

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：37404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461982

研究課題名(和文)次世代DNAシーケンサーを用いた高悪性度乳がんを引き起こす新規体細胞変異の探索

研究課題名(英文)Analysis of novel mutations in triple negative breast cancer using NGS

## 研究代表者

狩生 徹 (Kariu, Toru)

尚絅大学・生活科学部・准教授

研究者番号：10412735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん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、HER2の発現解析に基づいて分類される。上記3分子の発現がすべて低いトリプルネガティブと呼ばれる乳がんは全体の15 - 20%を占め、予後が悪いため再発、転移する確率が高い。トリプルネガティブ乳がんの特性の理解や特異的な治療法開発のためにも、その分子標的となるがん化に重要な変異の同定が不可欠である。これまでにアナフィラトキシン受容体に着目し、悪性度との関連を解析した。その結果、トリプルネガティブ乳がんにおけるアナフィラトキシン受容体発現量や予後との相関が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is categorized into three groups according to expressions of either of ER, progesterone receptor, and HERS. To understand and develop effective therapeutic agents against the triple negative breast cancer, we identified a correlation of the expression of anaphylatoxin receptor with cancer prognosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは1996年に日本女性の悪性腫瘍罹患率で第一位になり、2009年には11,918人が亡くなった。死亡率は19%であり、これは現在増加傾向にある(がんの統計、人口動態統計等)。乳がん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、HER2の発現解析に基づいて分類される。乳がんの6-7割がER陽性であり、ホルモン療法(タモキシフェン等)が奏功し、高分化で比較的予後が良いとされる。上記3分子の発現がすべて低いトリプルネガティブと呼ばれる乳がんは全体の15-20%を占め、ホルモン療法やターゲット治療法としてのトラスツズマブやラバチニブに感受性が低く、予後が悪いため再発、転移する確率が高い。血管新生阻害剤のベバシズマブ等を併用した臨床試験が海外で始まっているが(伊藤ら 米国臨床腫瘍学会)、トリプルネガティブ乳がんの特性の理解や特異的な治療法開発のためにも、その分子標的となるがん化に重要な変異の同定が不可欠である。

### 2. 研究の目的

がんで見られるゲノムの変異には染色体欠失、増幅、転座、点突然変異などが知られている。これらはいわゆる“ドライバー変異”と呼ばれ、それぞれのがんに特徴的で機能的に意味のある複数のゲノム異常が、がん細胞の無秩序な増殖・浸潤・転移につながると考えられている。最近注目されている分子標的治療のいくつかはこうしたゲノム異常によるがん遺伝子産物を標的としており、これらの薬剤の台頭は治療成績の向上をもたらした。乳がんでは受容体型チロシンキナーゼをコードするHER2遺伝子がドライバー変異として知られている。トラスツズマブやラバチニブはHER2タンパク質に特異的に結合する事で抗腫瘍効果を発揮する抗がん剤であり、HER2過剰発現が確認された転移性乳がんに対する分子標的治療薬として用いられるが、トリプルネガティブ乳がんではHER2が発現していないため効果が期待できない。トリプルネガティブ乳がんを規定づける新規ドライバー変異は未だ報告されておらず、変異同定へ向けて多くの研究グループがしのぎを削っている。申請者らのグループでも、次世代DNAシーケンサーを用いた乳がんや子宮筋腫の分子遺伝学的解析を新たなプロジェクトとして立ち上げ、着実に成果をあげつつある分子生物学会でも成果を発表した(2012 12月)。本申請研究では悪性度の高いトリプルネガティブ乳がんを絞り、診断・予後マーカーや分子標的薬剤開発への足掛かりとなる新規ドライバー変異の同定を行う。

新規ドライバー変異の同定は、有効な分子標的薬剤が無く抗がん薬療法のみで頼らざるを得ない高悪性度乳がんに対する有効な

治療標的となる可能性が高い。さらに同定された新規ドライバー変異は、薬物療法による効果を予測できるバイオマーカーであるため、従来のマーカーと組み合わせた詳細な治療方針を決定する個別化治療が可能となる。また治療薬を選択するためのコンパニオン診断や新たな病理診断法の開発も可能となるなど、本研究課題の成果はトリプルネガティブ乳がん治療への基礎知見として大きく寄与する。

### 3. 研究の方法

これまでに乳がんや子宮がん等のホルモン応答性がんでの発現が確認されたアナフィラトキシンC5a受容体に着目し、悪性度との関連を解析した。C5aは、補体系という自然免疫機構に関わるタンパク質の一つであり、炎症反応や免疫細胞の活性化などに重要である。一部の癌細胞の表面にはC5a受容体が発現しており、癌細胞も増殖や組織浸潤等にC5aを利用していると考えられている。乳癌及び舌癌培養細胞のRNAを抽出後、リアルタイムPCR法によりC5a受容体mRNAの発現量を解析した。また甲状腺癌の組織をスライス後、スライドガラス上に固定し、C5a受容体を認識する抗体を用いた酵素抗体染色を行った。それらの顕微鏡観察を行い、染色度からC5a受容体発現率を決定した。

### 4. 研究成果

乳癌及び舌癌培養細胞を用いたC5a受容体mRNA発現量の解析及び、これまで解析が進んでいなかった甲状腺癌組織におけるC5a受容体発現率の解析を行った。解析した全ての乳癌細胞及び舌癌細胞においてmRNAの発現が確認された。また甲状腺癌の種類により3グループに組織を分別し、それぞれのC5a受容体発現率を解析した。今回の研究成果が、C5a受容体発現を基準とする癌診断試薬の開発や、C5a受容体を標的とする癌治療の基礎的療法を確立する知見となることが期待される。

乳癌では、悪性度等により5つに組織を分別し、それぞれのC5a受容体発現率を解析した。舌癌では陽性率は低かったものの、悪性度や患者年代などで分類できるよう今後も試料数を増やしていく予定である。今回の研究成果が乳癌及び舌癌に対する診断試薬の開発や抗癌剤開発の基礎知見となることが期待される。

子宮体癌は組織をスライスし、スライドガラス上に固定した。C5a受容体を認識する抗体を用いた酵素抗体法により、C5a受容体の染色を行った後に顕微鏡観察を行った。染色の強さからC5a受容体陽性度を1+から3+にクラス分けした。107検体の子宮体癌組織を解析した結果、C5a受容体陽性率は62%であった。その内、子宮体癌の80-90%を占める類

内臓腺癌では 68%の陽性率であった。また類内臓腺癌は陽性度の強い 2+, 3+の判定割合も高かった。類内臓腺癌以外の明細胞癌、粘液性腺癌でも約 70%の陽性率であった。また漿液性腺癌は 31%の陽性率と低かった。子宮体癌の C5a 受容体発現の陽性率は他の臓器癌と比べて高かったが、検体数の少ない明細胞癌、粘液性腺癌に関しては検体数を増やし、さらにデータを追加する必要がある。癌組織の C5a 受容体発現は、特異性や悪性度との関連が高いことなどから、今後腫瘍診断試薬の開発や抗癌剤ターゲットとしての評価が進むことが期待されている。トリプルネガティブ乳がんにおけるアナフィラトキシン受容体発現量や予後との相関が見いだされ、今後の新規乳がん治療や診断への基礎的知見となった。

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 6 件)

Kariu T, Nakao R, Ikeda T, Nakashima K, Potempa J, Imamura T. Inhibition of gingipains and Porphyromonas gingivalis growth and biofilm formation by prenyl flavonoids. J Periodontal Res. 2016 Mar 9. doi: 10.1111/jre.12372.

Imamura T, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Kubo T, Irie A, Kikuchi K, Kariu T, Iwase H. Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis. Breast Cancer. 2015 Oct 22.

Kariu T, Sharma K, Singh P, Smith AA, Backstedt B, Buyuktanir O, Pal U. BB0323 and novel virulence determinant BB0238: Borrelia burgdorferi proteins that interact with and stabilize each other and are critical for infectivity. J Infect Dis. 2015 Feb 1;211(3):462-71. doi: 10.1093/infdis/jiu460. Epub 2014 Aug 19.

Kariu T, Smith A, Yang X, Pal U. A chitin deacetylase-like protein is a predominant constituent of tick peritrophic membrane that influences the persistence of Lyme disease pathogens within the vector. PLoS One. 2013 Oct 17;8(10):e78376. doi: 10.1371/journal.pone.0078376. eCollection 2013.

Kariu T, Yang X, Marks CB, Zhang X, Pal U. Proteolysis of BB0323 results in two polypeptides that impact physiologic

and infectious phenotypes in Borrelia burgdorferi. Mol Microbiol. 2013 May;88(3):510-22. doi: 10.1111/mmi.12202.

半導体マイクロチップ対応次世代シーケンサーを用いたがん関連遺伝子の解析  
狩生 徹, 井上 雄太郎, 水上 洋一  
山口医学  
Vol. 63 (2014) No. 4

[学会発表](計 3 件)  
狩生 徹, Xiuli Yang, Manish Kumar, Xynue Zhang, Utpal Pal  
ライム病菌 Borrelia burgdorferi 感染因子 BB0323 の機能とその成熟機構  
第 87 回日本細菌学会、東京 (2014) 招待ワークショップ

今村隆寿, 指宿(山本)睦子, 山本豊, 岩瀬弘敬:  
Positive-relation of breast cancer cell anaphylatoxin C5a-receptor expression to cancer progression (乳癌アナフィラトキシン C5a 受容体発現の癌進展への正の関連性).  
第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日, 横浜.

今村隆寿, 指宿睦子, 末田愛子, 岩瀬弘敬:  
乳癌アナフィラトキシン C5a 受容体発現と癌進展・患者低生存率との関係.  
第 104 回日本病理学会総会 平成 27 年 4 月 30 日-5 月 2 日, 名古屋.

[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 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

狩生 徹 (KARIU, Toru)

尚絅大学・生活科学部・准教授

研究者番号：10412735

(2) 研究分担者

今村 隆寿 (IMAMURA Takahisa)

熊本大学大学院・生命科学研究部・准教授

研究者番号：20176499

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：