

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06915

研究課題名(和文) MYC高発現乳癌における若年性乳癌：転写因子E2F5の関与機序の解明

研究課題名(英文) Hyperexpression of MYC gene in early onset breast cancer: Contribution of a transcriptional factor E2F5

研究代表者

増田 しのぶ(MASUDA, Shinobu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：20276794

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)：若年性乳癌(AYA乳癌)の癌化機序におけるMYC高発現の有無、MYC遺伝子増幅の頻度、細胞増殖/細胞周期経路の活性化機序を目的とした。臨床病理学的検討ならびにRNA sequenceを用いた遺伝子発現解析を行った。AYA群でc-MYC IHC陽性症例割合が有意に高く、non-AYA群においては、高悪性度群(高核異型度、高組織学的異型度、Ki-67陽性率 20%、トリプルネガティブ乳癌)で、c-MYC IHC陽性症例割合が有意に高いことが明らかになった。AYA群でのMYC増幅率は11.9%、non-AYA群では8.2%であり、陽性率に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、AYA群でc-MYC IHC陽性症例割合が有意に高いことが明らかになった。また、non-AYA群においては、高悪性度群(高核異型度、高組織学的異型度、Ki-67陽性率 20%、トリプルネガティブ乳癌)で、c-MYC IHC陽性症例割合が有意に高いことが明らかになった。これらの結果からは、AYA群がnon-AYA群に比較して予後不良であること、またnon-AYA群の予後不良因子の一つとしての可能性、ならびに今後の研究の方向性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify whether MYC overexpression contributes to carcinogenesis of young onset breast cancer (AYA breast cancer), the frequency of MYC gene amplification, and activation of cell proliferation/cell cycle pathways. Clinicopathological study and gene expression analysis using RNA sequencing were performed. The proportion of c-MYC IHC positive cases was significantly higher in the AYA group. Especially, in non-AYA group, the proportion of c-MYC IHC positive cases was significantly higher in the high-grade group (high nuclear grade, high histological grade, Ki-67 positivity rate 20%, triple-negative breast cancer). MYC amplification was detected in 11.9% of the cases of the AYA group, and 8.2% of the non-AYA group.

研究分野：人体病理学

キーワード：年性乳癌 MYC E2F5

1. 研究開始当初の背景

乳癌患者における40歳未満の割合は約7.7%であり、とくに35~39歳の患者が増加傾向にある。若年性乳癌は予後不良であり、さらに就労問題をはじめとする様々な社会的課題が指摘されている。特にライフプランに与える影響は大きく、妊娠出産などの生殖医療との連携が喫緊の課題となっている。若年性乳癌は、高齢者乳癌と異なる内因性サブタイプの分布を示し、ER陰性/HER2陰性乳癌の割合はそれぞれ、34.3% (40歳未満)、17.9% (65歳以上)である。一方、ER陰性乳癌について、網羅的遺伝子発現のメタ解析による*MYC* (8q24.21)の高発現が報告されており、われわれは*E2F5* (8q21.2)高発現を報告している。さらに、8q gainを示す乳癌にはER陰性の頻度が高いことが報告されている。以上から、若年性乳癌において8q gain、*MYC*高発現症例が集積している可能性が高いとの着想に至った。

2. 研究の目的

若年性乳癌の癌化機序における*MYC*高発現の関与の有無を明らかにする。さらに、*MYC*高発現の分子背景について、遺伝子増幅の頻度、細胞増殖/細胞周期経路の活性化、*MYC*-*E2F* family 連関について解明することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

【対象】日本大学板橋病院で診断、加療された39歳以下の若年性乳癌患者(AYA群)42症例(2015.5.31~2021.5.31)である。日本大学板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を受けて行った(RK-160712-11)。

【方法】

(1) 臨床病理学的検討

症例：AYA群42例と傾向マッチングして選択された55歳以上のnon-AYA対象群110例
免疫染色：4μmの厚さで薄切したFFPE標本を脱パラフィン後、pH9賦活液にて熱処理し、抗c-Myc (clone Y69) (1:200; abcam) 抗体を室温にて45分間反応させた。二次抗体にヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイ)を用いた。PBS洗浄、DAB発色後、ヘマトキシリンで核染色を行い、Allred scoreにより評価した。Allred score 3以上を陽性とした。

FISH法：*MYC* DNAの増幅について、ヒストラC-MYC/Ch-8 FISHプローブ(常光)を用いたfluorescence in situ hybridization (FISH)法により検討した。4μmの厚さで薄切したFFPE標本を、脱パラフィン、前処理した後、蛍光プローブとハイブリダイゼーションさせた。*MYC*と*CEP8*の蛍光シグナルはAxio Imager Z2 Upright Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で検出し、ZEN 2 pro software (Carl Zeiss)により画像を取得した。症例毎の*MYC/CEP8*のシグナル比率を算出し、2.0以上を増幅とした。

MYC DNA定量解析：8μm切片を用いてレーザーマイクロダイセクション法で腫瘍細胞を回収し(平均回収領域4.4mm²)、ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega)を用いてDNA抽出後、TaqMan®法による*MYC* DNA定量解析を行った(Assay ID; Hs01764918_cn, Thermo Fisher Scientific inc.)。内因性コントロール*RNaseP* DNAに対する相対定量値を算出した。

統計解析：臨床病理学的因子との関係を二乗検定ならびにマンホイットニーのU検定を用いて解析した。

(2) 遺伝子発現解析

症例：AYA乳癌(A群)、non-AYA乳癌(C群)それぞれについて、c-Myc IHC陽性(P群)、陰性(N群)の4群(AP, AN, CP, CN群)、各5症例、計20症例について比較検討した。

RNaseq解析：FFPE切片(各10枚)よりRNA抽出を抽出し、Hieff NGS™ MaxUp rRNA Depletion Kit (Yeasen Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China)ならびにHieff NGS™ Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit (Yeasen Biotechnology Co., Ltd.)を用いてLibraryを作製した。DNBSEQ-G400 (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China)を用いて実施した。

データ解析は、SOPAnuke*を用いて(1)シーケンスアダプターを含むリードを削除、(2)低品質塩基比率(塩基品質15以下)が20%を超えるリードを除去、(3)未知の塩基('N'塩基)比率が5%を超えるリードを除去のフィルター処理を行った。得られたクリーンリードはFASTQ形式で保存した。その後の解析とデータマイニングは、Dr. Tom Multi-omics データマイニングシステム (<https://biosys.bgi.com>)で実行した。

*C.Y.S.C.Chen Y, Gigascience, 7, 1-6, 2018.

4. 研究成果

(1) 臨床病理学的検討結果

AYA 群と non-AYA 群について以下の項目について比較検討した。c-MYC IHC 陽性症例の割合は、AYA 群で 57.1% (24/42)、non-AYA 群で 30.0% (33/110)であり、AYA 群で有意に多かった ($P < 0.0001$)。

AYA 群と non-AYA 群をそれぞれ別に検討した。c-Myc IHC 陽性症例の割合は、Non-AYA 群の高悪性度症例で有意に高かった (核異型度, $p < 0.001$; 組織学的異型度, $p = 0.003$; Ki-67 陽性率 20%, $p < 0.001$; トリプルネガティブ乳癌, $p < 0.001$)。c-Myc IHC Allred score については、AYA 群、non-AYA 群いずれにおいても高悪性度症例で有意に高かった (核異型度, AYA 群 $p < 0.05$, non-AYA 群 $p < 0.001$; 組織学的異型度, AYA 群 $p < 0.05$, non-AYA 群 $p < 0.001$)。

FISH 法

FISH 法による MYC DNA 増幅増を Fig 1 に示す。AYA 群での MYC 増幅例は 11.9% (5/42)、non-AYA 群では、8.2% (9/110)であり、陽性率に有意な差は認められなかった。また、FISH score と c-Myc IHC による Allred score とは有意な相関を示さなかった。

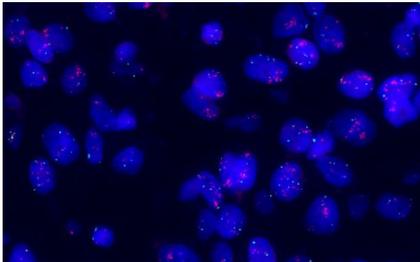


Fig 1. FISH法により MYC DNA の増幅が示された1例。核 (青) 内の CEP8 のシグナル (緑) に対して MYC 領域のシグナル (赤) が2倍以上存在する。

(2) 遺伝子発現解析結果

RNAseq 解析で得られた 18,082 遺伝子の volcano plot 解析の結果、AP 群では AN 群に対して、315 遺伝子が発現上昇し、395 遺伝子が発現低下していた (Fig 2A)。

KEGG Pathway 解析によると、AP 群/AN 群の変化が最も有意であった (Fig 2B)。

AN 群に対して AP 群で発現上昇、発現低下が指摘された遺伝子が明らかになった。

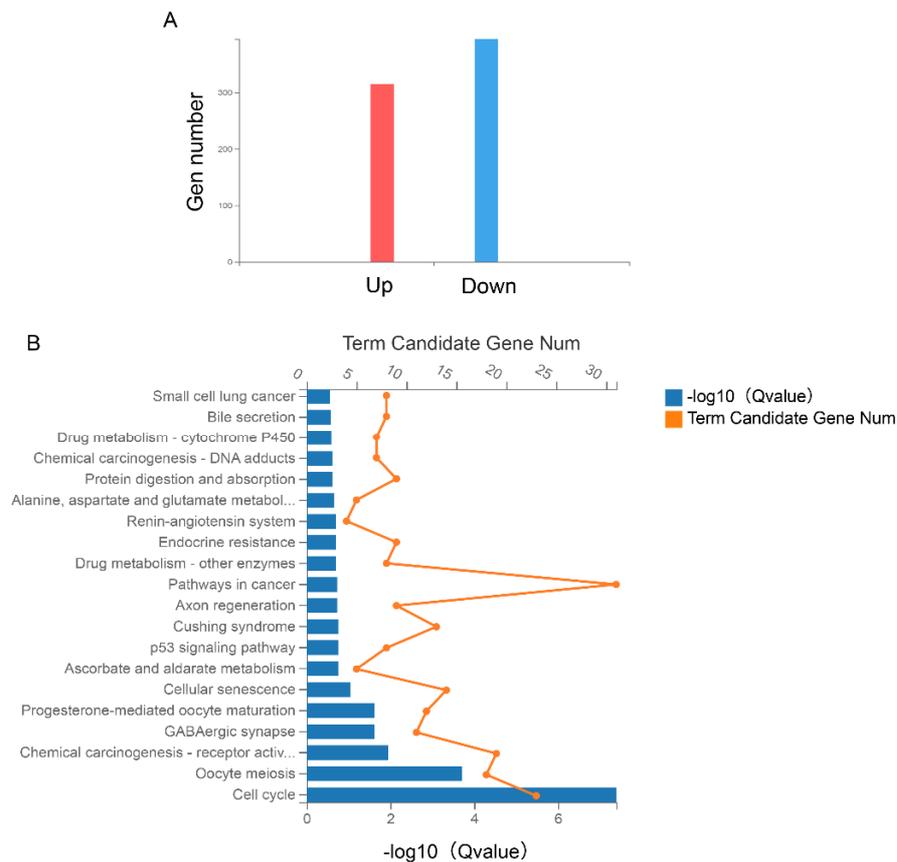


Fig 2. RNAseq 解析結果

A: AN 群に対して AP 群で発現量に有意な差を認めた遺伝子数、B: KEGG pathway 解析により、AN 群に対して AP 群で発現量に有意な差を認めた遺伝子が含まれる pathway

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷野智將、廣谷ゆかり、中西陽子、野寄 史、大荷澄江、西巻はるな、小林博子、唐 小燕、増田しのぶ |
| 2. 発表標題 若年性乳癌患者におけるMYC高発現に関する研究 |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷野智將、中西陽子、廣谷ゆかり、野寄 史、大荷澄江、西巻はるな、小林博子、唐 小燕、増田しのぶ |
| 2. 発表標題 若年性乳癌患者におけるMYC高発現：高齢者乳癌との比較検討 |
| 3. 学会等名 第112回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷野智將、中西陽子、廣谷ゆかり、渡邊(西巻)はるな、大荷澄江、野寄史、唐小燕、増田しのぶ |
| 2. 発表標題 RNA seq解析による若年性乳癌におけるc-myc高発現の意義の検討 |
| 3. 学会等名 第113回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2024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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 坂東 裕子 (BANDO Yuko) (00400680) | 筑波大学・医学医療系・准教授 (12102) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 清水 千佳子 (SHIMIZU Chikako) (10399462) | 国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・乳腺・腫瘍内科 診療科長 (82610) | |
| 研究分担者 | 渡邊 知映 (WATANABE Chie) (20425432) | 昭和大学・保健医療学部・教授 (32622) | |

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 |
|---------|---------|
| | |