

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461975

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌におけるKLF4、Her4経路の解明と治療効果予測の研究

研究課題名(英文)Study of prognostic biomarker KLF4 and Her4 for triple negative breast cancer

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

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)：85例のTNBCに関するKLF4の発現について、免疫染色を用いて評価した。またTNBC患者のCTCを同定し、KLF4の発現を検討した。さらにTNBC培養細胞にKLF4のsiRNAを導入してKLF4の発現を抑制し、細胞増殖能、およびEMT様変化について解析した。

85例のTNBC症例において、KLF4高発現群は低発現群と比較してOS、DFSが有意に良好であった。またTNBC患者のCTCではKLF4の発現が低下していた。さらにKLF4の発現を抑制したTNBC細胞では細胞増殖能や細胞浸潤能が増強した。このとき各接着因子発現も抑制されており、EMT様の変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：We assessed the expression levels of KLF4 in 84 patients with TNBC by immunohistochemical staining. In addition, CTCs in the peripheral blood of TNBC patients were identified and compared with primary lesions in terms of KLF4 expression. Moreover, the expression of KLF4 was inhibited by transfecting cultured TNBC cells with the siRNA of KLF4 to analyze the effects of KLF4 on cell proliferation and EMT-like changes.

In the 84 patients with TNBC, higher KLF4 expression was associated with significantly better OS and DFS. KLF4 expression was lower in CTCs than in cancer cells in TNBC primary lesions. TNBC cells with inhibited KLF4 expression exhibited a greater ability to growth. These cells also underwent EMT-like changes with reduced expression of epithelial factors such as E-cadherin.

TNBC patients with reduced KLF4 expression had poor outcomes. The results of our experiments suggest the expression of KLF4 is one of the important factors that inhibit the EMT and growth of TNBC.

研究分野：乳癌 バイオマーカー

キーワード：TNBC CTC KLF4 siRNA EMT OS DFS

1. 研究開始当初の背景

乳癌細胞は遺伝子の発現形式により、LuminalA、LuminalB、HER2、Basal type (Triple negative)、Normal like typez という、5つの sub-type に分類する事ができる。また一方では、ER、PgR、HER2、Ki67 の IHC により 4 つの sub type に分類し、臨床の場で利用している。そのうち TNBC (Triple negative breast cancer) は転移再発しやすく、他の sub-type と比べて予後が悪いことが知られているが、TNBC の生物学的特徴については未だにはっきりとはわかっていない。

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) は多能性を持った幹細胞であり、Oct3/4、Sox2、Klf4 (c-Myc、Nanog、Lin28) などの遺伝子を繊維芽細胞等の正常細胞に導入する事により発現する (Takahashi K, Yamanaka S. et al. Cell. 126:663-76, 2006)。iPS 細胞が次世代の再生医療を担う鍵として注目されている一方で、iPS 細胞は乳癌を始めとする種々の癌細胞に置ける発現と機能についての報告もされている。

2. 研究の目的

我々は今回の研究期間に、iPS 誘導因子である KLF4、Nanog の TNBC 乳癌における増殖、転移メカニズムにはたす役割について研究した

3. 研究の方法

1. 1997年2月より2009年9月までに当科で施行された原発性乳癌切除症例 208 例に対し、切除組織より作成された組織アレイを用いて KLF4、Nanog の発現解析と subtype 別の生存分析を行った。

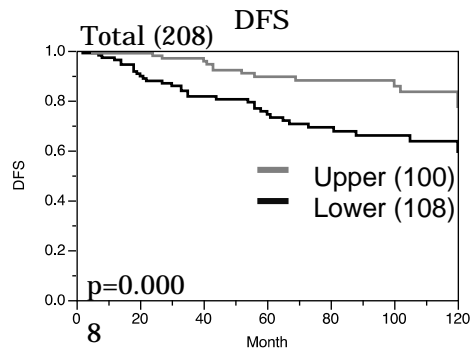
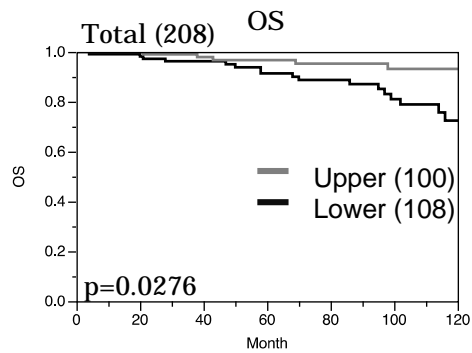
2. 関連5施設による共同研究として、TNBC 85 例について、KLF4 の発現とその生命予後に関する検討を行った。

3. TNBC 乳癌細胞株 (MBA-MD-231) に Klf4 の SiRNA を導入し、KLF4 の発現を抑制させることによる乳癌細胞増殖能の変化について解析する。また血液中遊走癌細胞 (CTC) における KLF4 の発現変化について解析した。

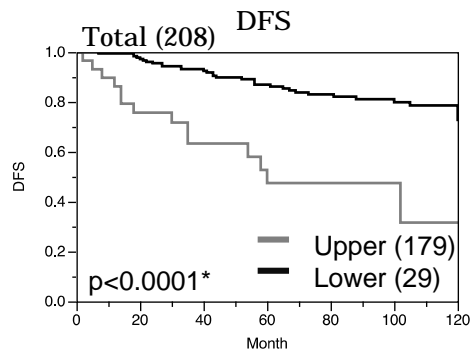
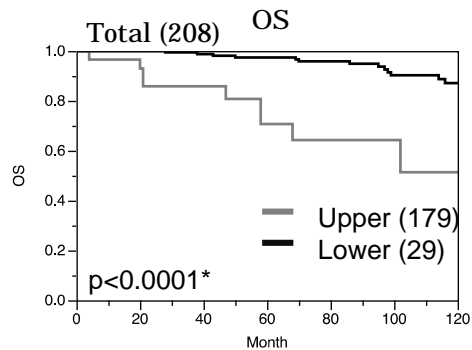
4. 研究成果

1. 乳癌症例 208 例における KLF4、Nanog 発現と臨床病理学的検討を行った。その結果、閉経、Sub-type、組織型と KLF4、Nanog 発現には、明らかな相関を認めなかった。

2. KLF4、Nanog 発現と生命予後
KLF4 の発現と生命予後の関係を、 Kaplan-Meier 法を用いて解析した。その結果、乳癌症例 208 例において、KLF4 高発現群では有意に OS、DFS が改善した。

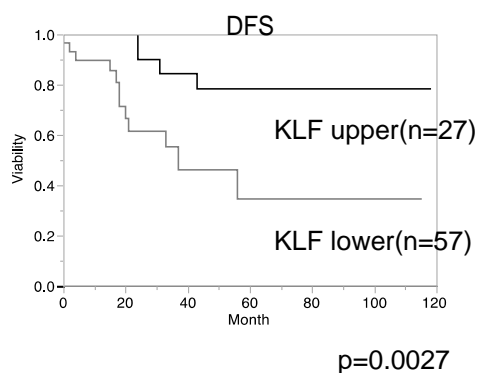
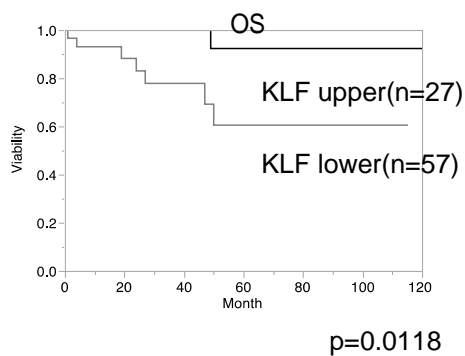


また Nanog 高発現群において予後が有意に増悪した。



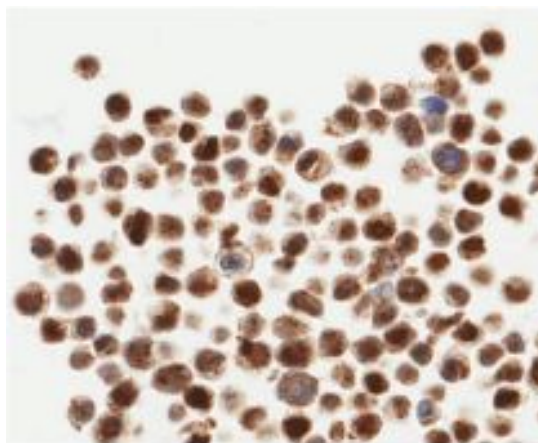
3. TNBCにおけるKLF4、Nanog発現と生命予後
TNBCにおけるKLF4の発現と生命予後の関係を明らかにするために、多施設共同研究を行っ

た。5つの施設から85症例に関する切除標本のプレパラートを集めてKLF4の発現を解析するとともに Kaplan-Meier法を用いて予後との関連性を解析した。その結果、KLF4の発現が高い程、生命予後が良好であった。

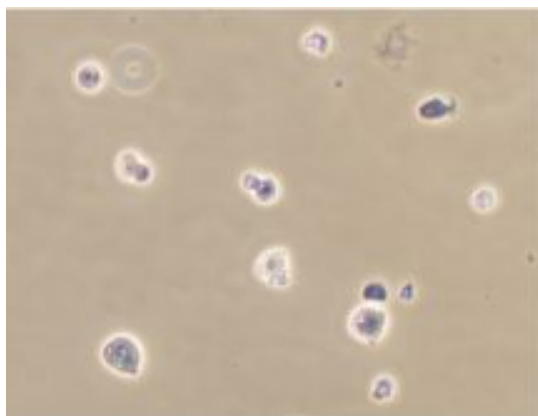


3. KLF4発現抑制とTNBCにおける転移、贈職能の変化

TNBC細胞株であるMDA-MB231細胞は元来、KLF4を高発現している。今回、SiKLF4遺伝子をMDA-MB231細胞に導入し、KLF4の発現を抑制した。



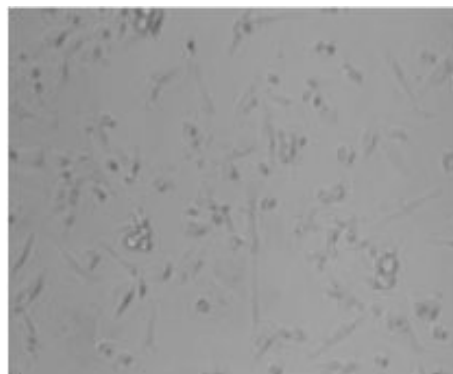
MDA-MB231細胞



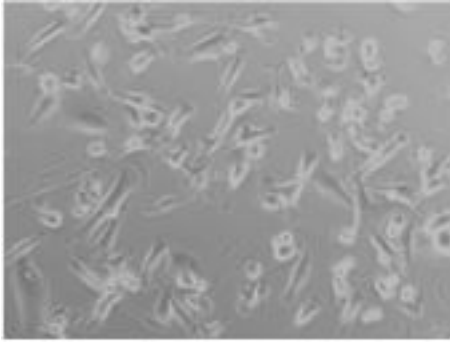
SiKLF4を導入したMDA-MB231細胞

KLF4mAbにて免疫染色した。

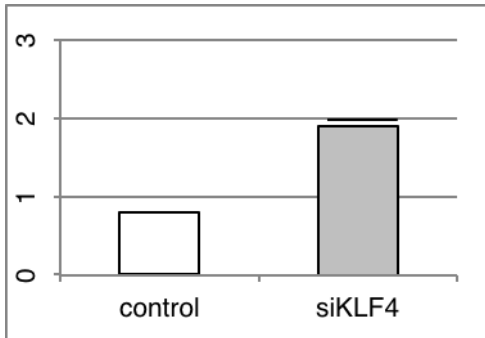
SiKLF4を導入したMDA-MB231細胞では、controlに比べて細胞増殖能が高くなった。



control

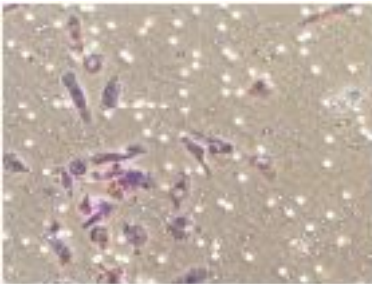


SiKLF4導入MDA-MB231

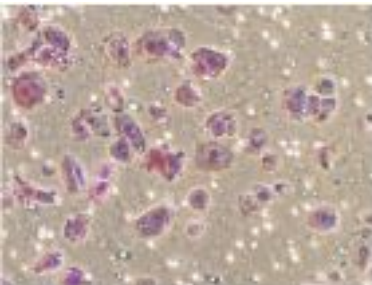


MTTアッセイによる、細胞増殖能

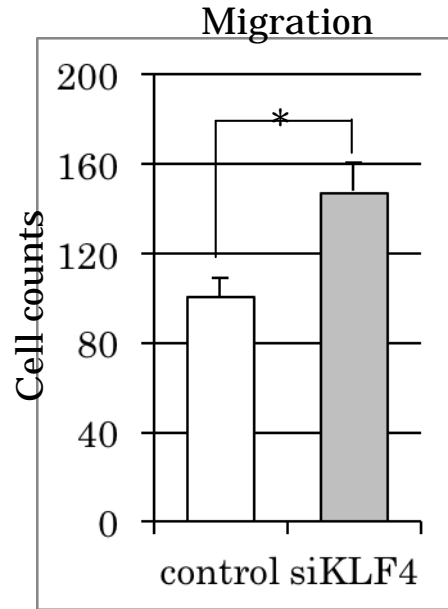
またこのとき、SiKLF4遺伝子を導入したMDA-MB231細胞では、細胞遊走能(migration)、および浸潤能(invasion)のどちらも増加した。



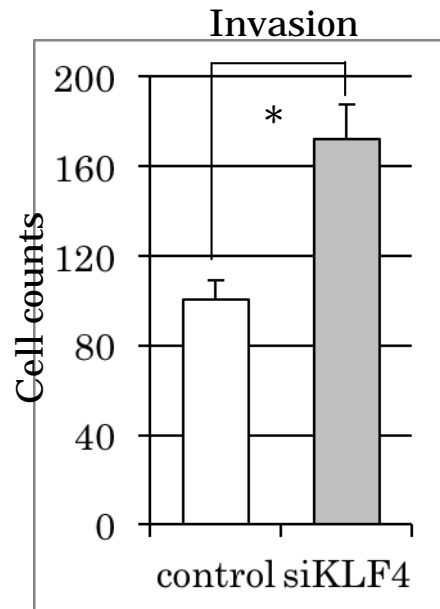
control



SiKLF4導入細胞



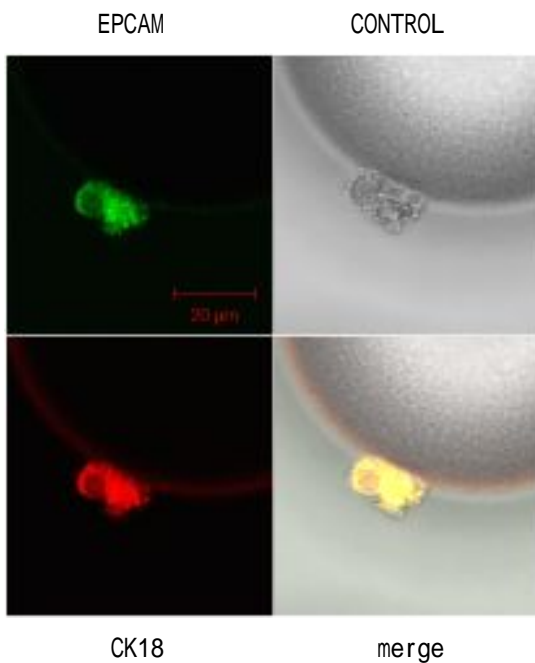
Tumor cell migration assay



Tumor cell invasion assay

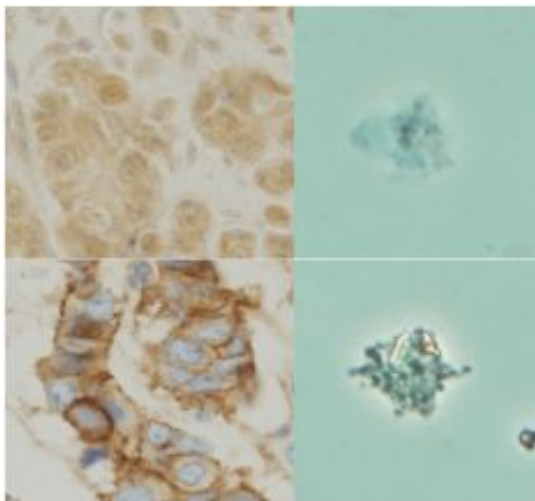
4. TNBC症例におけるCTCの同定

TNBC患者の抹消血液中に存在するCTCを捕捉しKLF4の発現を解析すると、原発巣の癌細胞と比較してCTCではKLF4の発現が低下していた。



CTCチップによるCTCの同定

Primary tumor CTC
Anti-KLF4mAb



Primary tumor CTC
Anti-CK18mAb

CTCではEMTマーカーであるE-cadherinの発現が低下していた。

5. 結論

KLF4 の発現が低下した TNBC 症例の予後は不良であった。CTC、および siRNA の実験結

果より、TNBC では KLF4 の低下により、EMT が誘導され、乳癌の転移増殖能が亢進すると考えられた。KLF4 の発現を高める治療は、TNBC の転移増殖を抑制する上で有用な戦略になり得ると考えられた。

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5件)

- 1) Ohnaga T*, Shimada Y, Moriyama M, Kishi H, Obata T, Takata K, Okumura T, Nagata T, Muraguchi A and Tsukada K. Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. Biomed Microdevices. 15(4): 611-6, 2013.
- 2) Nagata T*, Shimada Y, Sekine S, Osawa S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Fukuoka J and Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 in breast carcinoma patients. Breast Cancer 21: 96-101, 2014.
- 3) 長田拓哉*, 大永 崇, 呂 曉龍, 渡辺 徹, 平野勝久, 奥村知之, 塚田一博. 新規血液中浮遊癌細胞 (CTC) 捕捉システムによる乳癌患者末梢血液中の CTC 同定と抗癌剤感受性予測. 癌と化学療法. 2015; 42(10): 1240-42.
- 4) Nagata T*, Shimada Y, Sekine S, Moriyama M, Hashimoto I, Matsui K, Okumura T, Hori T, Imura J and Tsukada K. KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. Breast Cancer. 2016. May 23. [Epub ahead of print]
- 5) Nagata T*, Shimada K, Long LX, Okumura T, Tazawa K, Higashiyama K, Shimizu T and Ohbaga T. KLF4 improve prognosis of triple-negative breast cancer by suppression of epithelial-mesenchymal transition. Breast Cancer: Current Research. 2016. June 18. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 長田拓哉, 清水哲朗, 島多勝夫, 田澤賢一, 東山考一, 橋本伊佐也, 松井恒

志，塚田一博．トリプルネガティブ乳癌（TNBC）の予後予測マーカー・KLF4に関する多施設共同研究．第22回日本乳癌学会学術総会，要望演題，2014 July 11；大阪．

- 2) Nagata T, Tsukada K. Analysis of circulating tumor cell (CTC) from breast cancer patients with new CTC-chip. 46th World Congress of Surgery. 2015 August 23-27; Bangkok Thailand.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

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

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

小澤龍彦 (OZAWA Tatsuhiko)
富山大学 大学院医学薬学研究部
(免疫学) 助教
研究者番号：10432105

(3) 連携研究者

()

研究者番号：