

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460410

研究課題名(和文) 転移・再発乳癌におけるエストロゲン作用の解明：内分泌療法の向上をめざして

研究課題名(英文) Analysis of sex hormone actions in metastatic / recurrent breast cancer

研究代表者

鈴木 貴 (SUZUKI, TAKASHI)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10261629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 転移・再発乳癌の大部分はエストロゲン受容体(ER)が陽性で、エストロゲン作用の重要性が推察される。本研究の結果、(1) ER陽性乳癌では転移・再発の有無に応じて遺伝子やmicroRNAの発現プロファイルが異なっていること、(2) miR-1、GATA4、thymidylate synthase、TACC2等は転移・再発に重要な役割を担っており、その発現が予測因子となりうること等が明らかとなった。本研究によってER陽性乳癌における転移・再発の分子機序の一端が明らかとなり、このような因子が今後重要な治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metastatic / recurrent breast cancer remains a highly lethal disease, and it is very important to evaluate the biomarkers associated with the distant metastasis. A great majority of metastatic / recurrent breast carcinomas expresses estrogen receptor (ER), suggesting importance of estrogenic actions. However, the molecular features have remained largely unclear in the metastatic / recurrent breast carcinomas. Results our present study have demonstrated that expression profiles of microRNA and genes in the breast carcinoma were different according to the metastatic or recurrent status. Especially, miR-1, GATA4, thymidylate synthase and TACC2 played important roles in the metastasis and/or recurrence in the breast carcinoma, and they were demonstrated as potent prognostic factors of breast cancer patients. Therefore, these factors may become important therapeutic targets to improve the clinical outcome of metastatic / recurrent breast cancer patients in future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 エストロゲン 遠隔転移

1. 研究開始当初の背景

我が国における乳癌の発生頻度は増加の一途をたどっている。画像診断の進歩や検診の普及とともに早期乳癌の割合が増え、治療成績も著しく向上してきたが、依然として進行した乳癌に接する機会も多い。特に転移・再発乳癌は治療が困難で、遠隔臓器へ転移した症例は化学療法を行なっても10年生存率は5-25%程度にとどまるのが現状である。従って転移・再発乳癌の特性を理解し治療法を向上させることは、乳癌を克服する上できわめて重要な課題である。

乳癌の増殖や進展には女性ホルモンであるエストロゲンが深く関与しており、その作用を阻害する内分泌療法は重要な治療法となっている。転移・再発乳癌でも、他の乳癌と同様に大部分の症例でエストロゲン受容体(ER)が陽性であり、エストロゲン作用の重要性が推察されている。しかし遠隔臓器への転移や再発に関するエストロゲン作用はほとんど研究されておらず、その分子機序も不明のままである。

2. 研究の目的

そこで本研究では、遠隔臓器転移例を中心に転移・再発乳癌におけるエストロゲン作用を詳細に検討し、内分泌療法に新たな視点を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検索対象。(1-1) 外科手術で得られた乳癌組織(ホルマリン固定パラフィン包埋検体:211例)(1-2) ER陽性遠隔転移症例(凍結検体:8例)(1-3) 乳癌培養細胞(MCF-7、MDA-MB-453)

(2) 網羅的マイクロアレイ。Whole Human Genome Oligo Microarray (アジレント)。

(3) microRNA PCR アレイ。miScript miRNA PCR Array (キアゲン)。

(4) 発現解析。(4-1) Real-time PCR: cDNA は RT キット (Superscript II preamplification system、Gibco BRL) で合成され、LightCycler System (Roche Diagnostics) を用いた。(4-2) immunoblotting: 抽出タンパクは Hybond PVDF membranes (GE Healthcare) にトランスファーされ、ECL- Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) 及び ChemiDoc XRS+ system (BioRad Laboratories) を用いて、目的のバンドを検出した。(4-3) 免疫組織化学: ヒストファインキット(ニチレイ)を用いてストレプトアビジン-ビオチン法で行った。

(5) 機能解析。(5-1) 細胞増殖能実験: Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 法で行った。(5-2) 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) assay: BrdU Labeling and Detection Kit II (Roche Diagnostics)を用いて行った。(5-3) Wound-healing assay: コンフルエントになった培養細胞を P-200 ピペットチップで傷つけた後、細胞の遊走領域を MultiGauge v3.1 Software (フジフィルム) で評価した。

4. 研究成果

(1) 再発乳癌における遺伝子発現プロファイルの解析。術後再発をきたした ER 陽性乳癌(20例)の遺伝子発現を網羅的マイクロアレイで解析し、GATA4 と thymidylate synthase (TS) を新たな再発関連遺伝子として見出した。乳癌組織における GATA4 の発現意義を免疫組織化学的に検討した結果、GATA4 は 27% の非浸潤癌及び 31% の浸潤癌に発現し、異型度、遠隔転移、HER2

と相関する一方、プロゲステロン受容体 (PR) と逆相関した。さらに術後療法に関わらず独立した予後不良因子であった (発表論文 6)。一方 TS はエストロゲン依存性増殖に関与し、非浸潤癌においてアロマターゼ阻害剤投与後に発現が有意に低下した。また ER 陽性浸潤癌症例において TS は PR と相関し、独立した予後良好因子であった (発表論文 3)。

(2) 転移性乳癌における microRNA 発現プロファイルの解析。手術時に遠隔臓器転移をきたしていた 11 例の ER 陽性 Stage IV 症例における microRNA の発現を PCR アレイで網羅的に解析し、miR-1 を新たな転移関連 microRNA として見いだした。そこで 121 例の乳癌組織を用いて miR-1 の発現を *in situ* hybridization 法で解析した結果、miR-1 は 20% の症例で過剰発現し、病期、リンパ節転移、遠隔転移、異型度、ER、PR、Ki-67 等と相関する一方、独立した予後不良因子であった (発表論文 2)。miR-1 が予後不良性を示す機序を探索したところ、transforming acidic coiled-coil protein 2 (TACC2) の関与が想定された。そこで乳癌組織における TACC2 の発現意義を精査したところ、TACC2 は乳癌細胞 (MCF-7 及び MDA-MB-453 細胞) の増殖を促進した。免疫組織化学的には TACC2 は 51% の乳癌組織に発現し、Ki-67 と相関する一方、独立した予後不良因子であることが明らかとなった (発表論文 1)。

(3) 転移性乳癌における遺伝子発現プロファイルの解析。ER 陽性遠隔転移症例の凍結検体を用いて網羅的マイクロアレイを行った。その結果、遠隔転移の有無によって遺伝子プロファイルが異なることが明らかとなり、転移例で高発現する遺伝子 85 個、低発現する遺伝子 114 個を同定した。

以上の実験結果より、(1) ER 陽性乳癌では、転移・再発に応じて遺伝子や microRNA の発現プロファイルが異なっていること、(2) miR-1、GATA4、TS、TACC2 等は転移・再発に重要な役割を担っており、それらの乳癌原発巣における発現が重要な転移予測因子となりうるということが初めて示された。これは転移・再発乳癌の分子機序を理解する上できわめて重要な新知見であるばかりでなく、治療困難な転移・再発乳癌の克服のため、このような因子が今後重要な治療標的となりうる可能性が示唆された。

乳癌は骨、肺、肝、脳等に転移し、遠隔転移患者の臨床病態は転移臓器に応じて多彩である。従って本研究の成果を受け、今後は臓器に応じた転移機序の解明が重要になってくると思われる。

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 7 件)

1. Onodera Y, Takagi K, Miki Y, Takayama K, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Inoue S, Sasano H, Suzuki T. TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. *Cancer Med.* Accepted. (2016) 査読あり
2. Minemura H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Nakagawa S, Ebata A, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. Abnormal expression of miR-1 in breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2015 Nov;106(11):1642-50. doi: 10.1111/cas.12808. 査読あり
3. Takagi K, Miki Y, Nakamura Y, Hirakawa

- H, Kakugawa Y, Amano G, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. Immunolocalization of thymidylate synthase as a favorable prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Histol Histopathol.* 2015 Oct;30(10):1223-32. doi: 10.14670/HH-11-619. 査読あり
4. Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci Rep.* 2015 Aug 10;5:13170. doi: 10.1038/srep13170. 査読あり
5. Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, Yamaga R, Sato W, Horie-Inoue K, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. *Sci Rep.* 2015 Jan 6;5:7641. doi: 10.1038/srep07641. 査読あり
6. Takagi K, Moriguchi T, Miki Y, Nakamura Y, Watanabe M, Ishida T, Yamamoto M, Sasano H, Suzuki T. GATA4 immunolocalization in breast carcinoma as a potent prognostic predictor. *Cancer Sci.* 2014 May;105(5):600-7. doi: 10.1111/cas.12382. 査読あり
7. Onodera Y, Motohashi H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, Suzuki T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocr Relat Cancer.* 2014 Feb 27;21(2):241-52. doi: 10.1530/ERC-13-0234. 査読あり
- 〔学会発表〕(計0件)
- 〔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
鈴木 貴 (SUZUKI TAKASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10261629
- (2)研究分担者
()
研究者番号：
- (3)連携研究者
石田孝宣 (ISHIDA TAKANORI)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00292318