

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591660

研究課題名（和文） 新規遺伝子解析法を用いた乳癌の治療効果予測に関する探索的研究

研究課題名（英文） Trial of determining prognostic factors in breast cancer patients.

研究代表者

長田 拓哉（NAGATA TAKUYA）

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：40303242

研究成果の概要（和文）：

乳癌の予後予測に関する因子として iPS 細胞誘導因子（Oct4、Sox2、Klf-4、c-Myc、Nanog）に着目し、ヒト乳癌組織（100 例）、およびヒト乳癌培養細胞（MCF-7）における iPS 細胞誘導因子の発現とその動態に関する研究を行った。その結果、Nanog の高発現群は生存率（OS）、及び無再発生存率（DFS）ともに有意に不良であった。一方、Klf-4 の高発現群は DFS が有意に良好であった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of present study, is to examine the relationship between the expression of iPS cell inducing factors (Oct4, Sox2, Klf-4, c-Myc, Nanog) and the prognosis of the breast cancer patients. Strong expression of NANOG was an indicator of a poor prognosis for breast cancer patients, while KLF4 was a favorable prognostic indicator.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：乳腺外科学, iPS 細胞, Nanog, KLF4

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで乳癌に対する新規遺伝子治療に関する研究を行ってきた。その研究過程において、我々の施設では手術で切除した標本から得られた乳癌組織、および正常乳腺組織の初代培養手技を確立し、実際に数多くの培養細胞を保有している。

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) とは、マウスやヒトの体細胞（線維芽細胞等）に Oct4、Sox2 に加えて Klf4、c-Myc、あるい

は Nanog の遺伝子を導入することにより発現する、多能性を持った幹細胞である。これらの iPS 細胞誘導因子は胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES 細胞) で特異的に発現するだけでなく、正常細胞や乳癌細胞での発現も報告されている。これらの因子は幹細胞における多能性の獲得以外にも、正常細胞の癌化とその増殖能、および転移能の獲得に関する関与が示唆されているが、その作用についてはまだ明確でない部分も多い。

## 2. 研究の目的

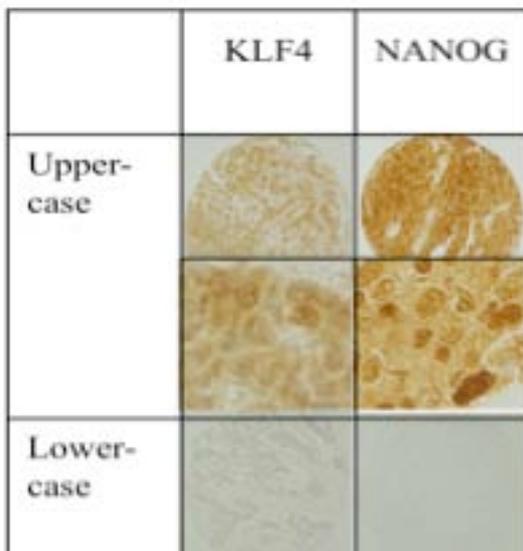
- ①乳癌患者に対して治療効果、および生命予後を予測できる新規バイオマーカーとして iPS 細胞誘導因子に着目し、ヒト乳癌組織における iPS 細胞誘導因子の発現と術後再発、および予後との関連性解析を目的とした。
- ②乳癌に対する治療効果予測を可能とする遺伝子発現プロファイル解析の基礎研究を目的とした。

## 3. 研究の方法

- ①乳癌切除組織 (100 症例) より組織アレイ (TMA1150、TMA Breast) を作製した。iPS 細胞誘導因子 (Oct4、Sox2、Klf-4、c-Myc、Nanog) の発現解析を行った。各因子の発現程度は、染色強度 {intensity score; 0 点 (無)、1 点 (弱)、2 点 (中)、3 点 (強)}、および染色分布 {distribution score ; 0 点 (0%)、1 点 (1-50%)、2 点 (50-100%)} の合計点数で表した。得られた点数により、各症例を低発現群 (Low group: 0-2 点) と高発現群 (High group: 3-5 点) に分類した。得られたデータと生命予後や薬剤感受性との関連について検討した。
- ②乳癌培養細胞 (MCF7) を用いて、Nanog 遺伝子をトランスフェクションし、Nanog を強制発現させる実験系を構築した。また KLF4 の SiRNA をトランスフェクションして、KLF4 の発現を抑制させる実験系を構築して、各因子 (Nanog、KLF4) が乳癌増殖転移能の獲得と抑制に果たす役割について解析した。
- ③得られた結果を基に、薬剤感受性予測チップに関する基礎的研究を行う。

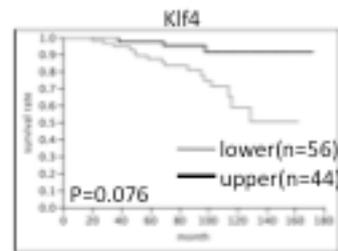
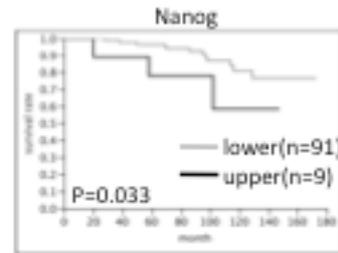
## 4. 研究成果

- ①100 症例における各 iPS 誘導因子の発現頻度は、Oct-4 (20%)、Sox2 (34%)、KLF-4 (44%)、C-Myc (45%)、Nanog (9%) であり、KLF-4、C-Myc の発現率が高く、Nanog、Oct-4 の発現は低い傾向が認められた。

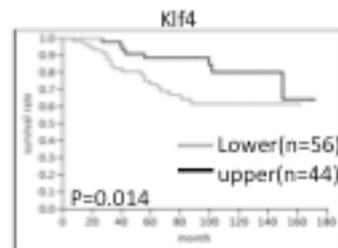
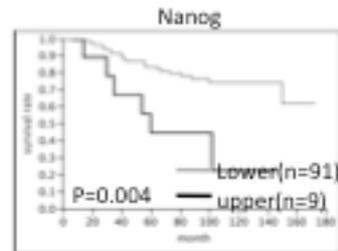


各因子の発現と閉経状況、ホルモンレセプター、Her2 発現、病期、および組織型の間に見られる相関は認められなかった。Nanog の高発現群は生存率 (OS ;  $p=0.033$ )、無再発生存率 (DFS ;  $p=0.004$ ) とともに有意に不良であった。一方、Klf-4 の高発現群は DFS が有意に良好であった ( $p=0.014$ )。また、OS について有意差は認めないものの、同様に低発現群が低値となる傾向を示した ( $p=0.076$ )。

### OS

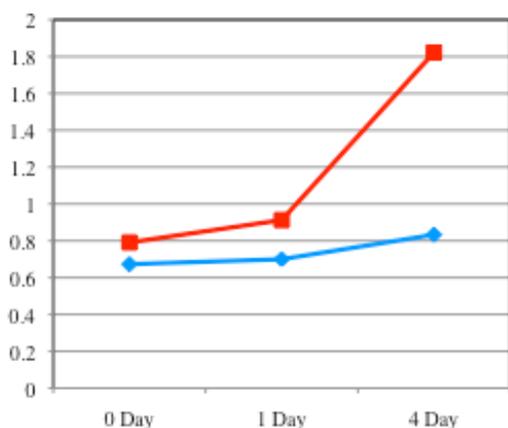


### DFS



- ②培養細胞である MCF7 では Nanog 陰性、Klf-4 陽性の結果であった。MCF7 細胞に KLF4 の Si-RNA を導入し、KLF4 の発現を抑制したところ、MCF7 細胞の増殖能が増加した。

- SiKLF4 1.5nM
- SiKLF4 5nM



③薬剤感受性予測チップに関する基礎的研究については、現在研究途中であり、結果については後日発表予定である。

#### 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 20 件)

- ① Nagata T · Shimada Y · Tsukada K,  
Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. Breast Cancer. 2012 査読有 DOI 10.1007/s12282-012-0357-y
- ② Osawa S, Shimada Y, Nagata T, Tsukada K MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded sample. ONCOLOGY LETTERS 2: 613-619, 2011. 査読有
- ③ Shimada Y, Nagata T, Tsukada K. Usefulness of blood supply visualization by indocyanine green fluorescence for reconstruction during esophagectomy. Esophagus, 8: 259-266, 2011. 査読有
- ④ 長田拓哉、魚谷英之、塚田一博. 肝・胆道系症候群 (第 2 版) -その他の肝・胆道系疾患を含めて- III肝外胆道編 II胆嚢 その他 陶器様胆嚢. 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ、15: 477-479、2011 査読無

⑤ 塚田一博、松井恒志、長田拓哉、特集 外科医が知っておくべき徴候と症候群 V. 肝臓・門脈・脾臓 1. Budd-Chiari 症候群、外科、73: 1358-1360、2011. 査読無

⑥ 塚田一博、長田拓哉、澤田成朗、特集: ステージに応じた胆嚢癌手術 I. リンパ節郭清を伴う胆嚢摘出術 1 胆嚢癌に対する全層・単純胆嚢摘出術とリンパ節郭清、手術、65: 1853-1857. 2011、査読無

⑦ 松井恒志、長田拓哉、塚田一博、門脈圧亢進症・脾機能亢進症、消化器外科学レビュー、113-118、2011. 査読無

⑧ Shibuya K, Fukuoka J, Tsukada K. Increase in ouabain-sensitive K<sup>+</sup>-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  3-isoform. European Journal of Pharmacology. 638: 42-46, 2010. 査読有

⑨ Wei Zhang, Tsukada K, Naihong Chen, Tumor necrosis factor -  $\alpha$  accelerates apoptosis of steatotic hepatocytes from a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. Biochemical and Biophysical Research Communications. 391: 1731-1736, 2010. 査読有

⑩ Ortiz C, Ito T., Shimada Y.: Effect of small interfering RNAs targeting fascin on human esophageal squamous cell carcinoma cell lines. Diagnostic Pathology. 41-50, 2010. 査読有

⑪ Haruki S, Shimada Y., Kawano T., Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. 1027-1036, 2010 査読有

⑫ 長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博、食道癌に対する集学的治療の効果予測と個別化治療、消化器外科、33: 1339-1345、2010. 査読無

⑬ 奥村知之、塚田一博、長田拓哉、門脈と脾臓の Update I 門脈 6. 食道・胃静脈瘤に対する外科治療の役割、外科、72、32-35、2010. 査読無

⑭ 松井恒志、長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博、Anastrozole が著効した高齢者乳癌の 1 例、癌と化学療法、37: 1557-1560、2010. 査読有

⑮ 大村哲也、嶋田 裕、塚田一博、食道癌術後再建結腸癌の 1 切除例、手術、64 : 1999-2002、査読有

⑯ 塚田一博、門脈域分水嶺からみた門脈圧亢進症の治療のあり方、日門亢会誌、16 : 176-179、2010、査読有

⑰ 澤田成朗、長田拓哉、塚田一博、外科臨床に必要な漢方の基礎知識—肝胆膵疾患に対する漢方治療、外科治療、103 : 559-563、2010、査読有

⑱ Watanabe T, Tsukada K, Sakai H, Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells. J Physiol Sci. 59: 113-122, 2009. 査読有

⑲ Shimada Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G, Tsukada K. cDNA microarray analysis of esophageal cancer : discoveries and prospects. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 57: 347-356, 2009. 査読有

⑳ 塚田一博、嶋田 裕、長田拓哉、消化器癌の診断・治療 胆嚢癌 診断と外科治療の選択、消化器外科、32 : 869-873、2009. 査読無

[学会発表] (計 28 件)

① Shimada Y, Preliminary results of prone-position esophagectomy, International Surgical Week /ISW2011, 2011, 8, 28-9. 1, 横浜

② Shimada Y, Case of peptic ulcer in the gastric tube substituted for esophagus after esophagectomy, International Surgical Week /ISW2011, 2011, 8, 28-9. 1, 横浜

③ Shimada Y, Prediction of chemosensitivity of gastric cancer patients by micro-RAN profilig using formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) specimens, 9th International Gastric Cancer Congress, 2011, 4, 20-23, ソウル

④ Shimada Y, microRNA profiling of esophageal squamous cell carcinoma pa from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens. AACR 102nd ANNUAL MEETING, 2011, 4, 2-6, オランダ

⑤ Shimada Y, microRNA profiling of esophageal squamous cell cancer and gastric cancer from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) specimens. 13th World congress on gastrointestinal cancer. 2011, 6, 22-25. バルセロナ

⑥ Nagata T, The influence of iPS-inducing factors NANOG and KLF4 in the prognosis of patients with breast cancer. 2011 Breast Cancer Symposium. 2011, 9, 8-10. サンフランシスコ

⑦ Nagata T. A trial of nutritional support after breast cancer operation. 16th Reach to Recovery International Breast Cancer Support Conference. 2011, 11, 9-12. 台北

⑧ 長田拓哉, 乳癌における HR, HER2 発現と iPS 細胞誘導因子の検討, 第 111 回日本外科学会定期学術集会, 紙上開催 2011

⑨ 長田拓哉, 門脈圧亢進症患者における脾摘後免疫担当細胞の動態について, 第 66 回日本消化器外科学会総会. 2011, 7, 13-15, 名古屋

⑩ 長田拓哉, 乳癌における iPS 細胞誘導因子の解析. 第 32 回癌免疫外科研究会, 2011, 5, 19-20. 和歌山

⑪ 長田拓哉, 乳癌細胞における iPS 誘導因子の関与. 第 19 回日本乳癌学会学術総会, 2011, 9, 2-4. 仙台

⑫ 長田拓哉, 門脈圧亢進症患者における脾臓の検討. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会. 2011, 9, 15-16, 福岡

⑬ Shimada Y. MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples. 101st annual meeting of AACR 2010, 4, 17-21 Washington.

⑭ Shimada Y Predicting sensitivity for preoperative 5-Fu plus cisplatin regimen by DNA microarray analysis of preoperative endoscopic biopsy specimens from esophageal cancer patients. 12th world congress of the diseases of the esophagus 2010, 9, 2-5 Kagoshima

⑮ Shimada Y. Analysis of iPS inductive gene expression by esophageal cancer tissue array. 12th world congress of the diseases of the esophagus. 2010, 9, 2-6 Kagoshima.

⑯ Shimada Y. Usefulness of the blood supply visualization in gastric tube during esophagectomy by indocyanin green fluorescence. 12th world congress of the diseases of the esophagus. 2010, 9, 2-6 Kagoshima.

⑰ Shimada Y. Usefulness of the blood supply visualization in reconstructive organ during esophagectomy by indocyanin green fluorescence. 96th Annual Meeting of American College of Surgeons, 2010, 10, 3-10 Washington DC

⑱ 長田拓哉、乳癌細胞におけるホルモンレセプター、HER2発現と iPS 細胞誘導因子の検討、第 18 回日乳癌学会学術総会、2010, 6, 24-25、札幌市

⑲ 長田拓哉、門脈圧亢進症患者における脾摘後の血液中リンパ球の動態、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010, 7, 14-16 下関市

⑳ 長田拓哉、鏡視下乳房温存手術において術後温存乳房の整容性をさらに高める工夫、第 23 回日本内視鏡外科学会総会、2010, 10, 18-20 横浜

21. Shimada Y. Visualization of blood supply in gastric tube during esophagectomy by indocyanin green fluorescence. The 43rd World Congress of International Society of Surgery. 2009, 9, 6-10, アデレード

22. Shimada Y. Successful resection of primary cancer in a colonic interposition graft after esophagectomy for esophageal cancer : a case report. The 43rd World Congress of International Society of Surgery. 2009, 9, 6-10. アデレード

23. 長田拓哉、乳癌術後栄養管理における当科の試み、第 24 回日本静脈経腸栄養学会、2009, 1, 29-30、鹿児島

24. 長田拓哉、乳輪周囲非切開手技による鏡視下乳房温存手術、第 109 回日本外科学会定期学術集会、2009, 4, 2-4、福岡

25. 長田拓哉、非浸潤性乳管癌 (DCIS) における切除断端腸性症例の検討、第 17 回日本乳癌学会学術総会、2009, 7, 3-4、東京

26. 長田拓哉、門脈圧亢進症患者における脾摘後の血液中リンパ球の動態について、第 16 回日本門脈圧亢進症学会総会、2009, 9, 10-11、郡山

27. 長田拓哉、鏡視下頸部手術の検討、第 42 回日本甲状腺外科学会学術集会、2009. 10, 15-16、名古屋

28. 長田拓哉、鏡視下乳房温存切除術の適応について、第 71 回日本臨床外科学会総会、2009. 11. 19-21、京都

〔図書〕(計 3 件)

① 塚田一博、奥村知之、吉岡伊作、胆嚢癌：胆嚢床切除～S4a・S5、胆管切除、胆・膵外科手術 標準手術からのステップアップ、48-64 2011

② 嶋田 裕、長田拓哉、塚田一博：食道癌個別化治療に向けた高感度 DNA チップの開発と応用、分子細胞治療フロンティア 2010、175-180、2010.

③ 松井恒志、塚田一博、門脈圧亢進症・脾機能亢進症、消化器外科学レビュー2010、105-109、2010

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/surg2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 拓哉 (NAGATA TAKUYA)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：40303242

(2) 研究分担者

塚田 一博 (TSUKADA KAZUHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：90171967

(3) 連携研究者

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：30216072