

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Expression of mTOR signaling pathway molecules in triple negative breast cancer
別タイトル	トリプルネガティブ乳癌におけるmTOR シグナル分子の発現
作成者(著者)	伊藤, 慶
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 17.
資料種別	学位論文
内容記述	主査 : 高橋啓 / タイトル : Expression of mTOR signaling pathway molecules in triple negative breast cancer / 著者 : Kei Ito, Hideaki Ogata, Naoko Honma, Kazutoshi Shibuya, Tetuo Mikami / 掲載誌 : Pathobiology / 巻号・発行年等 : 86(5 6):315-321; 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第955号
学位記番号	甲第660号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD76648099">https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD76648099</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

伊藤 慶より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 660 号

学位申請者 : 伊 藤 慶

学位論文 : Expression of mTOR signaling pathway molecules in triple-negative breast cancer

(トリプルネガティブ乳癌における mTOR シグナル分子の発現)

著 者 : Kei Ito, Hideaki Ogata, Naoko Honma, Kazutoshi Shibuya, Tetuo Mikami

公表誌 : Pathobiology DOI: 10.1159/000503311

論文内容の要旨 :

**【背景・目的】**

エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、およびヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER2) の発現を欠くトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) には、現在、効果的なホルモン療法または分子標的療法がない。そこで我々はトリプルネガティブ乳癌の増殖に関わる標的分子を見つけ出すために、増殖制御経路である mTOR シグナル系に着目した。

mTOR は、mTORC1 として知られる複合体を細胞内で形成し、転写因子、翻訳因子を制御し、成長、代謝、生存を調節するセリン/スレオニンキナーゼである。そのシグナル経路の 1 つとして、mTOR の活性化型であるリン酸化 mTOR (p-mTOR) は、重要な翻訳調節因子 p70 リボソーム S6 キナーゼ (S6K) や真核生物開始因子 4E 結合タンパク質 1 (4EBP1) のリン酸化を行う。そしてリン酸化 4EBP1 (p-4EBP1) は、mRNA の翻訳を増加させる。mTOR はまた、腫瘍誘導血管新生に関与する多くの遺伝子を制御する転写因子である低酸素誘導因子 (HIF-1) の正の調節因子としても機能する。HIF-1 は、グルコース輸送体 (GLUT1・GLUT3) の発現を促進することにより解糖代謝を促進する。

この研究では、TNBC と非 TNBC の mTOR シグナル伝達経路分子の発現を比較し、TNBC に特異的に標的とする潜在的な治療および診断マーカーを特定することを目的とした。

**【対象・方法】**

東邦大学医療センター大森病院で 2008 年～2010 年に切除された乳癌、116 例 (TNBC を 35 例含む) に対して、mTOR、p-mTOR、

p-4EBP1、GLUT1、GLUT3、HIF-1 $\alpha$ 、Ki67 の免疫組織化学染色を行い、癌細胞における発現を解析した。がん組織切片は染色強度と面積を評価し、乗算を免疫反応スコアした。その後、p-mTOR の細胞内局在を調べ、症例を核、核周囲、および細胞質発現の3つのカテゴリーに分類した。Ki67 発現は500以上の癌細胞で評価し、Ki67 陽性細胞の割合 (Ki67 陽性細胞の数/総癌細胞の数) を百分率で表した。データは、統計ソフトRを使用して、Spearman's rank correlation test、Mann-Whitney U test、chi-squared test で統計解析した。また、予後はKaplan-Meier 法と log rank 検定によって分析した。P 値<0.05 を統計的有意とした。

#### 【結果】

p-mTOR の発現は、非 TNBC と比較して TNBC で有意に低かったが、mTOR 発現は腫瘍タイプ間で有意差はなかった。p-mTOR とは対照的に、p-4EBP1、GLUT1、および GLUT3 の発現は、非 TNBC よりも TNBC で有意に高かった。また、発現の正の弱い相関が、GLUT1 と p-4EBP1 ( $\rho = 0.246$ ,  $p = 0.0079$ )、および GLUT3 と p-4EBP1 ( $\rho = 0.267$ ,  $p = 0.0037$ ) の間に見られた。さらに、GLUT1 の発現は、HIF-1 $\alpha$  ( $\rho = 0.336$ ,  $p = 0.0002$ ) および GLUT3 ( $\rho = 0.461$ ,  $p < 0.0001$ ) の発現の正の相関があった。p-mTOR の細胞内局在において、核への局在は非 TNBC より TNBC で多く見られた。また、核 p-mTOR 発現例では GLUT の発現が有意に高かった。Ki67 陽性細胞の割合は、TNBC の方が非 TNBC よりも有意に高かった。また、Ki67 陽性細胞の割合は GLUT1 および GLUT3 の免疫反応スコアと相関し、さらに、核 p-mTOR 発現例が、核周囲または細胞質発現例より Ki67 陽性細胞割合が高かった。予後とこれら免疫組織化学的マーカーとの有意な関係はみられなかった。

#### 【考察】

本研究は、mTOR シグナル伝達経路タンパクの発現解析を行った。p-mTOR と GLUT の発現の関係は、シグナル経路から考えると一見矛盾すると思われた。mTOR シグナル伝達経路では、p-mTOR の発現が増加すると p-4EBP1 の発現が増加し、HIF-1 $\alpha$  を介して GLUT 発現が増加する。一方、私たちのデータでは、p-mTOR は TNBC と比較して非 TNBC で増加したが、p-4EBP1 の発現は非 TNBC よりも TNBC で高かった。そこで、TNBC と非 TNBC の p-mTOR の局在をさらに比較することにした。p-mTOR は定常状態の条件下で主に細胞質に局在するが、TNBC で核内 p-mTOR 発現が非 TNBC より頻繁に観察された。さらに、核内 p-mTOR の発現は GLUT1 および GLUT3 と相関していた。結果として、p-mTOR が核に移行することが TNBC において重要な役割を持つ可能性が示唆された。mTOR 阻害剤による乳がん治療の試みが報告されているが、現時点では効果的な治療戦略と認定されていない。しかし、これらの mTOR 阻害剤の臨床試験では、mTOR の局在の検討はなされていない。今回の結果は、p-mTOR の発現と局在を調べることにより、mTOR 阻害剤の効果の高い患者を特定するのに役立つ可能性を示唆している。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 660 号	氏 名	伊 藤 慶
学位審査担当者	主 査	高 橋 啓
	副 査	伊 豫 田 明
	副 査	榊 原 雅 裕
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	中 野 裕 康

学位論文の審査結果の要旨：

エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 のすべての発現を欠くトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は、現在、効果的なホルモン療法、分子標的療法がなく化学療法を主体とした治療がなされている。一方、近年、腫瘍細胞の代謝、増殖、血管新生などに関与する mTOR シグナル伝達経路阻害剤の開発が進められている。

本研究は、乳癌の mTOR シグナル伝達経路に注目し、活性型 mTOR であるリン酸化 mTOR (p-mTOR)、その下流に位置する p70 リボソーム S6 キナーゼ (S6K)、リン酸化真核生物開始因子 4E 結合タンパク質 1 (p-4EBP1)、低酸素誘導因子 (HIF-1)、そして、グルコース輸送体 (GLUT1・GLUT3) の発現と局在を免疫組織学的に検討し、TNBC と non-TNBC とを比較検討することで TNBC に特異的な治療および診断マーカーを検出することを目的として行われた。

2008 年から 2010 年までの間に東邦大学医療センター大森病院において切除された浸潤性乳癌 116 例 (TNBC35 例、non-TNBC85 例) に対して、mTOR、p-mTOR、p-4EBP1、GLUT1、GLUT3、HIF-1 $\alpha$ 、Ki67 の免疫組織化学染色を行い、癌細胞における発現範囲、強度と局在を解析した。その結果、p-mTOR の発現スコアは non-TNBC に比して TNBC で有意に低かったのに対し、p-4EBP1、GLUT1、および GLUT3 の発現スコアは non-TNBC よりも TNBC で有意に高かった。GLUT1 と p-4EBP1、GLUT3 と p-4EBP1、GLUT1 と HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1 と GLUT3 との間で発現スコアは正の相関を示した。次いで p-mTOR の細胞内局在を検討したところ、p-mTOR の核内発現の頻度は non-TNBC に比して TNBC で有意に高く、p-mTOR の核内発現例では細胞質、核周囲発現例よりも GLUT の発現スコアが有意に高かった。一方、Ki67 陽性率は TNBC が non-TNBC よりも有意に高く、かつ、Ki67 発現率は GLUT1 および GLUT3 の発現スコアと相関した。さらに、核内 p-mTOR 発現例では、他の細胞質、核周囲発現例よりも Ki67 陽性率は有意に高かった。

mTOR シグナル伝達経路では、p-mTOR の発現が増加すると p-4EBP1 発現が増加し、HIF-1 $\alpha$  を介して GLUT 発現が増加する。一方、本研究では p-mTOR 発現は non-TNBC で増加していたのに対して、その下流の p-4EBP1 発現は TNBC で高いという一見相反する結果を示した。このため TNBC と non-TNBC の p-mTOR の局在を比較したところ、p-mTOR の局在は TNBC と non-TNBC とで差があり、核内 p-mTOR 発現は TNBC で高頻度にみられた。さらに、この核内 p-mTOR の発現は GLUT1 および GLUT3 と相関し、TNBC では p-mTOR が核内に移行することがシグナル伝達経路の活性化に重要な意味を持つ可能性が示された。

2020 年 1 月 27 日、中野、内藤、伊豫田、高橋の 4 名の出席 (榊原は書面審査) のもと学位審査会が開催された。研究内容の発表後、活発な質疑応答が行われた。審査委員からは、① GLUT の中で GLUT 1, 3 に着目した理由、② GLUT の発現制御に関係する転写因子はなにか、③ mTOR の核内移行メカニズムとして想定されるものはなにか、④ p-mTOR の細胞内発現様式に重複はないのか、⑤ 本研究結果は TNBC の分子標的薬の治療戦略を考えるうえでどのような意義をもつのか、など様々な質問がなされた。これらに対して申請者は適切に回答した。本研究は、TNBC では核内に移行した p-mTOR が mTOR シグナル伝達経路を活性化させ腫瘍細胞の活性、増殖などに関与している可能性を示した。これまで p-mTOR の局在について検討された報告はなく、mTOR 阻害剤の開発、患者適応を検討する際の一助となりうる基礎的研究であり、学位授与に値すると審査委員全員の意見が一致し審査会を終了した。