

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16284

研究課題名(和文)オートファジーを誘導する分子RNF5を標的とした乳癌に対する化学療法抵抗性の克服

研究課題名(英文) RNF5, a molecule that induces autophagy, and chemotherapy resistance in breast cancer

研究代表者

波戸 ゆかり (Hato, Yukari)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：20721864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：最近、乳癌の増殖にユビキチンリガーゼのひとつRNF5が関与していることが報告された。私たちは小数例を対象とした予備実験において、乳癌組織における RNF5遺伝子発現低下と乳癌予後不良に関連があることがわかった。この結果を検証するために当施設で長期フォローアップを行った乳癌625例を用いて、RNF5遺伝子の mRNA発現と臨床病理学的因子および予後との検討を行った。RNF5発現低下は、高グレード、エストロゲン受容体陰性などと正の相関を認めた。しかし、RNF5 mRNA発現と予後との関連については、RNF5発現低下症例で無病生存・全生存期間とも予後不良の傾向を認めたものの、有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

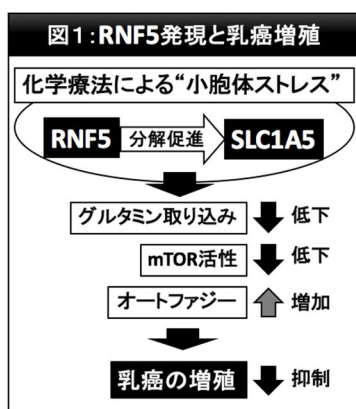
乳癌の増殖にユビキチンリガーゼのひとつRNF5が関与していることが報告された。この報告を検証するために、当施設で長期フォローアップを行った約600例の乳癌症例を用いて、RNF5遺伝子の mRNA発現と臨床病理学的因子および予後との検討を行った。しかし、残念ながらRNF5 mRNA発現と予後との間に明確な関連性は認められず、RNF5が乳癌治療の標的となる可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Resistance to endocrine therapies remains a major challenge in the treatment for ER-positive breast cancer patients. Recently, RNF5, a proteolytic ubiquitin ligase, has been reported to be involved in the growth of breast cancer. In our preliminary experiments, we found positive association between decreased mRNA expression of the RNF5 gene in breast cancer tissues and poor prognosis. In order to validate the results of our preliminary experiments, we investigated the relationship between RNF5 mRNA expression and clinicopathological factors and prognosis using 625 breast cancer patients with long-term follow-up. RNF5 mRNA expression was positively correlated with high grade, and estrogen receptor-negative. However, no significant difference was observed in the association between RNF5 mRNA expression and prognosis, although there was a trend toward poor prognosis in both disease-free survival and overall survival in patients with reduced RNF5 mRNA expression.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 RNF5

## 1. 研究開始当初の背景



乳癌は日本人女性が最も多く罹患する悪性疾患であり、死亡数は増加の一途を辿っている。化学療法は乳癌の治療において重要な役割を担っているものの、化学療法に抵抗性を示す予後不良な乳癌が存在し、その治療成績の向上が緊急の課題となっている。

化学療法を行うと、癌細胞は、多量の変性蛋白が小胞体に蓄積するという“小胞体ストレス”を引き起こし、オートファジーが誘導されることが以前より知られていた。最近、タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼ RNF5 (Ring Finger Protein 5) が、化学療法による“小胞体ストレス”下において重要な役割を担っていることが明らかになった(図1) (Cancer Cell 2015)。

乳癌の増殖には、乳癌細胞への「グルタミンの取込み」が必須である。グルタミンの取込みには、RNF5 とグルタミン輸送蛋白

である SLC1A5 (Solute Carrier Family 1 Member 5) が重要な役割を担っている。

図1に示すように、化学療法による“小胞体ストレス”下においては、RNF5 が SLC1A5 の分解を促進する。その結果、グルタミンの取り込みが抑制され、細胞増殖に關与する mTOR (mammalian target of rapamycin) 活性が低下し、オートファジーを引き起こし、乳癌の増殖が抑制される。また、乳癌細胞において、RNF5 発現が抑制されると、乳癌細胞の増殖が亢進するとともに、化学療法の効果が減弱することが報告された(文献1)。

## 2. 研究の目的

本研究は、ユビキチンリガーゼ RNF5 を治療標的とした乳癌に対する新規分子標的治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 対象患者と腫瘍組織: 1992~2008年の間に当院にて手術を施行した原発性乳癌 625 例の乳癌組織を用いて RNF5 mRNA の発現解析を施行した。これらの症例のフォローアップ期間中央値は 9.0 年 (1.0-194.4 ヶ月) であった。

(2) 定量的 RT-PCT 法: mRNA 発現解析は、7500 Fast Real-time PCR System を用いて、TaqMan Gene Expression Assays を使用して行った。

(3) エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、HER2 に対する免疫組織化学法: パラフィン包埋標本ブロックを用いて、ER、PgR、HER2 のタンパク質発現の解析を行った。ER、PgR の発現の評価は、Allred 法にて行った。HER2 発現は、HercepTest スコア法を用いて評価した。

(4) 統計解析: 生存曲線は、Kaplan-Meier 法にて解析し、log-rank テストにて評価した。無病生存期間 (DFS: disease-free survival) について、もし患者が無再発で生存している場合は最終来院日をもって「打ち切り」とした。全生存期間 (OS: overall survival) については、患者よび Fisher's exact probability test にて行った。また、単変量および多変量解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。統計解析ソフトは、R を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) RNF5 mRNA 発現と臨床病理学的因子との相関:

まず最初に、RNF5 mRNA 発現レベルと乳癌の予後について検討した。対象とした乳癌症例は 625 例。Table 1 および Figure 1 に示したように、RNF5 低発現症例は、組織悪性度が高く、ER 陰性で、PgR 陰性である割合が高かった。

### (2) RNF5 mRNA 発現と乳癌の予後:

予備実験では、RNF5 高発現症例は有意に予後良好であったため、症例数を増やして検討した。しかしながら、Figure 2、3 に示すように、中央値をカットオフ値とした場合、RNF5 発現と DFS および OS のあいだに相関は認めなかった。

そこで、次に、RNF5 高発現と低発現を 2:1 に分けて予後との相関を検討した。その結果、RNF5 高発現症例で、DFS (Figure 4) および OS (Figure 5) とともに予後良好な傾向を認めたものの、有意差は得られなかった (それぞれ、 $P=0.083$ 、 $P=0.076$ )。エストロゲン受容体 (ER) 陽性および陰性でのサブ解析でも有意差は認められなかった (Figure 6, 7)。

### (3) まとめ:

ユビキチンリガーゼ RNF5 が乳癌の増殖に關与するとの仮説のもと、本研究を計画したが、臨床サンプルを用いた検討において、臨床的に意義のある結果が得られなかった。

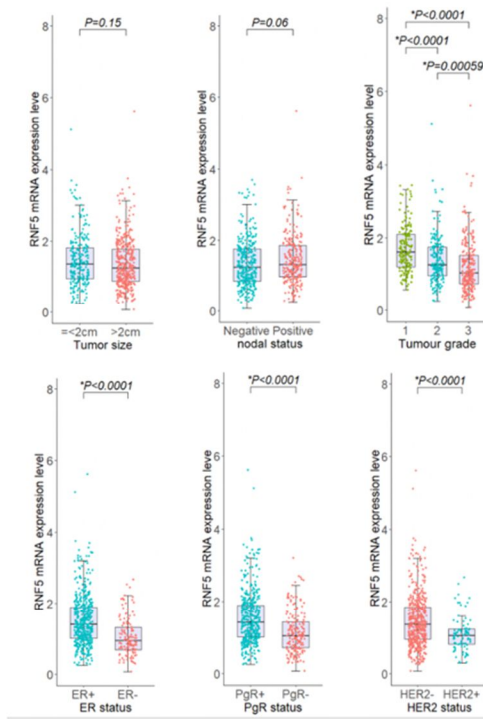


Figure 1: RNF5 mRNA 発現と臨床病理学因子との相関

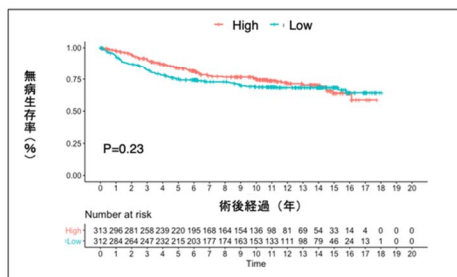


Figure 2: RNF5 mRNA 発現別の無病生存期間 (中央値をカットオフとした場合)

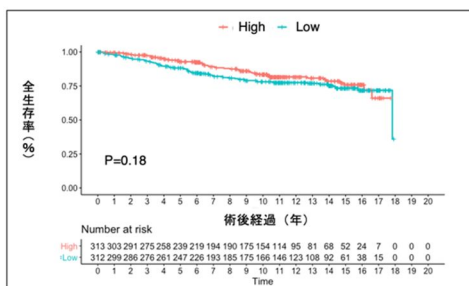


Figure 3: RNF5 mRNA 発現別の全生存期間 (中央値をカットオフとした場合)

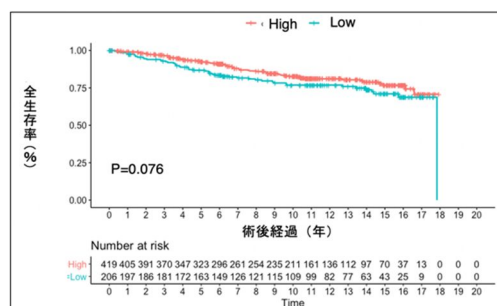
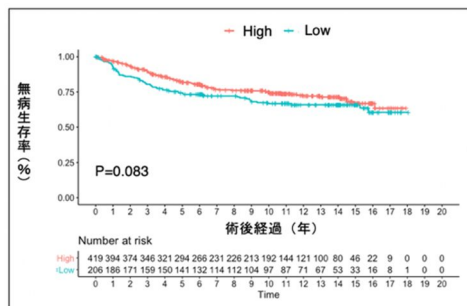


Figure 4,5: RNF5 mRNA 発現別の無病生存期間 (左) と全生存期間 (右) (高発現: 低発現 = 2:1)

Table 1. Association between RNF5 mRNA expression and clinicopathological characteristics in all breast cancer patients

	All patients	RNF5 mRNA expression		P value
		High	Low	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Patients	625	313 (50)	312 (50)	
Age (median, range)	55.0 (25-94)	55.0 (28-92)	55.0 (25-94)	0.8
Menopausal status				0.65
Pre	261 (41.8)	135 (43.1)	126 (40.4)	
Post	359 (57.4)	176 (56.2)	183 (58.7)	
Unknown/male	5 (0.8)	2 (0.6)	3 (0.9)	
Tumor size				0.13
≤2cm	241 (38.6)	130 (41.5)	111 (35.6)	
>2cm	383 (61.3)	182 (58.1)	201 (64.4)	
Unknown	1 (0.1)	1 (0.3)	0 (0)	
Nodal status				0.16
Negative	340 (54.4)	161 (51.4)	179 (57.4)	
Positive	257 (41.1)	134 (42.8)	123 (39.4)	
Unknown	28 (4.5)	18 (5.8)	10 (3.2)	
Grade				<0.0001
1	166 (26.6)	119 (38.0)	47 (15.1)	
2	180 (28.8)	83 (26.5)	97 (31.1)	
3	263 (42.0)	100 (31.9)	163 (52.2)	
Unknown	16 (2.6)	11 (3.5)	5 (1.6)	
Histology				0.0042
IDC	554 (88.6)	271 (86.6)	283 (90.1)	
ILC	28 (4.0)	23 (7.3)	5 (1.6)	
Others	42 (6.7)	19 (6.1)	23 (7.4)	
Unknown	1 (0.2)	0 (0)	1 (0.3)	
ERα status				<0.0001
Positive	489 (78.2)	278 (88.9)	211 (67.6)	
Negative	135 (21.6)	35 (11.1)	100 (32.1)	
Unknown	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.3)	
PgR status				<0.0001
Positive	437 (69.9)	256 (81.8)	181 (58.0)	
Negative	187 (29.9)	57 (18.2)	130 (41.7)	
Unknown	1 (0.2)	0 (0)	1 (0.3)	
HER2 status				<0.0001
Positive	86 (13.8)	18 (5.7)	68 (21.8)	
Negative	516 (82.6)	279 (89.1)	237 (76.0)	
Unknown	23 (3.7)	7 (2.2)	16 (5.1)	
Adjuvant therapy				<0.0001
ET alone	251 (40.2)	149 (47.6)	102 (32.7)	
CT alone	97 (15.5)	22 (7.0)	75 (24.0)	
ET+CT	221 (35.4)	116 (37.1)	105 (33.7)	
None	48 (7.7)	23 (7.3)	25 (8.0)	
Unknown	8 (1.3)	3 (1.0)	5 (1.6)	
Endocrine therapy				<0.0001
Yes	472 (75.5)	265 (84.7)	207 (66.3)	
No	144 (23.0)	45 (14.3)	99 (31.7)	
Unknown	9 (1.4)	3 (1.0)	6 (1.9)	

ERα, estrogen receptor α; PgR, progesterone receptor; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ET, endocrine therapy; CT, chemotherapy.

1 とした場合)

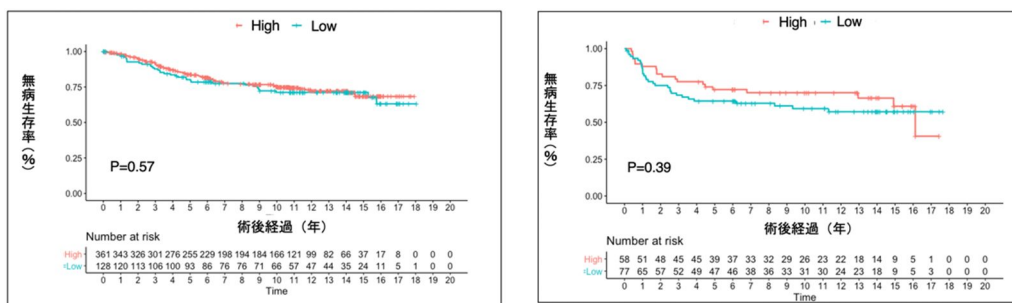


Figure 6, 7 : ER 陽性 (左) および ER 陰性 (右) 症例を対象とした、RNF5 mRNA 発現別の無病生存期間 (高発現 : 低発現 = 2 : 1 とした場合)

< 引用文献 >

文献 1 : Jeon *et al.*, 2015, *Cancer Cell* 27, 354-369

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------