

(14)2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会
[その他] Shunji Nagasaki, Yasuhiro Miki, Jun-ichi Akahira, Takashi Suzuki, and Hiroshi Handa, Hironobu Sasano.
The possible role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in Human breast cancer .
66th Annual Meeting of Japanese Cancer Association .

(15)2007/11/09~2007/11/10 海外・国際 学会
[その他] Hironobu Sasano.
Development of Intracrinology and Its Manipulation.
Organisation for Oncology and Translational Research 4th Annual Conference
Creating New Strategies for Cancer Therapy- Basic Science to Clinical Science.

(16)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 宇都宮裕貴、伊藤潔、小林里香、高橋尚美、三木康宏、鈴木貴、本間誠次郎、林慎一 and 笹野公伸。
子宮内膜癌細胞におけるエストロゲン合成・代謝酵素の発現～ 癌細胞のエストロゲン合成に対する間質細胞の影響～
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会。

(17)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 佐藤龍一郎、鈴木 貴、三木康宏、三浦康、片寄 友、海野倫明、笹野公伸。
大腸癌におけるSteroid sulfataseとEstrogen sulfotransferaseの発現意義。
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会 .

(18)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 三木康宏、長崎修治、小野克彦、赤平純一、鈴木 貴、笹野公伸。
骨芽細胞に対するSteroid and Xenobiotic Receptorを介したBisphenol Aの作用。
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会。

(19)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 中村恵美、佐藤文俊、森本玲、鈴木貴、笹野公伸、林富。
副腎皮質腫瘍組織における標的治療因子の免疫組織化学的検索。
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会。

(20)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 鈴木貴、三木康宏、赤平純一、笹野公伸。
ヒト組織中ステロイドホルモン測定のための臨床的病理学的有用性。
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会。

(21)2007/11/24~2007/11/24 日本国内 学会
[その他] 鈴木史彦、赤平純一、伊藤潔、鈴木貴、林慎一、笹野公伸、八重樫伸生。
ヒト上皮性卵巣癌におけるEstrogen receptor beta isoformsの発現についての検討。
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会。

(22)2007/11/29~2007/12/02 海外・国際 学会
[その他] Hironobu Sasano.
Pathological Analysis of Prognostic Markers in Gastroenteropancreatic tumor .
AFES2007 14th Congress of the ASEAN Federation of Endocrine Societies.

(23)2007/11/30~2007/12/01 日本国内 学会
[その他] 笹野公伸。
細胞診断学におけるパーチャルマイクロスコープの活用。
第46回日本臨床細胞学会秋期大会。

(24)2007/11/30~2007/12/01 日本国内 学会
[その他] 三浦弘守、渡辺みか、安達友津、田村聖月、石川 恵、安田奈津子、笹野公伸、森谷卓。
細胞診で悪性中皮腫を推定する-細胞形態からみた反応性中皮 および肺腺癌との鑑別-。
第46回日本臨床細胞学会秋期大会 .

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

<参考文献>

(1)Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Ishizawa K, Yamada M, He M, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sasano H, Sasaki H, Suzuki S. Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Non-Small Cell Lung Carcinoma. American journal of respiratory and critical care medicine. 175:184-189. 2007

(2)Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira JI, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi SI, Sasano H. 5alpha-reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. International journal of cancer. Journal international du cancer. 120:285-291. 2007

(3)Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like

cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane.
Bone 40. 876-87. 2007

(4) Sakuma M, Akahira J, Ito K, Niikura H, Moriya T, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N.
Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer.
Cancer science:380-386. 2007

(5) Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K.
Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney.
Peptides. 28:1095-103, 2007

(6) Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, Inoue S, Sasano H
Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.
Cancer Sci 98:644-51, 2007

(7) Nagase S, Mikami Y, Moriya T, Niikura H, Yoshinaga K, Takano T, Ito K, Akahira J, Sasano H, Yaegashi N.
Vaginal tumors with histologic and immunocytochemical feature of gastrointestinal stromal tumor: two cases and review of the literature.
Int J Gynecol Cancer : 17 : 928-933, 2007

(8) Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evans DB, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H.
Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells.
Cancer Res. 67:3945-3954, 2007

(9) Usami S, Moriya T, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N.
Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy.
Jpn J Clin Oncol. 37:250-255, 2007

(10) Tokunaga H, Akahira J, Suzuki T, Moriya T, Sasano H, Ito K, Yaegashi N.
Ovarian epithelial carcinoma with estrogen-producing stroma.
Pathol Int 57: 285-290, 2007

(11) Miki Y, Suzuki T, Sasano H.
Controversies of aromatase localization in human breast cancer-Stromal Versus parenchymal cells.
J Steroid Biochem Mol Biol. 106:97-101, 2007

(12) Wick MR, Foucar E, Allen PW, Alves VA, Bjornsson J, Bosman F, Churg AW, Drut R, Foster CS, Hauptmann S, Hytiroglou P, Kuo TT, Matsubara O, Nappi O, Pervez S, Rosai J, Sasano H, Vielh P, Zelger B.
Medicolegal liability in pathology: an international perspective.
Semin Diagn Pathol. 24:65-76, 2007

(13) Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H.
Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor.
Endocr Relat Cancer. 14:279-292, 2007

(14) Akahira JI, Tokunaga H, Toyoshima M, Takano T, Nagase S, Yoshinaga K, Tase T, Wada Y, Ito K, Niikura H, Yamada H, Sato A, Sasano H, Yaegashi N.
Prognoses and Prognostic Factors of Carcinosarcoma, Endometrial Stromal Sarcoma and Uterine Leiomyosarcoma: A Comparison with Uterine Endometrial Adenocarcinoma.
Oncology. 71:333-340, 2007

(15) Ono K, Suzuki T, Miki Y, Taniyama Y, Nakamura Y, Noda Y, Watanabe M, Sasano H.
Somatostatin receptor subtypes in human non-functioning neuroendocrine Tumors and effects of somatostatin analogue SOM230 on cell proliferation in cell Line NCI-H727.
Anticancer Res. 27: 2231-2239, 2007

(16) Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, Ohuchi N, Sasano H, Abe T, Unno M.
Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor

for human breast carcinoma.
Cancer Science 98: 1570-1576, 2007

(17) Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H.
Biological Roles of Estrogen and Progesterone
in Human Endometrial Carcinoma -
New Developments in Potential Endocrine
Therapy for Endometrial Cancer -
Endocr J. : 54:667-679, 2007

(18) Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira J,
Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H.
In situ production of sex steroids in human
breast carcinoma.
Med Mol Morphol. 40:121-127. 2007

(19) Miki Y, Suzuki T, Sasano H.
Aromatase inhibitor and bone.
Biomed Pharmacother. 61:540-542. 2007

(20) Sasano H, Suzuki T, Moriya T.
Analysis of surrogate markers for target-
specific therapy in breast
Carcinomas using archival materials.
Biomed Pharmacother. 61:543-547. 2007

(21) Sasano H, Suzuki T, Miki Y, Moriya T.
Intracrinology of estrogens and androgens in
breast carcinoma.
J Steroid Biochem Mol Biol. 108:181-185, 2007
in press

(22) Yang XR, Pfeiffer RM, Garcia-Closas M,
Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA,
Peplonska B, Hewitt SM, Cartun RW, Mandich D,
Sasano H, Evans DB, Sutter
TR, Sherman ME.
Hormonal markers in breast cancer:
coexpression, relationship with
Pathologic characteristics, and risk factor
associations in a population-based study.
Cancer Res. 67:10608-10617. 2007

(23) Ito M, Moriya T, Ishida T, Usami S,
Kasajima A, Sasano H, Ohuchi N.
Significance of pathological evaluation for
lymphatic vessel invasion in
invasive breast cancer.
Breast Cancer. 14:381-387. 2007

ホルモン療法の個別化のためのバイオマーカー探索

分担研究者 林 慎一

東北大学医学部保健学科分子検査学分野 教授

研究要旨

原発性乳癌のおよそ3分の2がエストロゲン受容体（ER）を発現しているER陽性乳癌である。乳癌のホルモン療法は有効性も高く、有害事象の比較的少ない、QOLの良い治療としてこれらのER陽性乳癌を対象に広範に施行されている。しかしながら不応例も少なからず存在する。従って、乳癌の集学的治療アルゴリズム構築のための症例の個別化のためには、ホルモン療法奏効性予測のための、より高精度な新たなバイオマーカーの導入が必要である。そこで、これまで我々が行ってきたERに関する基礎研究、特にエストロゲン応答性マイクロアレイを用いた研究成果を活用して、臨床的に有用なバイオマーカーの同定とその検査法の開発を目指す。

A. 研究目的

他の癌には見られない乳癌の治療の特徴的な点は、ホルモン療法（内分泌療法）が薬物治療の中核をなしている点である。そこで乳癌の治療アルゴリズムの構築を考えていくためには、このホルモン療法の適応を的確に判断するポイント及びその際の指標となるバイオマーカーや高精度診断法の導入が必須であろう。

ホルモン療法の標的であるエストロゲンとその受容体は乳癌の発生と増殖、その病態と密接に関係しており、このようなホルモン療法はエストロゲン受容体ないしはそのシグナル経路を遮断する分子

標的治療の典型である。現在ホルモン療法の適応は主にホルモン受容体（ER、PgR）の発現の有無によって判断されているが、これらの基準が万全でないことは良く知られている。また、近年、乳癌に対するホルモン療法は従来広く用いられてきた抗エストロゲン剤のみならずLH-RHアゴニストや第3世代のアロマターゼ阻害剤の登場によって急速に発展進化し、同時に複雑化している。しかし、これらの適応を正確に決定し、使い分ける明確な分子指標はまだない。

そこで、我々は、これまで長年進めてきたエストロゲン受容体に

関する基礎研究の成果に基づき、特にこれまで開発してきたエストロゲン応答性マイクロアレイチップを発展的に応用して治療選択の指標となる新たなバイオマーカーを探索、同定し、その有用性を検証すること、さらに臨床で使用可能で、アルゴリズムの中に組み込み可能な検査法として開発していくことを目指す。

B. 研究方法

- 1) これまで網羅的マイクロアレイ解析によって抽出・同定した乳癌細胞のエストロゲン応答遺伝子約 200 個を搭載したガラススライド型マイクロアレイチップを作成し、それを用いて様々な乳癌培養細胞や乳癌手術検体を用いた解析を行い、ホルモン療法の反応性予測や乳癌の予後予測に有用な遺伝子を絞り込んできた。その中から代表例として HDAC6、IGFBP4、EGR3 などの遺伝子を取り上げ、免疫染色法や RT-PCR 法解析によって乳癌手術検体の解析を行い、臨床病理学的因子との相関を検討し、これらが乳癌の予後、特に Tamoxifen 治療群の予後と相関することを明らかにした。
- 2) そこで、これらの候補遺伝子 36 個のプローブを搭載した 3 次元型マイクロアレイ解析用チップを作成し、乳癌手術検体を対象にこれら候補遺伝子の発現解析を行い、臨床病理学的情報と比較検討し、そ

の搭載遺伝子セットの有用性を確認する。

- 3) その有用性が確認できればより臨床応用の点で実用的な multiplex RT-PCR 法を候補遺伝子プロファイリングに採用する方向で検討する。
- 4) この過程で ER の発現に勝るバイオマーカー、すなわちホルモン療法の反応性に合致する発現を示すサルゲートマーカーが見出せれば、従来の免疫染色法による解析を Tissue マイクロアレイを用いて進める。
- 5) 今後、これらの研究と平行して、ERE レポーターカセットを組み込んだアデノウイルスを用いて、原発腫瘍の ER の活性をアッセイできる系を開発し、この系を用いたホルモン療法の奏効性予測の可能性も検討する。

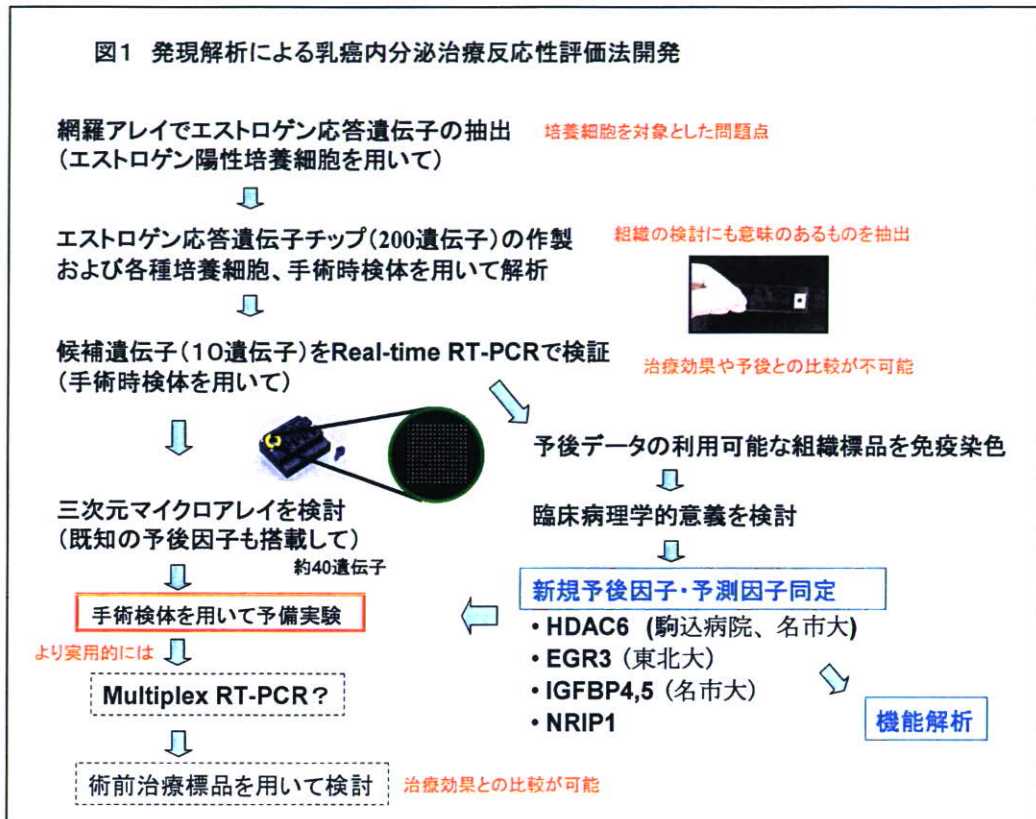
(倫理面への配慮) 本研究に供する研究材料は手術及び生検によって得られる腫瘍組織であるが、本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。

C. 研究結果

前述のように我々は以前、約 1 万遺伝子の網羅的マイクロアレイ解析に乳癌細胞中のエストロゲン応答遺伝子を同定し、それらのエストロゲン応答遺伝子約 200 個を搭載したガラススライド型マイク

ロアレイチップを作成した。そしてこれを用いて様々な乳癌培養細胞や乳癌手術検体を用いた解析を行い、ホルモン療法の反応性予測や乳癌の予後予測に有用な遺伝子を絞り込んできた。それらの中から代表例としてHDAC6、IGFBP4、

EGR3などの遺伝子を取り上げ、免疫染色法やRT-PCR法解析によって乳癌手術検体の解析を行い、臨床病理学的因子との相関を検討し、これらが乳癌の予後、特にTamoxifen治療群の予後と相関することを明らかにした。



発現解析を臨床に導入するには、精度と再現性の高度化、解析の迅速化と自動化による操作の簡易化が欠かせない。そこで、このような要求を満たす装置の候補としてオリンパス社が開発中であった3次元型マイクロアレイ解析装置を用いた。我々の研究から絞り込まれた候補遺伝子36個を搭載した3Dマイクロアレイチップ作成し、それを用いて原発乳癌患者27例の手術検体を解析した。その結果、クラスター解析から患者群が高発現群Aグループと低発現群Bグル

ープの2群に明瞭に分けられることが明らかとなった。その2群はERの発現の有無とは有意な正の相関を示したが、完全には一致しなかった。また、Stageと有意な相関がみられ、Her2との逆相関も観察された。また、これらの患者の中から3例の再発症例が観察されたが、そのうち1例はER陽性患者で、2例がER陰性患者であったが、アレイ解析による分類では3例とも低発現群に属していた。

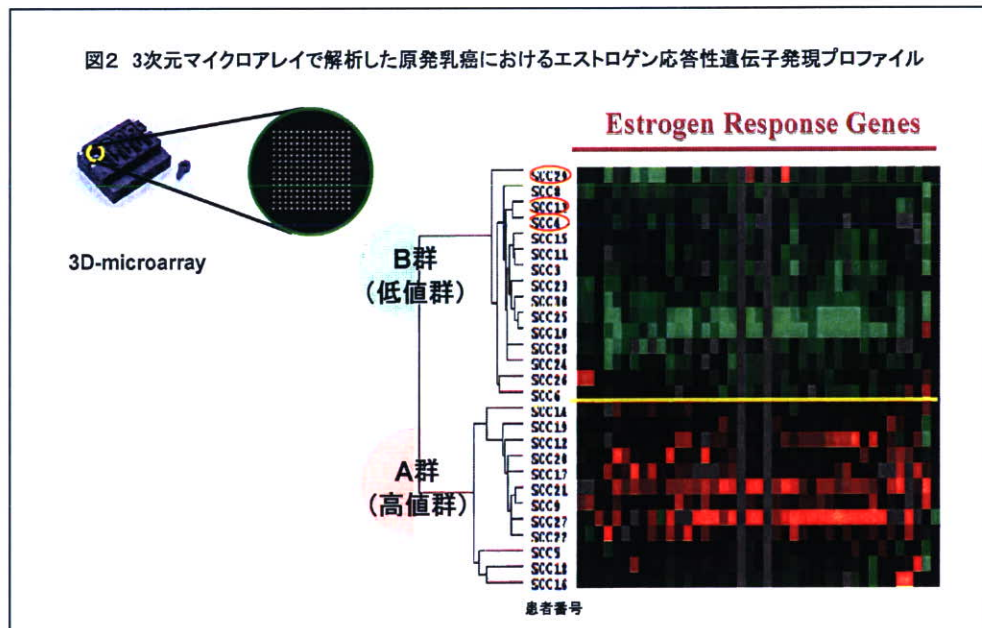
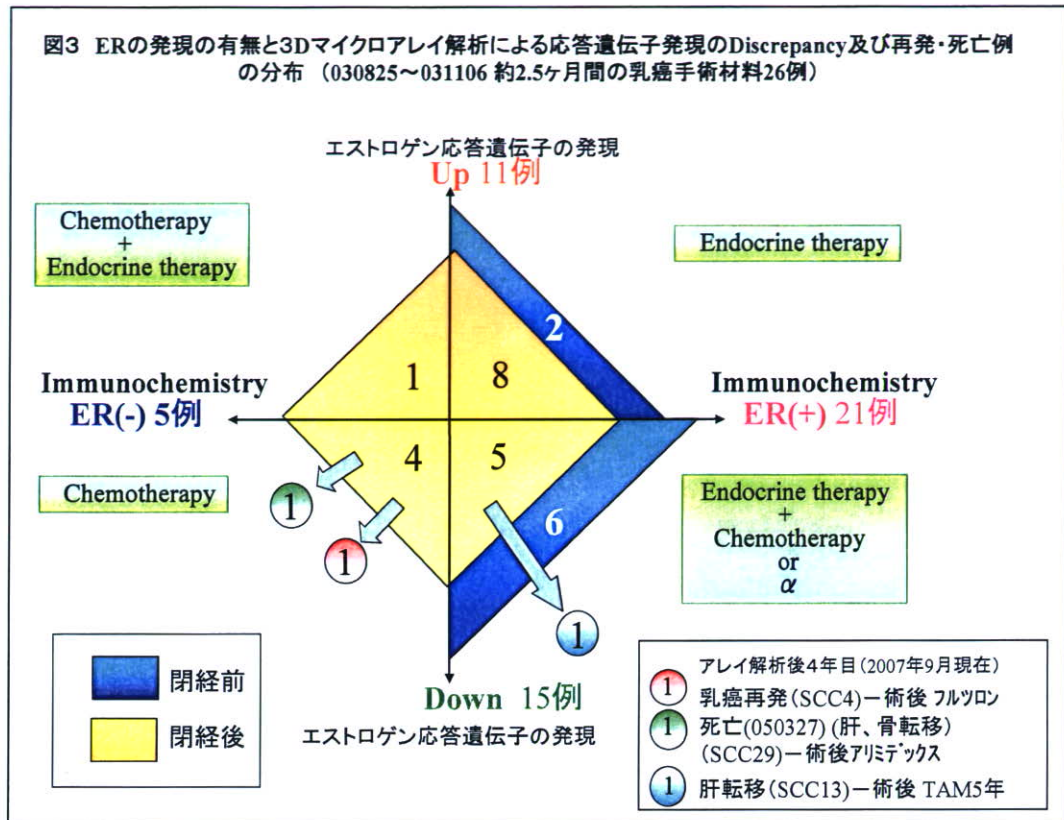


図3 ERの発現の有無と3Dマイクロアレイ解析による応答遺伝子発現のDiscrepancy及び再発・死亡例の分布 (030825~031106 約2.5ヶ月間の乳癌手術材料26例)



一方、3次元マイクロアレイは、精度、再現性、迅速性、操作性に優れているが、高価で特殊な装置を必要とし、また、サンプルの前処理も煩雑であり、このまま臨床へ導入するには多くの困難があることも明らかとなった。そこで、より近い臨床応用のためには、候補遺伝子の数をより絞り込んで、RT-PCR ベースの解析手法に乗せていった方がより現実的と思われた。今後、すでに予後との関連を証明済みの候補遺伝子を中心に multiplex-PCR 解析キット等の開発を目指したい。

D. 考察

乳癌の治療の中でホルモン療法

の占める位置きわめて重要であり、乳癌の集学的治療アルゴリズムを構築するためには、このホルモン療法の適応をどのように規定していくかは重要な柱の一つと考えられる。そのためにはホルモン療法に対する個々の患者の反応性を正確に予測し、評価する指標、バイオマーカーの存在は必須である。

我々はこれまで、癌の発生進展におけるエストロゲンシグナルの役割、その作用の分子機序を解明することを目的として基礎研究を行ってきた。近年、そのような研究の推進の一助とするため、エストロゲン応答遺伝子を搭載した、エストロゲン応答マイクロアレイチップを開発し、様々な研究を行

ってきた。エストロゲン応答遺伝子群はエストロゲンに対する反応性を知るのに効果的な指標であり、その遺伝子群の発現プロファイルからホルモン療法に対する反応性を知ることが出来るかもしれない。その様な考えに基づき、乳癌検体を対象とした解析を進め、その様な候補遺伝子を抽出・同定してきた。HDAC6、IGFBP4、EGR3などいくつかの遺伝子については実際に乳癌の予後と相関することが示された。そこでさらに、ヒト組織標品を用いた解析とチップの改良を進め、高精度なホルモン療法奏効性予測診断を可能にするDNAチップの開発を目指した。今回用いたオリンパス社の新型のマイクロアレイ解析装置を用いる3次元型アレイチップの導入は、高感度化と同時に、操作の簡便化、自動化を図り、臨床に実際に導入可能なシステムとなるかもしれないと考えた。試験的に本装置を用いて約27症例の原発乳癌を解析したところ、明瞭に2群に層別化でき、搭載した遺伝子プローブの有用性が示された。また、現在臨床的に用いられているERの発現の有無との関連を検討したところ、相関は示したが、完全な一致ではなかった。さらに3名の再発患者の全員がアレイ解析の低発現グループに属していた。ちなみに3名のうち2名がER陰性患者、1名が陽性患者であった。人数も少なく、

また、ホルモン療法の奏効性を直接見ているわけではないが、興味深い結果と思われる。しかしながら、技術的問題点、特にサンプルの前処理の煩雑さや検体RNAの質の問題等も明らかとなり、解析装置が高価である事も考えると、このまま臨床に応用するのは困難であると思われた。

今後は、このような検討を重ね、最小限の遺伝子セットの候補遺伝子を絞り込み、現状ではマイクロアレイよりも実用化しやすいRT-PCR法を基本とした検査法による診断キット化を目指したい。また、このようなRNAレベルの発現解析は、実際に臨床に導入するにはまだまだ前処理などの問題点も多く、短期での実用化を目指すなら他の手法、たとえばすでに確立し、臨床でも行われている免疫染色法などの既存のシステムに乗せていく方が現実的かもしれない。これについても今後Tissueアレイ等を用いて検討していきたい。

また、第3世代のアロマターゼ阻害剤のような癌間質も標的にしたような治療法は全く新たな診断手法が有効かもしれない。この点についても今後検討していきたい。

E. 結論

原発性乳癌の集学的治療アルゴリズムの構築のためのバイオマーカー、特にホルモン療法奏効性予測に有用かもしれないバイオマーカーの候

補を複数同定した。それらを搭載した3次元型DNAマイクロアレイを用いた解析からこれらの候補遺伝子群の有用性が認められた。より実用的なホルモン療法応答性予測診断法としてどのような解析手法にしていくかが今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H., Yaegashi, N. : Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. Reproductive Oncology (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
2. Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. 5 α -reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. Int. J. Cancer, 120, 285-291, 2007.
3. Inoue, A., Seino, Y., Terasaka, S., Hayashi, S., Yamori, T., Tanji, M. and Kiyama, R. Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines. Toxicology In Vitro, 21, 741-752, 2007.
4. Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K., and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor α gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 105, 106-114, 2007.
5. Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S., Ohuchi, N. and Sasano, H. Aromatase localization in human breast cancer tissues – possible interaction between intratumoral stromal and parenchymal cells. Cancer Res., 67(8), April, 3945-3954, 2007.
6. Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya T., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. Early growth responsive gene 3 (EGR3) in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. Endocrine-Related Cancer, 14, 279-292, 2007.
7. Mita, K., Zhang, Z., Ando, Y., Toyama, T., Hamaguchi, M., Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwase, H. and Yamashita, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5

- expression in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 37(8), 575-582, 2007.
8. Tanabe, K., Utsunomiya, H., Tamura, M., Niikura, H., Takano, T., Yoshinaga, K., Nagase, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Hayashi, S. and Yaegashi, N. The expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, in press, 2008.
 9. Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, in press, 2008.
 10. Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S., Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.* in press, 2008.
 11. 松本光代、畠山篤、坂本宙子、山口ゆり、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3次元マイクロアレイ－乳癌の診断と治療効果予測への臨床応用を目指して。東北大学医学部保健学科紀要, 16(1): 19-25, 2007.
 12. 林 慎一、山口ゆり：ホルモン療法反応性と乳癌微小環境。乳癌の臨床, 特集・乳癌ホルモン療法の進歩-基礎と臨床, Vol. 22, No1, 6-12, 2007.
 13. 林 慎一：内分泌療法感受性予測因子。日本臨床, 増刊・乳癌－基礎・臨床研究のアップデート, Vol. 65, 148-153, 2007.
 14. 林 慎一：ホルモン療法奏効メカニズムと治療効果。医学のあゆみ, Vol. 221, No.2, 140-143, 2007.
 15. 林 慎一：乳癌とエストロゲン受容体、コレギュレーター。最新医学, 特集・内分泌代謝疾患と核内受容体, Vol. 62, No.10, 47-54, 2007.
2. 学会・研究会発表
1. 林 慎一：核内レセプターを標的としたホルモン依存性癌の診断と治療の展開。シンポジウム「核内レセプターの機能と治療への応用」第66回日本癌学会学術総会（横浜）2007.
 2. 林 慎一：ホルモン療法適応群の個別化の基礎研究。ワークショップ「癌治療の個別化と分子マーカー（乳腺）」第45回日本癌治療学会総会（京都）2007.
 3. 林 慎一：アロマトキシン阻害剤耐性乳がんの治療戦略－基礎からのアプローチ、エストロゲンシグナル経路の変化。ランチョンセミナー38 第45回日本癌治療学会総会（京都）2007.
 4. 林 慎一：エストロゲンと乳癌。特別講演 II 第4回北関東乳腺臨床腫瘍研究会（大宮）2007.

5. 林 慎一：乳癌内分泌療法におけるトランスレーショナルリサーチーエストロゲン依存性乳癌の個性と治療選択ー。10th Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting (神戸) 2007.
6. 林 慎一：AI 再発に対する治療選択の基礎ーエストロゲンシグナル経路の変化ー。Kyushu Breast Cancer Workshop (福岡) 2007.
7. 林 慎一、山口ゆり：内分泌療法の適応選択の基礎研究。シンポジウム「本邦における内分泌療法のエビデンスと基礎研究」第 15 回日本乳癌学会学術総会 (横浜) 2007.
8. 林 慎一：転写因子、RNA 発現から見た核異型。シンポジウム「がんの細胞異型に迫るー核異型に対する科学的アプローチ」第 46 回日本臨床細胞学会 (仙台) 2007.
9. Akahira, J., Suzuki, H., Miura, I., Suzuki, T., Moriya, T. Miki, Y., Ito, K., Hayashi, S., Yaegashi, N., Sasano, H. The expression of RIZ1 in patients with epithelial ovarian cancer: Its correlation with aberrant DNA methylation. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2007.
10. Mori, K., Yamaguchi, Y., Sawada, N., Kondoh, K., Hayashi, S. In vivo and in vitro efficacy of capecitabine(X) + tamoxifen(TAM) in breast cancer. Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2007.
11. Azuma, K., Horie, K., Sakai, R., Hayashi, S., Ouchi, Y., Inoue, S. ER α -HDAC6 complex at plasma membrane mediates rapid tubulin deacetylation as a novel nongenomic estrogen action. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting (Tronto), 2007.
12. 赤平純一、鈴木 貴、鈴木史彦、三浦伊久美、三木康宏、長崎修治、伊藤 潔、森谷卓也、林 慎一、八重樫伸生、笹野公伸：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor-related receptor (ERR)b の発現と臨床病理学的因子との関連について。第 80 回日本内分泌学会学術総会、2007.
13. 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：前立腺癌における Estrogen receptor β 及び β cx の機能解析。第 80 回日本内分泌学会学術総会、2007.
14. 鈴木 貴、林 慎一：乳癌における EGR3 (early growth response 3) の発現意義。第 6 回ステロイドホルモンを考える会 (東京) 2007.
15. 松本光代、伊藤 潔、新倉 仁、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：

- 子宮体癌-間質細胞におけるエストロゲンを介した相互作用の解析. 第 59 回産婦人科学会総会、2007.
16. 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：ヒト前立腺癌における Estrogen Receptor β cx の機能解析. 第 8 回ホルモンと癌研究会 (品川) 2007.
 17. 松本光代、山口ゆり、畠山 篤、清野祐子、鈴木 貴、伊藤 潔、新倉 仁、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：子宮体癌におけるエストロゲンシグナルを介した癌微小環境の解析. 第 8 回ホルモンと癌研究会 (品川) 2007.
 18. Kajiro, M., Hirota, R., Hujimura, A., Oie, S., Yamaguchi, Y., Kawanowa, K., Hayashi, S., Kurosumi, M., Kimura, K., Yanagisawa, J. : The Ubiquitinligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
 19. Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N., Hayashi, S. : Tumor-stromal Interaction through Estrogen-Signaling Pathway Analyzed by GFP Assay in Human Endometrial Cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
 20. Tanabe, K., Matsumoto, M., Akahira, J., Suzuki, T., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sasano, H., Hayashi S., Yaegashi, N. : Expression of midkine in human endometrium and its disorder. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
 21. Yamaguchi, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Seino, Y., Hayashi, S. : Microenvironmental regulation of estrogen-dependent and estrogen-independent growth in human breast cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.
 22. 松本光代、山口ゆり、清野祐子、畠山 篤、武井寛幸、新倉 仁、伊藤 潔、鈴木 貴、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：ヒト子宮体癌におけるエストロゲン刺激を介した癌-間質の相互作用の解析. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (仙台) 2007.
 23. 山口ゆり、下岡華子、清野祐子、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一：乳癌における間質の特性. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (仙台) 2007.
 24. 鈴木史彦、赤平純一、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現についての検討. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (仙台) 2007.

25. 宇都宮裕貴、伊藤 潔、小林里香、高橋尚美、三木康宏、鈴木貴、本間誠次郎、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌におけるエストロゲン合成・代謝酵素の発現～癌細胞のエストロゲン合成に対する間質細胞の影響。第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会（仙台）2007.
26. 松本光代、山口ゆり、坂本宙子、武井寛幸、新倉 仁、伊藤 潔、鈴木 貴、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：エストロゲン依存性癌の新規診断法開発。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会（横浜）2007.
27. 神代理史、相馬佳絵、中島由佳、園尾 楽、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純：ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の悪性を抑制する。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会（横浜）2007.
28. 神代理史、相馬佳絵、中島由佳、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純：ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の悪性を抑制する。第8回関東ホルモンと癌研究会（東京）2008.

1) 出願番号：特願 2005-160621 出願日：2005.05.31 名称：遺伝子導入細胞

2) 出願番号：特願 2005-160685 出願日：2005.05.31 名称：細胞分析方法

3) Application No./Patent No. : 06756855.0-1222 PCT/JP2006310935
Date : 08.02.08
Title : A transgenic cell and method for cell analysis

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願中3件

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)

分担研究報告書

リン酸化プロテオミクスによる乳癌の細胞内シグナル伝達ネットワークに関する研究

分担研究者 石濱 泰

慶應義塾大学先端生命科学研究所 特別研究准教授

研究要旨: ナノ LC-MS と安定同位体標識を組み合わせた定量的ショットガンプロテオミクスの手法に基づく細胞内シグナル伝達ネットワークの時空間的な解析法を検討した。キナーゼによるリン酸化反応に着目し、リン酸化部位を含むペプチド断片のみを細胞全抽出物試料から直接濃縮するヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー (HAMMOC) 法を開発し、nanoLC-MS 法と組み合わせることにより、一度に 1,000 個以上の *in vivo* リン酸化サイトを解析する方法を確立した。本法を用いて、乳癌細胞におけるシグナル伝達ネットワークのダイナミクス解析を行った。MCF-7 細胞をエストラジオールで刺激し 20 分以内に誘起されるリン酸化反応を追跡した。その結果、1033 種のリン酸化タンパク質、2873 種のリン酸化ペプチドおよび 1994 種のリン酸化サイトのダイナミクスを測定することが可能であった。1033 種のリン酸化タンパク質のうち 228 種は今までにリン酸化タンパク質として報告のない新規なリン酸化タンパク質であった。また、EGFR シグナル伝達経路やその他複数のシグナル伝達経路とのクロストークを確認した。

A. 研究目的

タンパク質の網羅的発現解析は、近年の質量分析計 (MS) の高性能化およびマイクロ化 LC とのオンライン接続により今日では比較的簡単に行えるようになった[1]。中でもリン酸化、メチル化などの翻訳後修飾は質量数変化を伴うため、MS を用いたプロテオーム解析の対象として適していると考えられる。しかしある特定の修飾をうけているタンパク質はほんの一部であるため、MS 解析に先立ち、修飾基選択的な濃縮をかける必要がある。リン酸化修飾の場合、チロシンに対しては特異性の高い抗体があるため、比較的容易に選択的な濃縮が可能であるが、セリン・スレオニンについてはそのよ

うな抗体が存在しないため、リン酸化プロテオミクスを行う上でボトルネックとなっていた[2, 3]。最近我々はチタニアおよびジルコニアを担体とする酸化金属クロマトグラフィー (MOC) を用いて、ヒドロキシ酸を競合剤とするリン酸化ペプチドの高選択的濃縮法を開発した[4]。超高精度質量分析計と組み合わせることにより、細胞抽出物のような複雑な混合物からワンステップで 1000 種以上のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。本研究では、このリン酸化プロテオミクスの手法を更に発展させるとともに、安定同位体標識法と組み合わせた定量的リン酸化プロテオミクスの手法を乳癌の細胞内シグナル伝達研究に応用することを目的とし、本年度は、本法がどの程度乳

癌のシグナル伝達ネットワークに適用できるのか、どのような知見が新たに得られるのかを見極めることを目的とした。その中で更に、未知のシグナル分子の同定、乳癌特有のシグナル伝達メカニズムの解明等をめざした。

B. 研究方法

B-1. 試薬・材料

アセトニトリル (LC-MS用)、酢酸 (LC-MS用)、乳酸(特級)、トリフルオロ酢酸(TFA, 特級)、25%アンモニア水、尿素、リジルエンドペプチダーゼ、ジチオスレイトール、ヨードアセトアミドは和光純薬(大阪)より購入した。トリプシンはプロメガ (Madison, WI, USA) より入手した。17 β -エストラジオールはSigma-Aldrich(St. Louis, USA)のものを用いた。チタニアはTitansphere (ジェールサイエンス、東京)を用いた。精製水はMillipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA)を用いた。

B-2. 試料調製

ヒト乳癌由来MCF-7細胞をSILACキット (Invitrogen) および安定同位体アミノ酸 ($^{15}\text{N}_4$ -Arg, D_4 -Lys、大塚製薬、徳島) を用いて培養し、プロトコール[5]に従って安定同位体標識を行った。同時に対照試料として、通常为非標識アミノ酸を用いて同様に培養し、安定同位体非標識細胞を調製した。細胞を14時間無血清飢餓状態にした後、安定同位体標識された細胞に対し10nMのエストラジオールによって刺激した。所定時間経過後、コントロールの安定同位体非標識細胞と混合した。その後、既報[4]に従って細胞を破砕し、タンパク質抽出、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製、還元アルキ

ル化処理、リジルエンドペプチダーゼおよびトリプシンによる消化を行った。消化ペプチドをC18カートリッジで脱塩・濃縮後、HAMMOC法のプロトコール[6]に従い、リン酸化ペプチドを濃縮した。すなわち、1 mgのチタニアを充填したピペットチップカラムを80%アセトニトリル、0.1%TFAに溶解させた300mg/mL乳酸溶液(溶液A)で前もって洗浄し、溶液Aで溶解させたペプチド試料をロードした。溶液Aで洗浄の後、乳酸を除いた溶液Aで更に洗浄した。溶出は0.5%アンモニア水で行い、溶出画分を直ちに酸性にした後、C18-StageTip[6]で脱塩濃縮を行った。

B-3. LC-MSによる測定

ThermoFisher LTQ-Orbitrap、Dionex Ultimate3000, CTC analytics HTC-PALから構成されるナノLC-MSシステムを用いて測定を行った。ナノLCカラムは自家製のエレクトロスプレーニードルにReproSil C18充填剤(3 μm 径, Dr. Maisch-GmbH, Ammerbuch, Germany)を自家充填して作製した[7]。流速は500nL/minで、その他の分析条件は既報[4]の通り行った。

B-4. データ解析

ピーク抽出はMass Navigator v1.2(三井情報、東京)を用いて行った。ペプチド配列の同定およびリン酸化サイトの決定は、MASCOTソフトウェア(Matrix Sciences社、London, UK)を用いて行った。検索条件パラメータ、同定クライテリアなどのは既報[4]の通り設定した。定量は、MASCOT同定結果をMass Navigatorにエクスポートし、該当ピークの抽出クロマトグラムにおけるピーク面

積を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における実験材料、装置等については一般的な化学・生物実験で用いるものであり、倫理面からの特別な措置を特に行う必要はなく、当実験施設において定められた一般的な実験指針に従って行った。

C. 研究結果および考察

C-1. ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー法(HAMMOC 法)の改良

チタニアには安定結晶形としてアナターゼ型およびルチル型があることが知られている。市販のチタニア (Titansphere) はアナターゼ型であり、HAMMOC 法開発時には、市販品をそのまま用いていた[4]。その後、さらに選択性を高めるためにチタニアを最適化していく中で、チタニア合成過程における焼成温度を変化させることにより、リン酸化ペプチドだけではなく、非リン酸化ペプチドやヒドロキシ酸に対するアフィニティーが大きく変動することを見出した。中でも 800°C で焼成することによって作製したルチル型の結晶形を持つチタニアは、リン酸化ペプチドに対し高い選択性を示した。そこで、このルチル型チタニアを用いた全自動オンライン二次元 LC-MS/MS システムの構築を試みた。800°C で焼成したルチル型チタニアを用いて、チタニア/C18 二相カラムを作製し、ナノ LC-MS システムを構築した (図 1A)。細胞試料 25μg 注入後、05%酢酸—80%アセトニトリル溶液での洗浄時間を最適化したところ、30分が最も効率的であった (図 1B)。本システムでは1回の測定で平均約 200 個のユニークなリン酸化ペプチドを同定できた。繰り返し

測定(n=22)を行った結果、696 個のユニークなリン酸化ペプチド、680 個のリン酸化サイトおよび 463 個のリン酸化タンパク質を同定することができた。チタニア市販品による結果と比較すると、同定数は半分以下であるが、マルチリン酸化ペプチド、およびチロシンリン酸化ペプチドの割合が高く、焼成ルチル型チタニアが Titansphere とは異なるリン酸化ペプチド濃縮選択性を有していることがわかった。

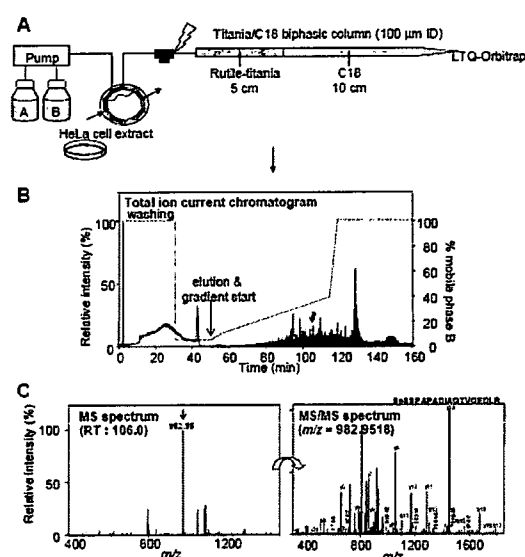


図 1 リン酸化ペプチド濃縮分析用オンライン二次元ナノ LC-MSMS システム

A: チタニア/C18 二相カラムを用いたシステム

B: 本システムで得られた典型的なトータルイオンカレントクロマトグラム

C: SpSSPAPADIAQTVQEDLR のマススペクトル (保持時間 106.00 分) と対応するマスマススペクトル (前駆体イオン $m/z = 982.9518$)。

以上の結果より、ルチル型チタニアと市販の Titansphere を相補的に使用することでより多様

性に富んだリン酸化ペプチドの回収が可能となることがわかった。なお、今までにオンライン濃縮・分析システムを用いて、細胞抽出物のような複雑試料のリン酸化プロテオーム解析が成功した例はなく、本法におけるリン酸化ペプチドの選択性および濃縮効率が非常に高いことを示している。

C-2. エストラジオール刺激による細胞膜由来エストロゲンシグナリング

乳癌細胞において、エストラジオール (E2) は核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) に作用し、関連遺伝子の活性化を誘起することは良く知られているが、この核内に対する比較的ゆっくりとした作用(通常は数時間から数日かかる)とは別に数十分で誘起される作用があることが最近わかってきた。これは細胞膜もしくは細胞質に局在する少量のERにE2が作用するもので、核内受容体に作用するnuclear-initiated steroid signaling(NISS)と区別してmembrane-initiated steroid signaling(MISS)と呼ばれている[8]。E2誘起MISSの結果として、MAPK1/3活性化、AKT1活性化やERのmembrane translocationなどが報告されているが、いまだ不明な点も多い。このネットワークはホルモン療法との関連も深く、E2の作用機構を解明し治療効果を予想できれば臨床上の意義も大きい[9]。そこで今回、HAMMOC法を用いた定量的リン酸化プロテオミクスを適用してE2誘起MISSにおけるリン酸化ネットワークの全容解明を試みた。図2に示すように、安定同位体標識をしたMCF-7細胞をE2で刺激し、5分、10分、20分後にそれぞれ細胞を破碎し、対照試料である安定同位体非標識細胞と混合し、リン酸化量の変化を定量した。

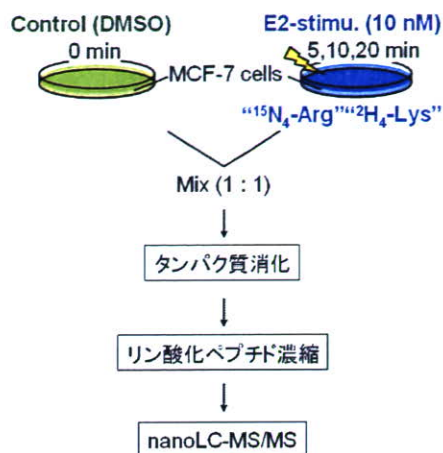


図2 E2刺激によるリン酸化量変化の定量システム

それぞれの時間におけるリン酸化量の変化を対照試料を内部標準試料とすることにより、リン酸化量の時間変化を算出した(図3)。

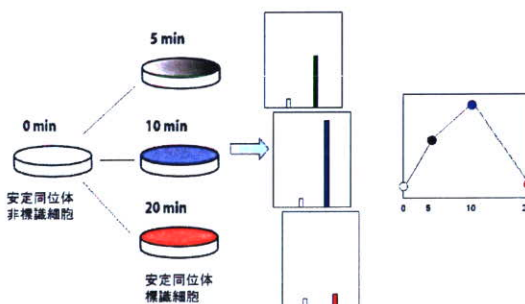


図3 安定同位体標識法を用いるリン酸化量の経時変化算出

得られた結果を表1に示す。重複なしで約2000個のリン酸化サイトが同定でき、その経時変化を測定することが可能であった。同定された1033個のリン酸化タンパク質のうち、最新のUniprotで報告されていないものが228種含まれており、本法の性能の高さを示している。同定されたリン酸化サイトは、E2刺激を行っていない安定同位体非標

識試料由来のものが、E2刺激細胞由来のものよりも多く、全体としてはE2刺激によりリン酸化量が減少していた。

表1 E2刺激MCF-7細胞におけるリン酸化プロテオーム

	No stimu.	SILAC-labeled (E2-stimu.)	Total
no. of phosphorylated sites	1441	1177	1994
no. of phosphopeptides	1651	1218	2873
no. of phosphoproteins	769	702	1033

次に同定されたリン酸化サイトのセリン、スレオニン、チロシン比をE2刺激の有無で比較をしてみた(図4)。その結果、セリン、スレオニンについてはほとんど変化がなかったが、チロシンについては、E2刺激による増加が認められた。

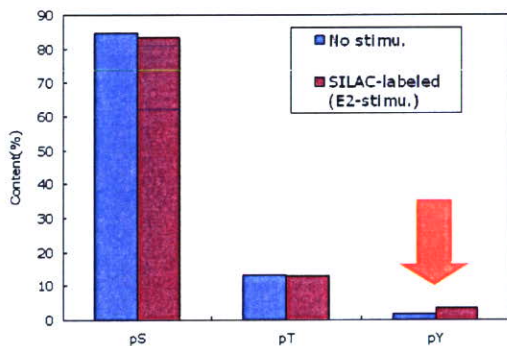


図4 E2刺激によるリン酸化セリン、スレオニン、チロシン比の変化

既知のキナーゼ基質モチーフ(www.HPRD.orgより取得)を用いて、同定されたリン酸化サイト周辺の配列についてマッチングを行ってみた(図5)。するとE2刺激による顕著な減少がAkt, casein kinase, GSKおよびERKに認められた。またチロシンキナーゼについては、ALKとEGFRに増加が認められた。

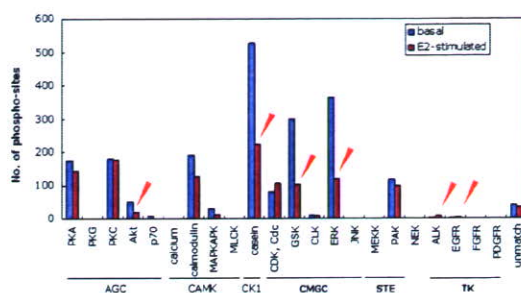


図5 同定されたリン酸化ペプチドのキナーゼ基質モチーフによる分類とE2刺激による分布の変化

そこで EGFR シグナル伝達経路に注目し、今回同定された 30 種以上のリン酸化タンパク質について、その経時変化をみてみると、14 種はリン酸化量が経時的に減少し、p38-MAPK を含む 6 種は、経時的にリン酸化量が亢進していた(図 6)。

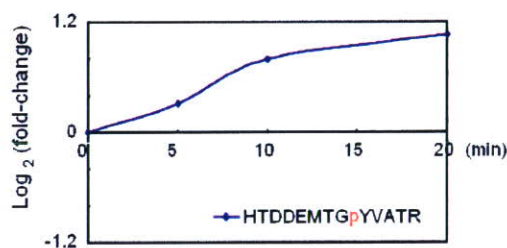


図 6 E2 刺激による p38-MAPK のリン酸化の経時変化

これは Song らによる結果と一致しており [10]、その他にも E2 誘起 MISS のシグナル分子として既知である、IGF1R、EGFR、PI3K、Akt、SGK などのリン酸化量およびその基質のリン酸化量の経時的な亢進を確認することができた。さらに E2 誘起 MISS のシグナル分子として今までに報告のないシグナル分子におけるリン酸化量の経時的な亢進が少なくとも数十種類確認された。

以上より、E2 誘起 MISS として既知である MAPK signaling および IGF1R-PI3K-Akt signaling が本法でも検出できることがわか

った。さらに、他のパスウェイの亢進も示唆する結果が得られた。

D. 結論

HAMMOC 法と定量的プロテオミクスの手法を組み合わせた定量的リン酸化プロテオミクスを確立し、乳癌のシグナル伝達ネットワークダイナミクスへ応用した。細胞膜付近に局在している ER に注目し、E2 刺激によって 20 分以内に誘起されるシグナル伝達ネットワークに本法を適用したところ、2000 種類のリン酸化サイトの経時変化をモニターすることが可能であった。リン酸化の亢進が見られた分子の中には既知のパスウェイ構成分子だけではなく、少なくとも数十種の未知のシグナル分子を含んでおり、他のパスウェイの亢進も示唆する結果が得られた。EGF 刺激によるリン酸化量変化と比べると、今回の実験におけるリン酸化量変化は 10 分の 1 程度と非常に微弱なものであったにも関わらず E2 誘起 MISS ネットワークの定量解析が十分に可能であったことから、本法が乳癌の細胞内シグナル伝達ネットワークの網羅的なダイナミクス研究ツールとして十分な性能を有していることが確認できた。

今後の展開としては、E2 誘起 MISS ネットワークにおける未知パスウェイの同定だけではなく、分子標的薬の作用機序解明、新規標的探索などへの展開をはかる予定である。

E. 健康危険情報

特に無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

Imami, K.; Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Tomita, M.; Ishihama, Y., Automated Phosphoproteome Analysis for Cultured Cancer Cells by Two-Dimensional NanoLC-MS Using a Calcined Titania/C18 Biphasic Column. *Anal Sci* 2008, 24, (1), 161-6.

2. 学会発表

- 1) 今見考志; 杉山直幸; 京野完; 富田勝; 石濱泰 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 パシフィコ横浜・ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル, 2007, 3P0126.
- 2) 石濱泰 第 27 回キャピラリー電気泳動シンポジウム クリエート浜松, 2007, S-3.
- 3) 今見考志; 杉山直幸; 京野完; 富田勝; 石濱泰 第 27 回キャピラリー電気泳動シンポジウム クリエート浜松, 2007, L-16.
- 4) 今見考志; 杉山直幸; 京野完; 富田勝; 石濱泰 第 18 回クロマトグラフィー科学会議 函館市民会館(函館), 2007, O-04.
- 5) Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Imami, K.; Ohnuma, S.; Tomita, M.; Ishihama, Y. HUPO 6th Annual World Congress Seoul, Korea, 2007, M201.
- 6) Ishihama, Y. Organization for Oncology and Translational Research 4th Annual Conference. Kyoto International Conference Center, 2007, SY-2-3.
- 7) Imami, K.; Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Tomita, M.; Ishihama, Y. 22nd International Symposium on Microscale Bioseparations & Methods for Systems Biology. Freie Universitat (Berlin, Germany), 2008, P123-Mo.