発現が TNBC と非 TNBC で異なるのかどうかを比較解析する。更に前治療歴のない浸潤性乳癌(小葉癌を除外)切除例のパラフィン切片を用いて、上記 EMT マーカーの蛋白発現を免疫組織化学染色法にて評価する。次いで basal マーカーである CK5/6, EGFR についても同様の実験を行う。また近年、乳癌の浸潤様式として EMT とは異なる collective invasion が報告され注目されている。EMT と collective invasion の違い、subtype 別の浸潤様式の違い等に注目して研究を進める。

② BRCA1 機能不全に関する研究:

本テーマにおいては当院での乳癌切除症例を用いて BRCA1 発現解析(mRNA, 蛋白)、プロモーターメチル化解析、LOH 解析を行い、ゲノム不安定性や予後との関連を調べる。

③ マイクロアレイを用いた網羅的解析:

TNBC を予後良好群、不良群に分類し、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、比較する。

4. 研究成果

① 乳癌細胞の浸潤・転移に関する研究:

乳癌臨床検体において vimentin の蛋白発現を免疫組織化学染色にて評価したところ、TNBC において vimentin 発現が見られる症例は有意に予後不良であった。更に多変量解析の結果、TNBC において vimentin 発現が独立した予後不良因子であることを報告した(Yamashita N et al, J Cancer Res Clin Oncol. 2013)。さらに vimentin の下流因子である Axl 発現解析を行ったところ vimentin 陽性/Axl 高値を示す症例の予後は有意に予後不良であることを報告した(Tanaka K et al, Clin Breast Cancer. 2016)。次いで対象とした乳癌臨床検体において E-cadherin/vimentin 発現パターンを免疫組織化学染色

にて評価し、予後の解析を行ったところ、E-cadherin 高発現かつ vimentin 陽性の症例群が最も予後不良であった(図1)。

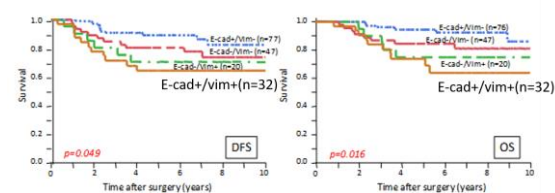


図1 乳癌臨床検体のE-cadherin/vimentin発現パターンと予後

この結果は乳癌の浸潤・転移が EMT のみで説明できないことを示唆する。従来 E-cadherin は高進展に抑制的に働く因子としてとらえられてきたが、近年 E-cadherin が高進展において促進因子として働くという知見も散見され、炎症性乳癌モデルにおける脈管内の腫瘍全では E-cadherin が過剰発現することにより、腫瘍全を構成する細胞がコンシクトに接着し、腫瘍全が血管内皮との接着を避け遊走性・化学療法抵抗性を増すと考えられている(F.J. Rodriguez et al, Biochimica et Biophysica Acta 2012)。E-cadherin, vimentin の評価を行った症例の中で、リンパ管転移・遠隔転移のバラフィン切片を用いて E-cadherin, vimentin の蛋白発現を評価した。E-cadherin は原発巣に比べリンパ管転移における発現が高い傾向にあり(図2)、vimentin 発現は原発巣・リンパ管転移間で発現パターンは類似していた。今後は原発巣および転移巣での E-cadherin, vimentin 発現パターンの相違、及び発現変化の臨床的意義を検証する。

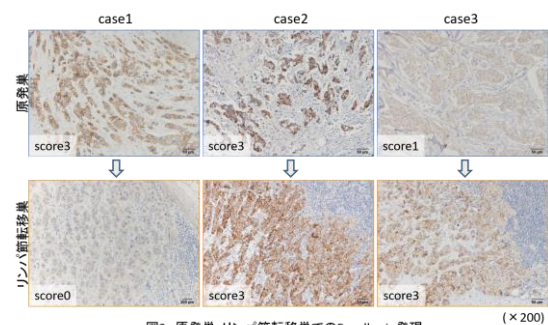


図2 原発巣・リンパ節転移巣でのE-cadherin発現 (×200)

② BRCA1 機能不全に関する研究:

当科にて手術を施行した術前治療歴のない原発性浸潤性乳癌(小葉癌を除外)を対象とした。乳癌切除検体よりゲノムDNAを抽出し、bisulfite処理、BRCA1プロモーター領域に対するPCRを行った後、HhaI制限酵素にて切断されるPCR産物を有する症例をメチル化陽性症例として検出する(図3)。

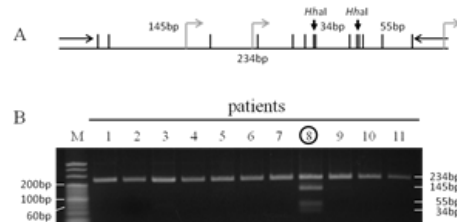


図3 COBRA法によるBRCA1プロモーターメチル化解析

乳癌検体において BRCA1 メチル化症例はすべて TNBC であった(図4)。

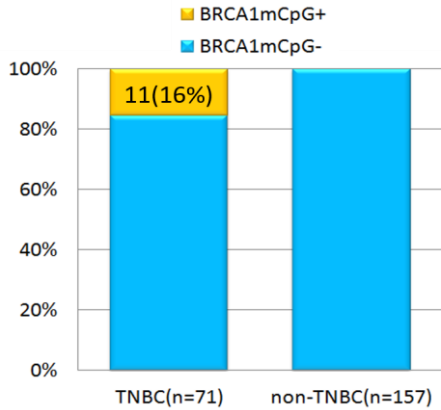


図4 BRCA1プロモーターメチル化とTNBC

更にBRCA1メチル化症例におけるBRCA1 mRNA、蛋白発現は著明に低下していた(図5)

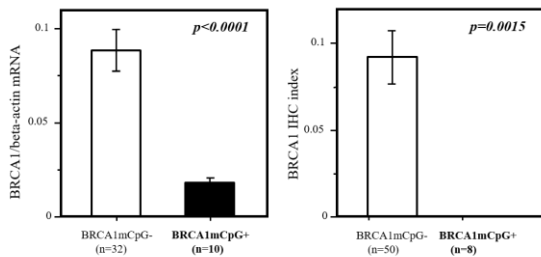


図5 BRCA1プロモーターメチル化とmRNA・蛋白発現

更にBRCA1メチル化症例における予後は有意に不良であることが分かった(図6)

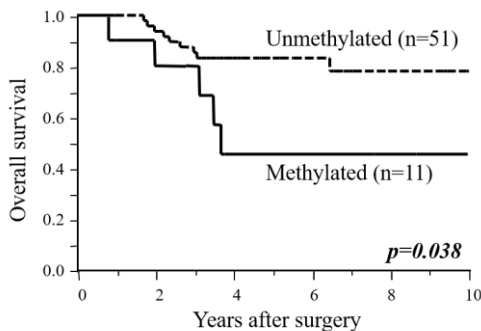


図6 BRCA1プロモーターメチル化と予後

散発性乳癌におけるBRCA1遺伝子変異は非常に稀であることが知られている。本結果はBRCA1遺伝子変異以外のBRCA1機能不全の一因としてBRCA1プロモーター領域のメチル化が重要な役割を果たすことを示唆しており、これを報告した(Yamashita N et al, Clin Breast Cancer. 2015)

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7件)

- ① Yamashita N, Tokunaga E, Yamamoto H, Shimizu C, Taketani K, Inoue Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y. The Local Recurrence of Breast Cancer with Squamous Metaplasia and Obvious

Histological Heterogeneity. Anticancer Res. 2017;37(9):5249-5254. DOI:10.21873/anticancerres.11979.

- ② Inoue Y, Yamashita N, Tokunaga E, Tanaka K, Ueo H, Saeki H, Oki E, Yamamoto H, Maehara Y. A Locally Advanced Breast Cancer that Achieved pCR with Pertuzumab, Trastuzumab and Docetaxel: Case Report. Anticancer Res. 2017;37(4):1917-1921. DOI:10.21873/anticancerres.11530.
- ③ Tanaka K, Tokunaga E, Yamashita N, Sagara Y, Ohi Y, Taguchi K, Ohno S, Okano S, Oda Y, Maehara Y. The relationship between the expression of FOXA1 and GATA3 and the efficacy of neoadjuvant endocrine therapy. Breast Cancer. 2017;24(3):384-392. DOI:10.1007/s12282-016-0714-3.
- ④ Tokunaga E, Yamashita N, Tanaka K, Inoue Y, Akiyoshi S, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Expression of APOBEC3B mRNA in Primary Breast Cancer of Japanese Women. PLoS One. 2016;11(12):e0168090. doi:10.1371/journal.pone.0168090. eCollection 2016.
- ⑤ Tanaka K, Tokunaga E, Inoue Y, Yamashita N, Saeki H, Okano S, Kitao H, Oki E, Oda Y, Maehara Y. Impact of Expression of Vimentin and Axl in Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 2016;16(6):520-526. DOI:10.1016/i.clbc.2016.6.015.
- ⑥ Takizawa K, Yamamoto H, Taguchi K, Ohno S, Tokunaga E, Yamashita N, Kubo M, Nakamura M, Oda Y. Insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein-3 is an indicator of malignant phyllodes tumor of the breast. Hum Pathol. 2016;55:30-8. DOI:10.1016/i.humpath.2016.04.007.
- ⑦ Tokunaga E, Yamashita N, Kitao H, Tanaka K, Taketani K, Inoue Y, Saeki H, Oki E, Oda Y, Maehara Y. Biological and clinical significance of loss of heterozygosity at the INPP4B gene locus in Japanese breast cancer. Breast. 2016;25:62-8. DOI:10.1016/i.breast.2015.10.006.

[学会発表] (計11件)

- ① 山下 奈真. 乳癌における Controlling Nutritional Status (CONUT) の臨床的意義についての検討, 第117回日本外科学会定期学術集會, 平成29年4月27-29

- 日、横浜。
- ② Yamashita N. The clinical impact of the Prognostic Nutritional Index (PNI) and Controlling Nutritional Status (CONUT) score on breast cancer patients survival., ASCO annual meeting 2017, 平成 29 年 6 月 2-6 日、Chicago.
- ③ 山下 奈真. Epithelial paradox: 乳癌細胞における E-cadherin と vimentin の共局在の意義, 第 25 回日本乳癌学会学術総会, 平成 29 年 7 月 13-15 日、福岡.
- ④ Yamashita N. The clinical impact of the PD-L1 expression and immunonutritional status on breast cancer survival, 第 76 回日本癌学会学術総会, 平成 29 年 9 月 28-30 日、横浜.
- ⑤ Yamashita N. The comparison of clinical impact of the Prognostic Nutritional Index (PNI) and Controlling Nutritional Status (CONUT) score on breast cancer patients' survival., 第 54 回日本癌治療学会学術総会, 平成 29 年 10 月 20-22 日、横浜.
- ⑥ 山下 奈真. 乳癌における肥満と sarcopenia 及び 予後栄養指標 (prognostic nutritional index) による予後の評価, 第 116 回日本外科学会定期学術集會、平成 28 年 4 月 14-16 日、大阪.
- ⑦ 山下 奈真. Epithelial paradox: 浸潤性乳管癌における浸潤形態の heterogeneity について, 第 24 回日本乳癌学会学術総会、平成 28 年 6 月 16-18 日、東京.
- ⑧ Yamashita N. Epithelial paradox; clinical significance of E-cadherin and vimentin expression pattern in invasive breast cancer., The 14th Asian Breast Diseases Association, 平成 28 年 9 月 2-3 日、福岡.
- ⑨ Yamashita N. Epithelial paradox; clinical significance E-cadherin and vimentin expression pattern in invasive breast cancer. 第 75 回日本癌学会学術総会, 平成 28 年 10 月 6-8 日、横浜.
- ⑩ 山下 奈真. 乳癌における予後栄養指標 (prognostic nutritional index; PNI) の臨床的意義についての検討, 第 54 回日本癌治療学会学術総会, 平成 28 年 10 月 20-22 日、横浜.
- ⑪ Yamashita N. Epithelial paradox; clinical significance of co-expression of E-cadherin and vimentin in the invasion and the metastasis of breast cancer., San Antonio Breast Cancer Symposium 2015, 平成 28 年 12 月 6-10 日、San Antonio,

Texas USA.

[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：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 奈真 (YAMSHITA, Nami)
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：60608967

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()