

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16715

研究課題名（和文）ビッグデータ解析を応用した乳腺化生癌に対する新規治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Exploring novel therapeutic target molecules for metaplastic breast carcinoma using comprehensive genome-wide gene expression analyses

研究代表者

山下 美智子（Yamashita, Michiko）

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10809247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：一般型の乳癌においては遺伝子発現プロファイルに基づくサブタイプ分類による個別化治療により治療成績が向上しているが、特殊型乳癌の一つである化生癌では、有効な治療法がなく、その恩恵が全く得られていない。

我々は化生癌の遺伝子発現プロファイルに着目し、ビッグデータを用いた解析を駆使して新規治療標的候補遺伝子としてCAPS1を同定した。CAPS1は正常乳腺組織と比較して乳癌組織で有意に発現が高く、トリプルネガティブ乳癌においてCAPS1高発現群は予後不良であることを見出した。また、乳癌細胞株を用いた解析により、乳癌細胞の増殖、遊走、浸潤にCAPS1が深く関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨化生を伴う乳癌は稀な乳癌であるが、国内外を含めて有効な治療が確立されていない。他のサブタイプの乳癌の治療が発展していく中、化生癌の治療法開発は取り残された課題であり、CAPS1の同定は新規治療法開発に向けた端緒となる可能性があり、その意義は大きい。

がんゲノム医療が国内で急速に普及してきており、今後、ビッグデータを臨床現場に応用する手法が必要とされている。このことから、本研究により化生癌を含むトリプルネガティブ乳癌のトランスクリプトーム解析を用いた新規治療法の開発は、今後のゲノム医療時代の治療開発の一つの道筋を示すことにもつなげることができる。と考える。

研究成果の概要（英文）：Individualized treatment based on subtype classification based on gene expression profiles has improved treatment outcomes of almost breast cancer. However, metaplastic carcinoma, one of the special types of breast cancer, has not benefited at all from the lack of effective treatment.

We focused on the gene expression profile of metaplastic carcinoma and identified CAPS1 as a candidate gene for a novel therapeutic target using genome-wide big data analysis. CAPS1 is significantly upregulated in breast cancer tissues compared to normal mammary tissues. In triple negative breast cancer, we found that the high CAPS1 expression group had a significantly poorer prognosis than the low CAPS1 expression group. Analyses of breast cancer cell lines revealed that CAPS1 is deeply involved in the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 トリプルネガティブ乳癌 化生癌 バイオインフォマティクス CAPS1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、一般型の乳癌においては、遺伝子プロファイルに基づくサブタイプ分類による治療法の選択がなされ、個別化治療が確立してきた。それらのサブタイプ分類は、臨床現場においては、エストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PgR)、HER2、Ki67の免疫染色によって代替され、Luminal Aタイプ、Luminal Bタイプ、HER2タイプ、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)に分類している。TNBCはER、PgR、HER2の全てが陰性であり、薬物療法においては化学療法のみが選択肢となる。これらのサブタイプによる分類は、治療選択を行う上で非常に有用である。しかし、化生癌をはじめとする特殊型の乳癌においてはサブタイプ分類による最適治療が奏功せず、残念ながら再発をきたす場合がある。実際、申請者も軟骨化生を含む癌に対し術前化学療法を行い化生癌部分が残存していた症例を経験し、薬物治療が一般型の乳癌と同じで良いか疑問を感じている。化生癌は乳管癌と間葉系細胞に分化した癌が混在する病変であり、乳癌における化生癌の頻度は0.2~5%と報告されており、稀な組織型である(WHO分類第4版)。

近年、Lehmannらによってトリプルネガティブ乳癌(TNBC)の薬剤感受性が異なる6つのサブタイプ(Lehmann BD, et al. J Clin Invest. 2011)が提唱された。提唱された6つのサブタイプの中でも、軟骨化生を伴う乳癌の多くはMesenchymal (M) typeに分類されるとの報告がなされた(Weigelt B, et al. Mod Pathol. 2015)。

M typeのTNBCはTNBC全体の1/4を占め、間葉系の特徴を示す乳癌は化生癌よりも多く存在しているため、軟骨分化とM typeの遺伝子発現プロファイルに着目した。Bioinformaticsを用いたゲノムワイド解析を実施することで、化生癌の中でも特に軟骨化生癌ならびに間葉系分化を示すM typeの乳癌の治療標的分子を明らかにすることができるのではないかと考え、本研究の着想に至った。そこでまず、Gene Expression Omnibusから利用可能なTNBCの遺伝子発現データを用いて、Bioinformatics解析を行った。その結果、化生癌(n=54)に対して軟骨化生を伴う乳癌(n=8)で有意な発現変動遺伝子を200、TNBC(n=57)に対してM type(n=11)で有意な発現変動遺伝子を578同定した。さらに、この2つの遺伝子リストで共通した57遺伝子を同定した。この遺伝子群には、軟骨化生を伴う癌やM typeの乳癌の新規治療標的となる遺伝子が含まれている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

軟骨化生を伴う乳癌の遺伝子発現プロファイルを、Bioinformaticsを用いて多様なData setsから統合的に解析することで、軟骨化生癌の治療標的となりうる遺伝子を同定し、機能解析を行う。これにより、M typeの遺伝子発現プロファイルを背景に持つ化生癌およびTNBCの発生・進展・治療応答性等の分子基盤の解明を行う。

3. 研究の方法

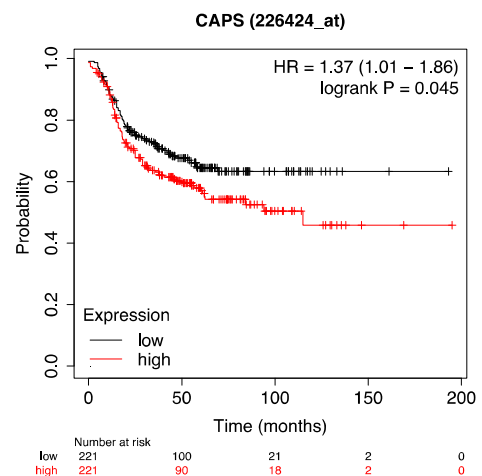
Bioinformatics 解析にて同定した 57 個の遺伝子について、Kaplan-Mayer Plotter (KMP) (Györfy B et.al. Breast Cancer Res Treat. 2010 Oct;123(3):725-31.)を用いて、免疫染色にて ER(-), PGR(-), HER2(-)の患者、intrinsic subtypeが basal type に分類される患者、および全ての乳癌患者について、Kaplan-Mayer 曲線を作成し、予後に差がある遺伝子を同定する。また、Cell Miner を用いて、癌細胞株における候補遺伝子の発現について解析を行った。

さらに、予後に関連する可能性のある遺伝子を当科でバンキングしている乳癌患者サンプルを用いて real time PCR にて、正常乳腺と乳癌部分での発現を確認する。バンキングについてはすでに IRB の承認を得て行なっている。(承認番号 28-8)。正常乳腺に比べて、乳癌部分で有意に変動する遺伝子を、発現強度を指標におよそ 10 遺伝子に絞り込む。同定した軟骨化生を伴う癌の新規治療標的候補となる遺伝子について、M-type の TNBC 細胞株 (BT-549 など)を用いて、候補遺伝子の強制発現 もしくは siRNA による knock down を行う。これらの細胞を用いて、MTT アッセイにて、0hr, 24hr, 48hr, 96hr で増殖能を評価する。次に、invasion chamber を用いて遊走能および浸潤能を評価する。

4. 研究成果

(1) 同定した候補遺伝子の絞り込み：予後関連解析およびヒト癌組織解析

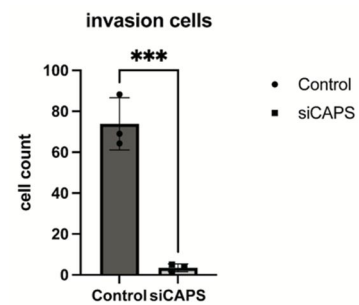
KMP により、57 候補遺伝子のうち 25 遺伝子でトリプルネガティブ乳癌もしくは basal type で無再発生存期間に有意差を認めた (右図に CAPS1 の Kaplan-Mayer plot を示す)。次に、乳癌患者サンプルを用いて計 8 患者の正常乳腺組織および乳癌組織のペア検体にて、遺伝子発現解析を行った。25 遺伝子の中から、すでに乳癌の予後との関連の報告がある 6 遺伝子を除いた 19 遺伝子、間葉系組織での発現が知られている 4 伝子、他癌で予後因子として報告のある 2 遺伝子に CDH1, CDH2, TGFb1, Vimentin を加えた計 29 遺伝子について real time RT-PCR を行なった。その結果、CDH2、CAPS1、BTN3A2(p<0.05)は正常乳腺に比べ乳癌部分で有意に発現が高く、HLA-A(p<0.06)、SOX8(p<0.07)は高い傾向が見られた。Cell Miner による細胞株の解析においては他癌の細胞株に比べ乳癌細胞株で有意に発現が低いものが 10 遺伝子あり、SOX8 もこの中に含まれていたため、乳癌の治療標的としてはやや不適格であると考えられた。



これらの解析結果を統合し最終的な候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) における新規治療標的候補遺伝子として CAPS1 を同定した。CAPS1 は神経内分泌細胞において、ゴルジ体から細胞膜への分泌顆粒の輸送、エキソサイトーシスに関わることが報告されているが、乳癌細胞における機能についてはこれまでに報告がなく不明である。

(2) 乳癌細胞株を用いた候補遺伝子の機能解析

間葉系への分化を示す TNBC 乳癌細胞株 BT-549 細胞に siRNA を用いて CAPS1 をノックダウンし、細胞形態、増殖能、遊走能、浸潤能を評価し、CAPS1 の乳癌細胞における機能を解析した。CAPS1 のノックダウンにより、BT-549 細胞の紡錘形の突起様構造の伸長が消失し、細胞形態の縦横比が低下した。増殖能は 24 時間、48 時間では差が見られなかったが、72 時間後から差が見られはじめ、96 時間後には有意に増殖能が低下した。



CAPS1 のノックダウンにより、スクラッチアッセイによる遊走能も有意に低下し、さらにインベーションチャンバーによる浸潤能の解析では浸潤細胞はほぼ 0 近くに減少し、浸潤能は著明に減少した。(右図)

CAPS1 のノックダウンにより浸潤能が大きく低下し、乳癌細胞の浸潤に CAPS1 が深く関与していることが示唆された。

これらのことから、本研究により CAPS1 が TNBC および化生癌の新たな治療標的となる可能性を見出した。今後は、既報の CAPS1 の機能である分泌顆粒のエキソサイトーシスと乳癌細胞の浸潤との相関、また浸潤する際の細胞膜の伸展による細胞形態の変化への CAPS1 の関与について、解析を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Michiko, Kamei Yoshiaki, Murakami Akari, Ozaki Erina, Okujima Kumiko, Takemoto Kana, Takaoka Megumi, Tsukamoto Daiki, Kusakabe Erina, Shidahara Tomoyuki, Noda Haruna, Aoki Reina, Taguchi Kana, Nishiyama Kanako, Eguchi Mariko, Takada Yasutsugu	4. 巻 19
2. 論文標題 Metaplastic carcinoma of the breast and BRCA1 germline mutation: a case report and review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hereditary Cancer in Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13053-020-00162-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下 美智子、山澤 令菜、日下部 恵梨菜、青木 玲奈、小松 紗綾、田口 加奈、西山 加那子、村上 朱里、杉森 和加奈、今井 祐記、亀井 義明
2. 発表標題 ビッグデータ解析を応用した乳腺化生癌に対する新規治療標的分子の同定
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 美智子、青木 玲奈、宇都宮 果歩、中村 萌美、野田 令菜、日下部 恵梨菜、田口 加奈、西山 加那子、村上 朱里、亀井 義明、今井 祐記、高田 泰次
2. 発表標題 CAPS1はトリプルネガティブ乳癌細胞の増殖・遊走・浸潤を促進する
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------