

分担研究報告書

乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測に関する研究

分担研究者 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 分子機能解析学分野 教授

研究要旨 乳癌のホルモン療法の治療効果予測法の確立を目指した研究を行った。ホルモン療法の効果予測のために開発したエストロゲン応答性3次元型マイクロアレイを用い、27例の乳癌検体の解析を行い、搭載遺伝子コンテンツの有用性を確認した。また、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持つGFPレポーター(ERE-GFP)を乳癌細胞に導入したレポーター細胞を用い、癌部間質のエストロゲン受容体(ER)活性化シグナルの評価を行い、さらにそれらの間質に関連する遺伝子の発現を検討した。また、同じレポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込んだものを用い、乳癌検体の癌細胞に導入して、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。その結果、ERの発現とERの活性は完全に相関するものではないことが明らかとなった。さらに術前治療の生検標品のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較を開始した。

A. 研究目的

乳癌の臨床において広範に施行されている内分泌治療は、乳癌の3分の2以上を占めるER陽性乳癌の増殖に必須である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。その治療法は近年、LH-RHアゴニストや第3世代のアロマターゼ阻害剤(AI)等の新規薬剤の登場によって急速に進歩している。しかし、これらの薬剤の適応を決める確実な分子指標はまだなく、従来通りERの発現の有無を指標にして判断されているが、それだけでは不十分であることは明らかである。さらに、これらの薬剤は乳癌の化学予防薬としても期待されているが、そのためには乳癌の高危険度集団を同定するための低侵襲で、高感度な検診法も求められている。そこで新規分子診断法を開発し、個々の薬剤によりベネフィットが得られる患者を特定することによって、患者にとってQOLの良い内分泌治療のいっそうの普及と乳癌患者の癌再発防止に貢献することを目的とする。これは将来の乳癌の発癌予防に向けての重要なステップともなると思われる。

B. 研究方法

1) 原発性乳癌27例についてエストロゲン応答性3次

元マイクロアレイ用のチップを用いた解析結果をまとめ、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。今後、現在進行中の術前ホルモン療法の多施設間臨床試験の中で、治療前生検標品と治療後手術標品を用いてそれら候補遺伝子の有用性について検討していく。その結果、より少数の遺伝子セットでも有効な判定が可能であるとの結果が得られれば、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。

2) ERE-GFPをER陽性乳癌細胞に安定導入して作成した指示細胞を患者組織より得た癌部の初代細胞と共生培養し、蛍光を観察し、定量することにより個々の乳癌患者の癌の特性(エストロゲン環境に対する反応性)を把握する。特に術前アロマターゼ阻害剤治療の効果を判定し、治療奏効性との比較を行う。

3) ERE-GFPを導入したアデノウイルスを用いて、原発腫瘍によるER活性化能の評価法を確立する。これは個々の患者のエストロゲンシグナルを総合的に評価でき、従来のERの免疫染色法による評価に勝る結果が期待できる。

(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

- 1) 我々が開発したエストロゲン応答遺伝子とその関連遺伝子36個を搭載した3Dマイクロアレイを用いて原発乳癌患者 27 例の手術検体を解析したところ、その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 や HER2 (逆相関) とも相関を示した。また、これらの患者の中から3例の再発症例が観察され、そのうち1例はER陽性患者、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 (論文準備中)。
- 2) 以前作製した、エストロゲン応答配列を転写調節領域に持った GFP 発現ベクターを導入した ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7/E10 を用いて乳癌手術材料から得た間質細胞のエストロゲンシグナル刺激活性を評価した結果、その活性が患者ごとに大きく異なり、それぞれの癌の間質に個性があること、その活性は閉経の有無、癌の悪性度と相関が見られることを明らかにした (Yamaguchi et al. Cancer Res. 2005)。そこで、山口らはこれらの間質の分類、層別化が間質線維芽細胞の分化と関係する遺伝子の発現をみることで可能かどうかを検討している。一方、山口は各標品の液性因子の解析から、個々の間質細胞からは乳癌細胞の増殖をサポートする他の因子も分泌され、重要であることを明らかにした (論文準備中)。
- 3) ERE-GFP をアデノウイルス型発現ベクターに組み込み、手術標品から作成した初代培養細胞に導入して ER 活性化能を評価する系を作成した。これによって個々の症例の原発腫瘍細胞での癌微小環境も含めた ER シグナル系の評価が可能になった。上記の E10 細胞の系とこのウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、ほぼ乳癌と同様の結果が得られ、子宮においても癌周辺の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であ

ること、これに対し AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった (in press)。

- 4) このウイルスアッセイ系を用いて山口の協力のもとに乳癌の症例約 60 例について検討を行った。その結果、本アッセイ系で解析した ER 活性はその検体の免疫染色法によって検出した ER タンパクの発現とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。しかも HER2 との興味深い相関が観察された (論文準備中)。
- 5) また、少数ではあるが AI 治療後の再発症例で検体の採取が可能であった症例について、このウイルスアッセイ系で ER 活性を解析したところ、治療後再発にもかかわらず、ER 活性が存在し、in vitro で抗エストロゲン剤が有用なケースがあることが明らかとなった。

D. 考察

我々はこれまで、癌細胞におけるエストロゲンの作用の分子機序を解明する一助とするため、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。その中で、HDAC6 や 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子測診断を可能にする DNA チップの開発を目指した。今回用いた新型のマイクロアレイ装置である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、臨床に役立つシステムになる可能性がある。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、搭載コンテナ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みているわけではないが、興味深い結果と思われる。一方、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が絞られれば、マイクロアレイでなく、より実用化しやすい RT-PCR で診断キット化も可能かもしれない。今後この点についても検討していく。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問題点も多く、短期の実用化を目指すなら他の手法、たとえばすでに確立している免疫染色法などに乗せていく方が良くもしいない。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。

一方、近年臨床で広く用いられるようになった第3世代のアロマトラーゼ阻害剤は特に癌細胞周囲の間質組織に存在するエストロゲンを産生する酵素、アロマトラーゼを標的としており、癌細胞へのエストロゲンの供給を遮断する治療である。この治療の奏効性予測には周辺間質を含めた総合的な評価系が必要となる。そこでエストロゲンシグナルに応答して蛍光を発する ERE-GFP を持った指示細胞を作成し、そのような評価系の確立を目指した研究を行っている。乳癌手術材料から得た間質細胞とこの GFP レポーター細胞を共培養することによって個々の癌の間質も含めた微小環境の評価が可能であることが示された。さらに個々の原発腫瘍を用いた微小環境評価を可能にするために、アデノウイルスベクターを用いて同じレポーターカセットを患者検体から得た癌細胞に導入して ER 活性を評価する系を開発した。現在この系を用いて乳癌手術検体の検討を進めている。これまでに本システムでアッセイした ER 活性は ER の発現とは相関するものの、一致はしないことが観察されている。また、上記の GFP 指示細胞の系とこのウイルスの解析系を用いて、同じエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の検体について検討したところ、子宮においても癌周囲の間質細胞からのエストロゲンの供給が重要であること、これに対し AI 剤の添加が効果を示すことなどが明らかとなった。従来、乳癌で広範に使われてきた抗エストロゲン剤であるタモキシフェンが子宮癌ではアゴニストとして作用することもあり、内膜癌に対するホルモン療法は進行癌に対する MPA 大量療法以外はほとんど行われていなかったが、我々の結果から、症例を限れば、第3世代の強力なアロマトラーゼ阻害剤 (AI) は内膜癌の治療に効果があるかもしれない。

最近、第3世代の AI 剤が登場してから数年が経過したことにより、AI 剤治療後の再発が報告されるようになってきた。そこで、生検や再手術によって検体が採取可能な再発症例について、このウイルス GFP 系を用いて検討をおこなってみたところ、GFP 活性の高い、すなわち AI 剤が効果を示さないにもかかわらず、ER 活性の高い症例が存在すること、そこにいくつかの抗

エストロゲン剤の添加が抑制効果を示す場合があることが明らかとなった。今後さらに例数を増やして検討する必要があるが、AI 耐性機序の解明と、再発後の治療選択に役立つ結果が得られるものと思われる。このような観察結果も踏まえ、in vitro での研究を行うため、ERE 活性を保持している AI 耐性乳癌細胞株の作成を試みている。

E. 結論

エストロゲン応答遺伝子群を搭載した3次元型 DNA マイクロアレイを用いた解析から HDAC6 や EGR3 など、これまでの研究で同定してきた候補遺伝子群の有用性が確認された。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。また、癌細胞周囲の間質も含めたエストロゲンシグナルの癌微小環境評価を行うことでホルモン療法の奏効性をより正確に把握することを目指し、指示細胞を用いる系とアデノウイルスを用いる2つのアッセイシステムを開発した。それを用いて、乳癌検体と子宮内膜癌検体を検討した結果、特に子宮内膜癌へのホルモン療法の可能性が示されたことは興味深い。さらに、乳癌においても ER 活性を見ることは単純に ER の発現を判定することとは違った意味を持つことが示された。この点は重要であるので、今後詳細な検討が必要である。また、本アッセイシステムを用いた乳癌再発検体の解析から、AI 耐性機序解明と AI 再発後の治療選択に有益な情報を得ることが出来ると思われた。

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. and Yaegashi, N.](#) Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
- 2) 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.
- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S. and Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.* in press, (2008)
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 林 慎一：乳癌とエストロゲン受容体、コレグジュレーター。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：アロマトーゼ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回北関東乳癌臨床腫瘍研究会(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—エストロゲン依存性乳癌の個性と治療選択—。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—エストロゲンシグナル経路の変化—。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—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) 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.
- 13) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願中3件

- 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.

分担研究報告書

乳癌のSNPアレイによるゲノム構造異常解析と術前化学療法の効果予測に関する研究

分担研究者 武井 寛幸 埼玉県立がんセンター病院 科長 兼 部長

研究要旨 近年乳癌の術前化学療法が行なわれるようになり、治療成績改善への寄与が期待されている。化学療法のレジメンとして、anthracycline、taxanに加え、HER2陽性乳癌にHerceptinを使用することでpCR (pathological complete response) rateが向上した。予後因子解析の結果、化学療法への反応、ER、HER2免疫染色陽性はすべて予後予測因子であった。しかしながら、HER2陽性であっても、約半数はHerceptinに反応しなかった。より正確な予後因子を確立するためにSNPアレイによる乳癌のゲノム異常の解析を開始した。HER2コピー数増加と免疫染色によるHER2陽性は必ずしも一致しなかった。一致しない理由や臨床データとの関連を今後検討したい。HER2以外にも、有効な予後因子となる遺伝子異常をSNPアレイによるゲノム解析により特定し、臨床に応用したい。

A. 研究目的

乳癌治療における術前化学療法は標準的治療法として確立しつつあるが、その利点は以下の4つである。1) in vivoの感受性試験である。2) 縮小手術が可能となる（乳房温存率が向上）。3) 予後良好な症例を選別できる（効果のあったものは再発率が低い、特にpathological complete response (pCR)が得られた症例の予後は良好である。4) 術後投与と比べて生存率に差がない。以上の4つの術前化学療法の利点に基づいて、われわれは術後に化学療法が必要であると推察される患者にはできるだけ術前に化学療法を行うことを奨めている。化学療法が必要であると考えられる患者の特徴を以下に示す。1) ホルモンレセプター陰性。2) HER2陽性。3) 腫瘍浸潤径2.1cm以上。4) リンパ節転移陽性。5) 腫瘍グレード2または3。6) リンパ管侵襲陽性。7) 35歳未満。これら7つの因子を総合的に考慮して決定する。一方、術前化学療法の欠点として、効果がなかった場合、手術が遅れることである。したがって、化学療法の効果予測因子が重要となる。そこで、われわれは化学療法前に腫瘍組織を生検し、SNPアレイによりゲノム解析を行い、術前化学療法の効果と関連性を検討し、化学療法の反応を予知することを研究の目的としている。

B. 研究方法

現時点における術前化学療法の病理学的抗腫瘍効果と予後因子（化学療法レジメン、ホルモンレセプター、HER2免疫染色）の関係について検討した。対象は埼玉県立がんセンター病院で2005年以降に術前化学療法を受けた浸潤性乳癌125症例である。さらに、病理学的抗腫瘍効果およびその効果予測因子の予後への影響についても検討した。対象は同病院で2005年までに術前化学療法を受けた浸潤性乳癌76症例である。また、術前化学療法が必要な患者で腫瘍と末梢血が得られた7例についてSNPアレイ (Affymetrix mapping 50K-Xba array) を用いてゲノム異常の解析を行った。

C. 研究結果

化学療法のレジメンを以下の3群に分類した。AnthracyclineとTaxanを使用(AT)、TaxanとHerceptinを使用(TH)、Anthracycline、Taxan、およびHerceptinを使用(ATH)。pCR rateは、AT:25%、TH:44%、ATH:58%であり、AnthracyclineおよびHerceptinを併用することでpCR rateは向上した。エストロゲンレセプター(ER)およびプロゲステロンレセプター(PR)それぞれにおけるpCR rateは、ER陽性:19%、ER陰性:49%、PR陽性:9%、PR陰性:45%であり、ホル

モンレセプター陰性症例で pCR rate は高かった。HER2 発現による pCR rate は、HER2 0 : 20%、1+ : 33%、2+ : 35%、3+ : 55%であり、HER2 が高発現するにつれて pCR rate は高くなった。ER と HER2 の組み合わせによる pCR rate は、ER-PR- : 43%、ER-HER2+ : 56%、ER+HER2- : 21%、ER+HER2+ : 18%であり、ER-HER2+の組み合わせが最も pCR rate が高かった（ここでは HER2+=2+または3+、HER2-=0または1+に分類した）。以上より、ER、PR、HER2 は化学療法効果予測因子と考えられた。次に、病理学的抗腫瘍効果とその効果予測因子である ER と HER2 の無再発生存率へ及ぼす影響を検討した。無再発生存率は Kaplan-Meier により算出し、log-rank test による有意差検定を行った。病理学的抗腫瘍効果を pCR (Grade 3)、Grade 2、Grade 0-1 に分類すると、pCR が得られた症例の無再発生存率は Grade 2 または Grade 1 に比べ良好な傾向を示した。さらに、Grade 2 は Grade 0-1 に比べ無再発生存率が良好な傾向を示した。一方、ER 陽性症例は ER 陰性症例に比べ無再発生存率が良好な傾向を示し (P=0.07)、HER2 陽性症例は HER2 陰性症例に比べ無再発生存率が良好であった (P=0.043)。

化学療法前に針生検により腫瘍の得られた7例につき、SNP アレイによるゲノム増減の解析を行った。3例以上に共通した染色体増加領域は 1q, 3q, 6q, 7q, 8q, 13q21-qter, 16q, 17q, 20q, 21q, 22q であり、3例以上に共通した染色体欠失領域は 3p, 8p, 13q11-q21, 15q, 17p であった。HER2 (17q21.1) 領域の増加は4例にみられた。一方、7例の HER2 免疫染色の結果、6例が陽性であった。この6例中、HER2 増加は4例にみられたが、2例の HER2 コピー数は正常であった。この2例では、遺伝子増加以外の機構で HER2 蛋白発現が増加していると考えられた。ゲノム欠失領域では BRCA1 (13q12) と TP53 (17p13) 欠失がそれぞれ3例にみられ残存アレルにそれぞれの遺伝子の変異が生じている可能性が考えられた。

D. 考察

これまで、術前化学療法を実施した患者の予後因子を分析したところ、HER2 陽性、ER 陰性、PR 陰性がそれぞれ予後良好因子であった。しかしながら、HER2 免疫染色陽性であっても約半数は Herceptin 治療に反応していない。一方、HER2 免疫染色の陽性例には HER2 コピー数増加を示す腫瘍と HER2 コピー数正常

の腫瘍がみられた。今後、多数例について HER2 免疫染色、コピー数、Herceptin 治療効果について検討し、三者の関係を明らかにしたい。一方、乳癌の発生、進展に重要な BRCA2 と TP53 癌抑制遺伝子を含む腫瘍が7例中3例にみられた。残存アレルに点変異が生じているのかどうか今後検討したい。SNP アレイによるゲノム解析により、術前化学療法の予知に役立つ遺伝子異常を特定したいと考えている。

E. 結論

化学療法のレジメンとして、anthracycline、taxan に加え、HER2 陽性乳癌に Herceptin を使用することで pCR rate が向上した。予後因子解析の結果、ホルモンレセプターと HER2 発現が術前化学療法の効果予測因子であった。しかしながら、HER2 陽性腫瘍の約半数は Herceptin 投与に対して反応を示さなかった。一方、HER2 免疫染色陽性であっても HER2 コピー数が正常な腫瘍があり、今後、HER2 免疫染色、コピー数、ハーセプチン治療効果の関係について検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono, S., Kurosumi, M., Simooka, H., Kawanowa, K., Takei, H. and Suemasu, K. Nipple adenoma found in a mastectomy specimen: Report of a case with special regard to the proliferation pattern. Breast Ca., 14(2) : 234-238, 2007.
- 2) Kurosumi, M. and Takei, H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. Breast Ca., 14(4) : 342-349, 2007
- 3) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Hagiwara, Y., Kamimura, M., Hayashi, Y., Tozuka, K., Suemasu, K., Inoue, K. and Tabei, T. Current trends of sentinel lymph node biopsy for breast cancer — A surgeon's perspective. Breast Ca., 14 (4) : 362-370, 2007
- 4) Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H,

Kurosumi M, Akiyama F, Kinoshita T, Takei H, Takahashi K, Ikeda M, Nakashima K. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast*. 2007 Dec ;16 Suppl 2:S72-7. Epub 2007 Aug 21.

- 5) Takei, H., Suemasu, K. Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Koh, J., Sato, K., Tsuda, H., Kurosumi, M. and Tabei, T. Multicenter phase II trial of neoadjuvant exemestane for postmenopausal patients with hormone receptor-positive, operable breast cancer: Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-03). *Breast Ca. Res. Treat*, 107: 87-94, 2008

2. 学会発表

- 1) Takehara, M., Ohsumi, S., Takei, H., Shimozuma, K., Ohashi, Y., Suemasu, K., Hozumi, Y. Health-related quality of life and psychological distress in Japanese patients with breast cancer treated with tamoxifen, exemestane or anastrozole for adjuvant therapy : a phase III randomized study of National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (N-SAS BC) 04. 30th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2007.
- 2) Kurosumi, M., Kobayashi, Y., Takei, H., Kitsugi, K., Ueno, M., Green, G, Vargo, J. The necessity of two gene markers for accurate detection of lymph node micrometastasis using an investigational real time RT-PCR assay confirmed by 0.2mm interval frozen section analysis in breast cancer.
- 3) 武井寛幸, 黒住昌史, 吉田 崇, 二宮 淳, 上村万里, 林 祐二, 戸塚勝理, 井上賢一, 田部井敏夫 : 術前化学療法後の乳房温存療法における乳房内再発の検討. 第32回日本外科系連合学会学術集会. 要望演題 5 : 乳腺外科における術前化学療法後の温存療法. 2007.6.22-23. 東京 (東京医科大学外科学第一講座、加藤治文教授、京王プラザホテル)
- 4) 武井寛幸, 末益公人, 黒住昌史, 吉田 崇, 二宮淳, 萩原靖崇, 上村万里, 林 祐二, 井上賢一, 田部井敏夫 : センチネルリンパ節転移陽性例に対し腋窩郭清省略は可能か. ミニパネルディスカッション 1. 第15回日本乳癌学会学術総会. 2007.6.29-30. 横浜 (帝京大学医学部外科 池田正教授)
- 5) 黒住昌史, 井上賢一, 田部井敏夫, 下岡華子, 河野輪香織, 武井寛幸, 末益公人 : Trastuzumab を含
- む乳癌術前治療 (NAT) の効果予測因子に関する FISH 法と IHC 法を用いた病理学的検討. プレジデントシンポジウム 2. 第15回日本乳癌学会学術総会. 2007.6.29-30. 横浜 (帝京大学医学部外科 池田正教授)
- 6) 山口ゆり, 下岡華子, 清野祐子, 武井寛幸, 黒住昌史, 林 慎一 : 乳癌における間質細胞の特性. 第15回日本ステロイドホルモン学会学術総会. 2007.11.24. 仙台 (会長 : 東北大学、笹野公伸)
- 7) 武井寛幸, 吉田 崇, 戸塚勝理, 石川裕子, 浅川英輝, 林 祐二, 井上賢一, 田部井敏夫, 下岡華子, 河野輪香織, 黒住昌史 : 乳癌の腋窩リンパ節郭清の予後に及ぼす影響. 第15回地域医療外科系連合会総会. 2007.11.17. さいたま市 (徳島県立中央病院, 鎌村好孝)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

がん転移関連蛋白質 NM23 と相互作用する蛋白質の同定及び機能解析と
その臨床応用に関する研究

分担研究者 角 純子 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 主任研究員

研究要旨 がん転移関連遺伝子 NM23 は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における NM23 の高発現は、白血病細胞の生物学的特性（分化抑制／増殖促進）やその臨床的特性（予後不良）と関連する。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳癌では転移能抑制や予後良好と関連する。がん細胞の特性発現における NM23 の多彩な作用は、NM23 と相互作用する蛋白質の存在によると示唆されている。したがって、がん細胞の増殖／分化／転移と関連する NM23 結合蛋白質を同定し機能を解析する必要がある。NM23 結合蛋白質を探索することを糸口として、がん細胞の特性に関与する新しい分子標的の開発を目指している。NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索した。NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。抗体が入手できた 10 個および既知の NM23 結合蛋白質 10 個の抗体を用いて、白血病細胞 12 株（骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞株 6 株）と神経芽腫細胞 2 株での発現を Western blotting で検証した。白血病細胞を用いた免疫沈降と Western blotting にて 4 個（HSC70, RAR α , ROR α , NM23-H2）の NM23 結合蛋白質を、また免疫沈降と質量解析にて 4 個（S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2）の蛋白質を候補蛋白質として同定した。白血病細胞の特性に関連する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。今後、白血病臨床検体における発現を検証し、臨床的意義を検討する予定である。

A. 研究目的

がん転移関連遺伝子 NM23 は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における NM23 の高発現は、白血病細胞の生物学的特性（分化抑制／増殖促進）やその臨床的特性（予後不良）と関連する。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳癌では転移能抑制や予後良好と関連する。がん細胞の特性発現における NM23 の多彩な作用は、NM23 と相互作用する蛋白質の存在によると示唆されている。したがって、腫瘍細胞の増殖／分化／転移各々と関連する NM23 結合蛋白質を同定し機能を解析する必要がある。NM23 と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関与する新しい分子標的の開発を目指している。

B. 研究方法

がん細胞の特性に結びつく分子の開発手段として、がん細胞の特性に関して多機能性を発揮する NM23 蛋白質への結合を指標として機能特異的な分子を探索する。免疫学的、生化学的、およびプロテオミックスの手法を用いた下記の 3 方法にて行う。

1. NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索する。
2. 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、Western blotting 法にて候補蛋白質の共沈降を検証する。
3. 白血病細胞抽出液と NM23 抗体を用いた免疫共沈降法にて、NM23 結合蛋白質を分離し、質量解析にて蛋白質を同定する。

4. Pull-Down GST-NM23 Protein:Protein Interaction 法により、細胞抽出液および粗精製血清／腹水を用いて、NM23 結合蛋白質を分離精製し、質量解析にて蛋白質を同定する。

C. 研究結果

1. NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索した。NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。
2. 上記 21 の内 10 個について抗体が入手できた。また、既知の NM23 結合蛋白質 10 個についての抗体も入手した。合計 20 抗体を用いて、白血病細胞 12 株（骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞 6 株）と神経芽腫細胞 2 株での発現を Western blotting で確認した。
3. 白血病細胞中での結合を検証する目的で、NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いた免疫共沈降実験にて共沈降する蛋白質を上記 20 抗体を用いた Western blotting で解析した。NM23-H1 を高発現している白血病細胞において HSC70, RAR α , ROR α , NM23-H2 が NM23-H1 と特異的に共沈降した。白血病細胞の分化増殖におけるこれらの蛋白質の動態や機能を解析中である。
4. NM23-H1 抗体と白血病細胞抽出液を用いて、共沈降した蛋白質を分離精製し、質量解析した結果、S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2 蛋白質を同定した。前述の白血病細胞 12 株での発現を Western blotting で検証中である。
5. Pull-Down GST-NM23 Protein:Protein Interaction 法により、ヒト正常血清中の NM23-H1 結合蛋白質（27 kDa）を見出した。今後、質量解析にて蛋白質を同定する予定である。

D. 考察

白血病細胞抽出液を用いて NM23 結合蛋白質の分離同定を目指し、いくつかの候補蛋白質を同定できた。NM23 は、多機能性である。白血病での NM23 高発現は、分化抑制／増殖促進を誘導し、予後不良と関連する。この機能に作用する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。白血病臨床検体における発現を検証し、臨床的意義を検討する。さらに、白血病予後不良患者で高濃度発現している血

清 NM23 蛋白質と特異的に結合している蛋白質の同定およびその機能（白血病細胞増殖促進活性）との関連解析へと展開する予定である。白血病における増殖／分化や予後不良に関与する新しい診断・治療の分子標的の開発が期待できる。

E. 結論

NM23 蛋白質をプローブとして、Protein Array を使用して NM23 結合蛋白質を網羅的に探索して、NM23 蛋白質と特異的に結合する 21 個の腫瘍関連蛋白質を同定した。抗体が入手できた 10 個および既知の NM23 結合蛋白質 10 個の抗体を用いて、白血病細胞 12 株（骨髄性白血病細胞 6 株、リンパ性白血病細胞 6 株）での発現を Western blotting で検証した。白血病細胞を用いた免疫沈降と Western blotting にて 4 個（HSC70, RAR α , ROR α , NM23-H2）の NM23 結合蛋白質を、また免疫沈降と質量解析にて 4 個（S100-A8, S100-A9, SPRR2E, NM23-H2）の蛋白質を候補蛋白質として同定した。白血病細胞の特性に関連する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. Focus on Neuroblastoma Research (Editor: Julio A. Fernandes, pp.85-97, 2007.
 2. 学会発表
 - 1) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical and biological significance of overexpression of NM23 in leukemia. 7th International Congress of the NDP Kinase / NM23 / awd Family, 2007.
 - 2) 角 純子, 粕壁 隆, 本間良夫, 金子安比古: Detection of NM23-interacting proteins and their possible role on poor treatment outcome in leukemia. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.
 - 3) 角 純子, 粕壁 隆, 本間良夫, 金子安比古: 白血病細胞における NM23 蛋白質の機能と相互作用蛋白質の探索. 第 69 回日本血液学会, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

角 純子

「NM23 蛋白質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」

特許第3557367号

平成16年5月21日 特許権取得,

現在維持継続中

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Kaneko, Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
2. Sugawara, W., Haruta, M., Sasaki, F., Watanabe, N., Tsunematsu, Y., Kikuta, A. and Kaneko, Y. Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 49: 240-249, 2007.
3. Watanabe, N., Haruta, M., Soejima, H., Fukushi, D., Yokomori, K., Nakadate, H., Okita, H., Hata, JI., Fukuzawa, M. and Kaneko Y. Duplication of the paternal *IGF2* allele in trisomy 11 and elevated expression levels of *IGF2* mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type. *Genes Chromosomes & Cancer*, 46: 929-935, 2007.
4. Tomioka, N., Oba, S., Ohira, M., Misra, A., Fridlyand, J., Ishii, S., Nakamura, Y., Isogai, E., Hirata, T., Yoshida, Y., Todo, S., Kaneko, Y., Albertson, DG, Pinkel, D., Feuerstein, BG and Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
5. Honda, S., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Ohira, M., Matsunaga, T., Yamaoka, H., Horie, H., Ohnuma, N., Nakagawara, A., Hiyama, E., Todo, S. and Kaneko, Y. The methylation status of *RASSF1A* promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer*, in press, (2008)
6. Haruta, M., Matsumoto, Y., Izumi, H., Watanabe, N., Fukuzawa, M., Matsuura, S. and Kaneko, Y. Combined BubR1 protein down-regulation and *RASSF1A* hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol Carcinog*, in press, (2008)
7. Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of paternal *IGF2* or loss of maternal *IGF2* imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural *WT1* abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* in press, (2008)
8. 金子安比古 : 細胞遺伝学. 新小児がんの診断と治療。別所文雄、杉本徹、横森欣司編、診断と治療社 25-30, 2007.
9. 金子安比古 : Wilms 腫瘍の分子生物学、特集：小児固形腫瘍の分子生物学 (その3)、最新の知見、小児外科、39: 1348-1352, 2007.

10. Nagayama, K., Kohno, T., Sato, M., Arai, Y., Minna, J.D. and Yokota, J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. *Genes Chrom. & Cancer*, 46: 1000-1010, 2007.
11. Li, X-L., Arai, Y., Harada, H., Shima, Y., Yoshida, H., Rokudai, S., Kimura, A. and Kitabayashi, I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53- mediated transcription. *Oncogene*, 26: 7231-7239, 2007.
12. Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, 57: 103-108, 2007.
13. Haruta, M., Arai, Y., Sugawara, W., Watanabe, N., Honda, S., Ohshima, J., Soejima, H., Nakadate, H., Okita, H., Hata, H., Fukuzawa, M. and Kaneko, Y. Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*, in press, (2008)
14. Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H. and Yaegashi, N. Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. *Reproductive Oncology* (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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)
21. 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)
22. Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S. and Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.* in press, (2008)
23. 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ー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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. Kono,S., Kurosumi, M., Simooka, H., Kawanowa, K., Takei, H. and Suemasu, K. Nipple adenoma found in a mastectomy specimen: Report of a case with special regard to the proliferation pattern. *Breast Ca.*, 14 (2) : 234-238, 2007.
29. Kurosumi, M. and Takei, H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Ca.*, 14 (4) : 342-349, 2007
30. Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Hagiwara, Y., Kamimura, M., Hayashi, Y., Tozuka, K., Suemasu, K., Inoue, K. and Tabei, T. Current trends of sentinel lymph node biopsy for breast cancer — A surgeon's perspective. *Breast Ca.*, 14 (4) : 362-370, 2007
31. Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, Kinoshita T, Takei H, Takahashi K, Ikeda M, Nakashima K. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast*. 16 : Suppl 2:S72-77. 2007.
32. Takei, H., Suemasu, K. Inoue, K., Saito, T., Okubo, K., Koh, J., Sato, K., Tsuda, H., Kurosumi, M. and Tabei, T. Multicenter phase II trial of neoadjuvant exemestane for postmenopausal patients with hormone receptor -positive, operable breast cancer: Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-03). *Breast Ca. Res. Treat*, 107: 87-94, 2008
33. Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Focus on Neuroblastoma Research* (Editor:Julio A). Fernandes, pp.85-97, 2007.