

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861160

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌における上皮間葉系移行の分子機序解明と臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Clinical Application in Triple-Negative Breast Cancer.

研究代表者

山下 奈真(Yamashita, Nami)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60608967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は有効な治療が確立されておらず、その分子機序の解明と新たな治療標的の同定が急務である。乳癌臨床検体においてEMTマーカーであるvimentinはTNBC、basal-like型乳癌の重要な予後因子であった。更に乳癌臨床検体においてE-cadherin/vimentin発現パターンを免疫組織化学染色にて評価し、予後の解析を行ったところ、E-cadherin高発現かつvimentin陽性の症例群が最も予後不良であった。vimentinに関連する因子はTNBCにおいて浸潤転移を制御する創薬のターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：The treatment of patients with TNBC has been challenging due to the absence of these molecular targets and the heterogeneity of the disease. The aim of our study is to elucidate the clinical importance of the expression of E-cadherin and vimentin in breast cancer. The elevated expression of vimentin contributes to the aggressive phenotype and poor prognosis in TNBC and basal-like breast cancer. Vimentin expression might be useful as a biomarker for the prognosis of TNBC. Also, co-expression of E-cadherin and vimentin seems to be associated with the most aggressive phenotype in breast cancer, and positive E-cadherin expression may not always play roles for tumor suppression. Vimentin and related molecule will be a good target to control the invasion and metastasis in TNBC.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 上皮間葉系移行 vimentin E-cadherin

1. 研究開始当初の背景

Triple-negative 乳癌(TNBC)は従来より生物学的悪性度が高いこと、早期再発、予後不良という特徴があり、その治療選択肢も化学療法のみと狭いことから、治療に難渋する例が多い。一方、多くの triple negative 乳癌はホルモン受容体陽性乳癌よりも化学療法への感受性が高い事も知られ、triple negative paradox と表現される。これは triple negative 乳癌が stemness、上皮間葉系移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)と関連が深い basal-like 型、claudin-low 型などを含むヘテロな集団であることを示唆し、中でも化学療法感受性が低い subgroup を把握し、特異的な分子標的の同定、新しい化学療法レジメンの模索が重要な課題である。EMT は癌の浸潤転移において重要な役割を果たすと考えられ、また、乳癌における basal-like phenotype と EMT の関連が指摘されており、転移・浸潤傾向が強い性質を有する。

2. 研究の目的

本研究は TNBC と EMT との関連を明らかにし、新たな治療戦略を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) **乳癌細胞株を用いた EMT マーカー発現解析**  
種々の乳癌細胞株を用いて、各種 EMT マーカーの mRNA および蛋白の発現・局在を qRT-PCR、蛍光免疫組織化学染色にて解析する。

(2) **乳癌組織での EMT マーカー、basal マーカー発現と臨床病理学的因子・予後との関連**  
外科切除検体を持ちて、各種 EMT マーカー、basal マーカーの mRNA および蛋白の発現を qRT-PCR、免疫組織化学染色、Western blot にて解析し、臨床病理学的因子・予後との関連を評価する。

(3) **マイクロアレイを用いた網羅的解析**  
TNBC を予後良好群、不良群にわけ、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、比較する。

4. 研究成果

(1) **乳癌細胞株を用いた EMT マーカー発現解析**  
本研究の妥当性を検討するために、当科にて培養可能な乳癌細胞株より total RNA を抽出し、cDNA を作製して、qRT-PCR にて EMT マーカーである E-cadherin, vimentin の mRNA 発現量を定量的に解析した。Basal-like 型乳癌細胞株 (MDA-MB231, Hst578) では E-cadherin の発現が低く、vimentin の発現が高いことが分かった (図 1)。

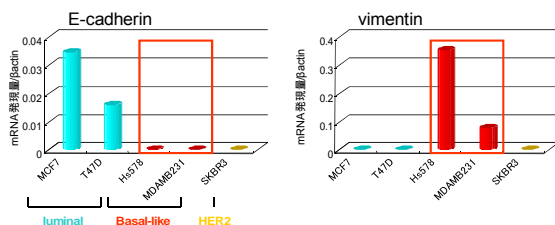


図 1 乳癌細胞株における E-cadherin, vimentin mRNA 発現

前記乳癌細胞株を用いて、E-cadherin・vimentin の蛍光免疫染色を行った。Luminal タイプの細胞株 MCF7 では E-cadherin 高発現、vimentin 陰性であった。一方 basal タイプの細胞株 MDAMB-231 では E-cadherin 発現低下、vimentin 陽性であり、その発現パターンは間葉系細胞の線維芽細胞と類似している(図 2)。

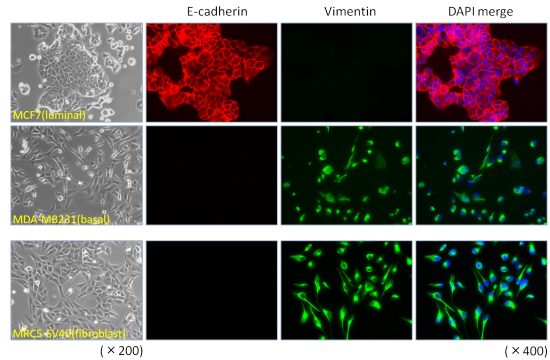


図 2 乳癌細胞株における E-cadherin・vimentin 蛋白局在

(2) **乳癌組織での EMT マーカー、basal マーカー発現と臨床病理学的因子・予後との関連**

1990 年 1 月より 2011 年 3 月までに当科にて手術を施行した術前治療歴のない原性浸潤性乳癌(小葉癌を除外)676 症例を対象とした。

乳癌症例の新鮮凍結標本より、total RNA を抽出し、cDNA を作製し、qRT-PCR にて EMT マーカーである E-cadherin, vimentin の mRNA 発現を定量的に解析した。これらの遺伝子発現が TNBC と非 TNBC で異なるのかどうかを比較解析した。TNBC では E-cadherin の mRNA 発現が有意に低下していた。一方 vimentin の mRNA 発現に有意差はない(図 3)。

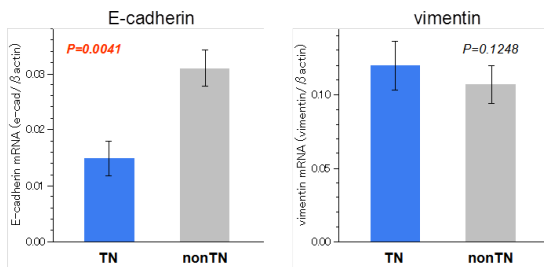


図 3 乳癌組織における E-cadherin, vimentin mRNA 発現

パラフィン切片を用いて、抗 E-cadherin、vimentin モノクローナル抗体にて免疫組織化学染色を行った。次いで basal マーカーの CK5/6、EGFR についても同様の実験を行った。Vimentin は腫瘍細胞の細胞質に染まり、病巣の中に vimentin 陽性の腫瘍細胞を認めた場合に陽性と判定した。TNBC における vimentin 蛋白発現と臨床病理学的因子の関係を評価した所、vimentin 陽性症例は罹患年齢が若く、核グレード・Ki67 が高いことがわかった(表 1)。つまり TNBC において vimentin が陽性のものは aggressive な性質を持つことが示唆された。

表 1 TNBC における vimentin 発現と臨床病理学的因子

characteristics	Vimentin		p-value	
	Negative (n=50)	Positive (n=32)		
Age (yr)	50 ≥	12 (24)	16 (50)	0.016
	>50	38 (76)	16 (50)	
Tumor size	≥2cm	30 (63)	18 (62)	0.97
	<2cm	18 (37)	11 (38)	
LN metastasis	positive	15 (31)	12 (39)	0.50
	negative	33 (69)	19 (61)	
Nuclear grade	1,2	24 (55)	7 (27)	0.023
	3	20 (45)	19 (73)	
Ki67 (%) (mean±SD)	24.4±2.8	50.1±4.0	<0.0001	

次いで TNBC における vimentin 蛋白発現と予後の関連を解析した所、多変量解析を行った所、TNBC において vimentin 発現が見られる症例は有意に予後不良であった(図 4)。

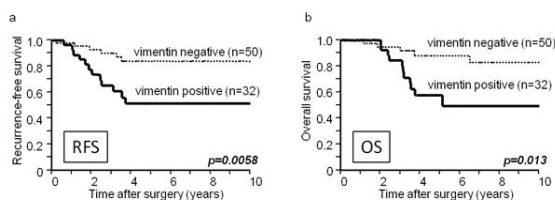


図 4 TNBC における vimentin 蛋白発現と予後(a: RFS, b: OS)

更に多変量解析の結果、TNBC において vimentin 発現は独立した予後不良因子であることを発表した(Yamashita N et al, J Cancer Res Clin Oncol. 2013)。更に上記の乳癌臨床検体において E-cadherin/vimentin 発現パターンを免疫組織化学染色にて評価し、予後の解析を行ったところ、E-cadherin 高発現かつ vimentin 陽性の症例群が最も予後不良であった(図 5)

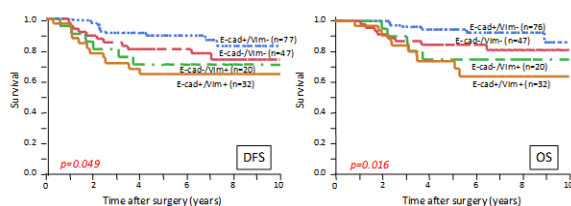


図 5 乳癌臨床検体における E-cadherin/vimentin 発現パターンと予後

### 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 8 件)

1. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, et al: Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139(5):739-46.
2. Tokunaga E, Hisamatsu Y, Yamashita N, et al:

Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer. Cancer Sci. 2014; 105(11):1377-83

3. Tokunaga E, Nakashima Y, Yamashita N, et al.: Overexpression of metadherin/MTDH is associated with an aggressive phenotype and a poor prognosis in invasive breast cancer. Breast Cancer. 2012;21(3):341-9

4. Tanaka K, Tokunaga E, Yamashita N, et al: A luteinizing hormone-releasing hormone agonist plus an aromatase inhibitor as second-line endocrine therapy in premenopausal females with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. Surg Today. 2013; 44(9):1678-84.

5. Tokunaga E, Hisamatsu Y, Yamashita N, et al: Differential impact of the expression of the androgen receptor by age in estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Med. 2013 Dec;2(6):763-73.

6. Hisamatsu Y, Tokunaga E, Yamashita N, et al: Impact of FOXA1 Expression on the Prognosis of Patients with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. Ann Surg Oncol. 2012 Apr 19

7. Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, et al: High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. Breast Cancer 2012 Apr 19

8. Okada S, Tokunaga E, Yamashita N, et al: Loss of heterozygosity at BRCA1 locus is significantly associated with aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. Ann Surg Oncol. 2012 May 19

(学会発表) (計 8 件)

1. 第 20 回日本乳癌学会学術総会 (2012 年 6 月 28 日-30 日、熊本)
  2. 第 113 回日本外科学会定期学術集會 (2013 年 4 月 11 日-13 日、福岡)
  3. 第 49 回九州内分泌外科学会 (2013 年 5 月 10 日-11 日、宜野湾)
  4. San Antonio Breast Cancer Symposium 2011 (December 6-10, 2011, San Antonio)
  5. 2013 ASCO Annual Meeting (May 31-June 4, 2013, Chicago)
  6. 第 22 回日本がん転移学会学術集會・総会 (2013 年 7 月 11 日-12 日、松本)
  7. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日-27 日、横浜)
  8. 14 th St. Gallen International Breast Cancer Conference Primary Therapy of Early Breast Cancer (March 18-21, 2015, Vienna)
- (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:  
出願年月日:  
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

山下奈真(YAMASHITA, Nami)  
九州大学・大学病院・医員  
研究者番号: 60608967

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: