

a : 浸潤性乳癌 b : 非浸潤性乳癌 c : 良性乳腺疾患
 図8 浸潤、非浸潤群別の ProteinChip リーダー測定経時変化 m/z10250

C-2-2 精製過程

目的ピークを多く含有する患者血清を精製サンプルとして一連の精製ステップを実行した。

Agilent カラム (xxxx) を用いて高含有量タンパクを除去した後、濃縮し、Urea 変性を行った。

Q spin column 精製において、pH9 Buffer で吸着しなかった画分を再び濃縮し、Tricine-SDS-PAGE (ゲル濃度 16.5%) でゲル上に分離した。

泳動ゲルにバックグラウンドが白く染

まる Negative Gel Stain を施し、染色されない部分を切り出した (図9)。切り出した部分に目的タンパクが含まれていることを ProteinChip リーダーによる測定で確認した (図10)。

今回は、切り出したピーク確認用レーンを5分割して抽出したものを測定し検出されたピークプロット像より m/z10250 が含まれる領域を Gel 3、Gel 4 と予想し LC-MS/MS での分析を行った。

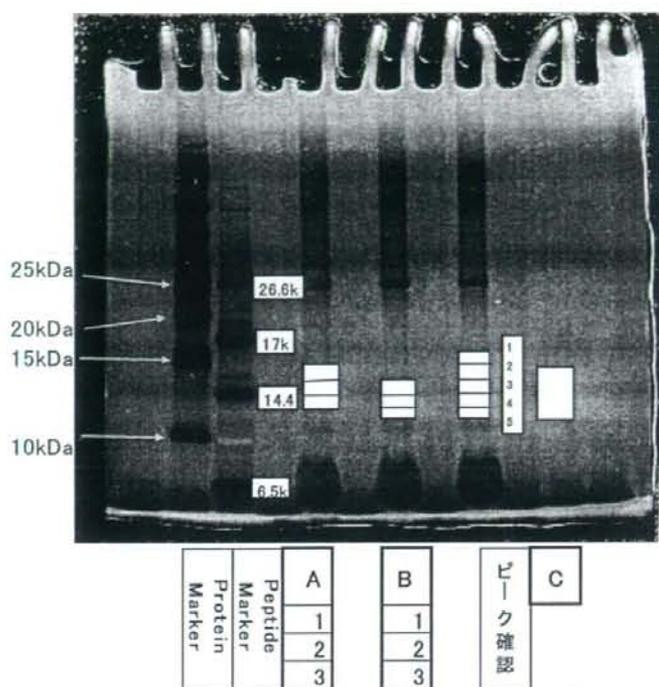


図9 Tricine-SDS-PAGE 泳動像

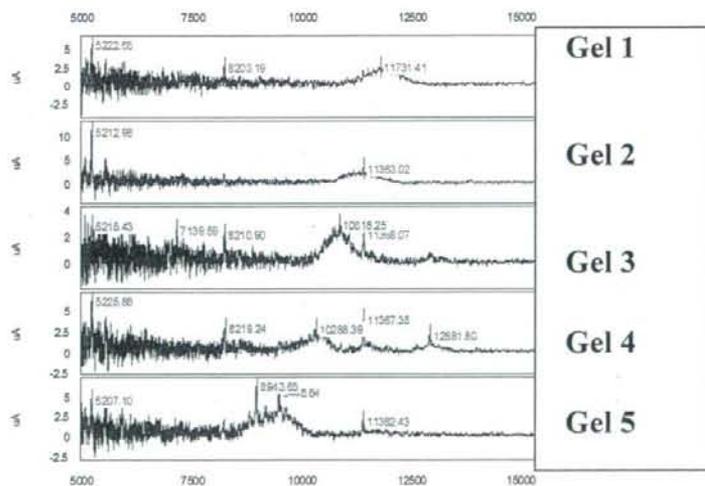


図10 Tricine-SDS-PAGE 泳動後の切り出し位置1～5から抽出した画分から ProteinChip リーダー測定で検出されたピーク

C-2-3 同定

Tricine-SDS-PAGE ゲルから A, B の 2 レーンよりゲルを切り出し、Trypsin 消化を行った後、LC-MS/MS 解析した。C 領域を

ネガティブコントロールとした。A, B それぞれのレーンの一部に目的ピーク部分を含むように切り出し、その位置に含まれる候補タンパク質によって同定の絞り込みを行った。

条件
同定した領域が $m/z10250$ 以下のもの
PI 値が 8 以上のもの
複数のバンドで同定されたタンパク質数
A と B に共に検出されたタンパク質
A または B で MS/MS で同定領域が二つ以上あるもの
上の条件で A と B に検出されたもの

表 2. LC-MS/MS 結果による目的タンパクの推定条件 2

以上の検討により、非浸潤性乳癌群と浸潤性乳癌群に有意差を示すバイオマーカー候補として 7 つのタンパク質が選択された。

現在免疫抗体実験によって同定作業を進めている。

D 考察

本研究は、3 年間に亘り原発性乳癌について、①術前ホルモン療法の奏効性に関連するバイオマーカー開発、②非浸潤性乳癌に関するバイオマーカー開発について検討をおこなってきた。昨年度の報告において、術前ホルモン療法の奏効性について、奏功群と非奏功群間に有意差を示すタンパク質候補を特定したが、今回はさらに進んで、バイオマーカーとなる可能性が高いタンパクの精製・同定を試みた。

特定したバイオマーカー候補

($m/z9713$) は、術前ホルモン療法の効果予測に関連する性質を有するタンパク質であると予想され、今後、同療法を提供する際の患者適応の判断材料として活用されることが期待できる。

また非浸潤性乳癌のバイオマーカー候補として同定を進めているタンパク質

($m/z10250$) は、非浸潤性乳癌群と浸潤性乳癌群との間に有意差を示すが、良性乳腺疾患群との間には有意差がないことから、非浸潤性乳癌のみを特異的に区別できるバイオマーカーではない。

今回の研究では正常群の測定が行われておらず、 $m/z10250$ ピークを非浸潤性乳癌のバイオマーカーとして利用するためには、さらに他因子との組み合わせ等を検討する必要がある。

E 結論

今年度は、①術前ホルモン療法の奏効性に関連するバイオマーカー開発、②非浸潤性乳癌に関するバイオマーカー開発の 2 検討課題について、Protein Chip SELDI System を用いた多検体の解析から統計演算操作によって各バイオマーカー候補の選択を行い、その精製・同定までを目的として研究を進めてきた。

バイオマーカー候補のタンパク質名は数種まで絞ることができたが、最終的な同定結果には至っていない。

今後の継続研究により、第 1 にバイオマーカー候補タンパク質の同定を完了し、次に新たな患者血清を用いた検証試験やそのマーカーとしての有用性の検証など、新規バイオマーカーの開発に必要な課題に取り組む。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

論文発表

1: Kuroi K, Shimozuma K, Ohashi Y, Hisamatsu K, Masuda N, Takeuchi A, Aranishi T, Morita S, Ohsumi S, Hausheer FH. Prospective assessment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy due to weekly paclitaxel in patients with advanced or metastatic breast cancer (CSP-HOR 02 study). Support Care Cancer. 2008 Dec 17. [Epub ahead of print]

2: Kuroi K, Shimozuma K, Ohashi Y, Takeuchi A, Aranishi T, Morita S, Ohsumi S, Watanabe T, Bain S, Hausheer FH. A questionnaire survey of physicians' perspectives regarding the assessment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients with breast cancer.

研究協力者

石濱 泰
慶応義塾大学先端生命科学研究所
准教授

廣瀬 真紀子
都立駒込病院外科

Jpn J Clin Oncol. 2008
Nov;38(11):748-54.

3: Saji S, Kuroi K.
Application of selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment according to their intrinsic nature. Breast Cancer. 2008;15(4):262-9.

4: Kuroi K, Toi M
Diagnostic and prognostic molecular markers in breast cancer
Clinical Application of Molecular Diagnosis in Cancer, Radiation Effect, and Human Diseases, 2009

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

Angiogenesis に対する negative feedback regulator である vasohibin-1 の乳腺疾患における発現の研究.

分担研究者 笹野 公伸 東北大学病理診断学 教授
研究協力者 玉城研太郎 東北大学腫瘍外科 大学院

研究要旨 angiogenesis に対する negative feedback regulator : vasohibin-1 の乳腺疾患に対する研究は今まで行われたことがなく, 本研究によって乳腺疾患における vasohibin の発現の検索, あるいは免疫組織学的染色としての vasohibin の意義, 予後規定因子としての vasohibin の意義について検討を行った.

A. 研究目的

Vasohibin-1 とは Angiogenesis に対する Negative feedback regulator である. ヒト乳腺疾患における Vasohibin-1 は今まで検索されておらず, その生物学的意義も不明である. 加えて乳腺疾患領域における vasohibin-1 の発現動態も全く検討されておらず, その臨床病理学的意義も不明である. 腫瘍の生物学的動態を検討するには新生血管を組織中で同定していくことが極めて重要になるが, 現在のところではこれらの新生血管を確実に同定できない. Vasohibin-1 の臨床生物学的動態, 予後規定因子としての可能性, あるいは新生血管を表す有効な免疫染色となるかについて検討を行った.

B. 研究方法.

東北大学乳腺内分泌外科で手術された乳腺疾患症例 138 例 (浸潤癌:98 例, 非浸潤癌:12 例, 線維腺腫 16 例, 急性炎症:6 例, 乳

腺症:9 例, 正常乳腺:7 例)を対象. 乳腺疾患における小血管全体の中で vasohibin-1 を発現している血管はどれくらいあるか? また, 各乳腺病変で vasohibin-1 の発現に何らかの差異はあるのか? In vivo で提唱されているような VEGF-A と vasohibin-1, Flk-1(VEGF receptor2)と vasohibin-1 に実際の臨床検体でも相関が認められ, VEGF-A → VEGF receptor → vasohibin-1 の angiogenesis の一連の流れを示唆する所見が認められるか否か? Vasohibin-1 は細胞増殖を伴う新生血管のうちどのくらいの割合で発現しているのか? 臨床ステージと vasohibin-1 発現の間に何らかの相関が認められるかどうか? さらに vasohibin-1 が発現と患者の乳癌の再発や予後に関係しているか, 検討を行った. 研究の方法として, 先に挙げた 138 例を CD31, vasohibin-1, VEGF-A, Flk-1, Ki-67, CD31-Ki-67 の 2 重染色, vasohibin-1-Ki-67 の 2 重染色を行い, 各群間における微小血管密度の評価を行っ

た。また vasohibin-1 の発現の相違によって臨床ステージ、予後、遠隔転移の評価を行った。

倫理面への配慮。

本研究に関係する全ての研究者は、ヘルシンキ宣言に従って本研究を実施した。文部科学省、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針を遵守し、試験の倫理性、安全性及び研究成果の科学性、信頼性を確保した。収集したデータは、データ取扱い手順書に基づき管理された。本研究は、臨床研究の倫理指針を遵守し、個人情報保護に関してもこれに従う。研究範囲内で生じる個人情報の安全管理に関する責務については、先に示した研究分担者が担う。研究使用目的の検体使用に関するインフォームドコンセントは、口頭かつ文書を用いて本人に説明し、本人からの文書による同意を得ることを原則とした。

C. 研究結果。

①CD31 (血管内皮マーカー)によって規定される微小血管密度は各群間で差は認められなかった。

②vasohibin-1 によって染色された血管の微小血管密度は浸潤癌、急性炎症で密度が高く、非浸潤癌、線維腺腫、乳腺症、正常乳腺で低かった。統計学的にも有意差を認めた ($P<0.001$)。vasohibin-1 陽性率 (vasohibin-1/CD31)も浸潤癌、急性炎症で有意に高かった ($P<0.001$)。また200倍視野10視野における組織型別 vasohibin-1 陽性平均血管数も浸潤癌、急性炎症で有意に密度が高かった ($P<0.001$)。 (Fig.1, Fig.2)

③ VEGF-A と vasohibin-1, Flk-1 と vasohibin-1 の発現を解析したところ、い

ずれの群間にも正の相関が認められた ($P<0.001$)。 (Fig.3)。

④CD31 と Ki-67, vasohibin-1 と Ki-67 の2重染色による検討では、CD31 陽性血管における Ki-67 陽性率が 23.5%(12.7-37.5%)であった一方で、vasohibin-1 陽性血管における Ki-67 陽性率は 46.5%(33.3-62.5%)であった。

⑤UICC, Sixth Edition, 2002, BREAST TUMOURS (ICD-O C50) Stage Grouping に基づく Stage 別の vasohibin-1 発現の検討では Stage0 と他の Stage 間には差が認められたが ($P<0.001$)、浸潤癌における vasohibin-1 の発現 (Stage I+Stage IV) において vasohibin-1 発現に差は認められなかった。

⑥ Nottingham histological grade と vasohibin-1 発現の検討を行ったところ、vasohibin-1 発現の平均は grade I では 18.4 ± 7.5 , grade II では 20.8 ± 7.0 , grade III では 28.0 ± 8.0 であった。統計学的には grade III と他の grade で有意差を認めた (grade I vs grade III : $P<0.001$, grade II vs grade III : $P=0.007$)。

⑦ vasohibin-1 の発現と予後の検討では vasohibin-1 陽性微小血管密度 0-20 と 21 以上で区別した場合、10年生存率が 0-20 では 0.932203, 一方 21 以上では 0.72549 であった ($P<0.001$)。vasohibin-1 と遠隔転移の検討では 10年で 0-20 で 0.927356, 21 以上で 0.708333 であった ($P<0.001$)。 (Fig.4)

D. 考察。

本研究は初めてヒト乳癌における vasohibin-1 の発現動態を検討した研究報告である。一般的に血管新生において

VEGF-A が発現誘導され、VEGF receptor2(Flk-1)を介して血管新生が行われていることが知られている。Vasohibin-1 の発現調節はVEGF-AやbFGF刺激後そのシグナル伝達経路の下流のプロテインキナーゼ C(PKC δ)を介して行われていることが証明されており、また子宮内膜癌において VEGF receptor2(Flk-1)と vasohibin-1 発現に相関を認められることが証明されている。Vasohibin-1 は浸潤癌及び急性炎症において有意に発現することが確認されたが、乳癌においての血管新生は癌細胞が乳腺間質へ浸潤することによる炎症反応で angiogenesis が惹起され、そのいわばブレーキにあたる anti-angiogenic regulator である vasohibin-1 の発現もこの時期に認められた。このことは vasohibin-1 発現と血管新生を生じさせる VEGF-A と Flk-1 発現に相関を認めるということで証明された。Vasohibin-1 発現と臨床病態との関係は、vasohibin-1 発現血管数が 21 個以上と 20 個以下で OS および DFS で有意差を認め、vasohibin-1 発現が予後や遠隔転移を規定する因子となることがわかった。Vasohibin-1 と Ki-67 の 2 重染色および CD31 と Ki-67 の 2 重染色の結果、前者の方が Ki-67 陽性率が有意に高かったことから、血管内皮細胞の増殖と vasohibin-1 の関係がヒト乳癌組織において科学的、客観的に初めて示せたことになる。病理組織学的に angiogenesis を評価する方法として今までは微小血管密度が一般的であった。本研究において、CD31 の免疫染色で評価される微小血管密度が、線維腺腫や非浸潤癌と浸潤癌や急性炎症との間に有意差が認められない一方で、vasohibin-1 では浸潤癌、

急性炎症で有意に発現を認めることより、vasohibin-1 陽性血管が angiogenesis の指標となりうることが示唆された。

E. 結論.

①vasohibin-1 の発現は浸潤癌や急性炎症で有意に認められた。

② vasohibin-1 の免疫組織染色は、angiogenesis の指標となる可能性が示唆された。

③vasohibin-1 の発現は予後規定因子、遠隔転移を規定する因子となりうることを証明された。

F. 健康危険情報.

特になし

G. 研究発表.

1. 論文発表.

Tamaki K, Sasano H, et al (total 8, first and last). Vasohibin-1 in human breast carcinoma: A potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Science*, 2009 Jan;100(1):88-94.

2. 学会発表.

Intracrinology of sex-steroids in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast :comparison to invasive

Ductal carcinoma (IDC) and non-neoplastic breast

H Sasano, Y Miki, R Shibuya, I Suzuki
18th International symposium of the journal of steroid Biochemistry and molecular Biology 18-21 september, Austria 2008

乳癌における 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2 の機能に関する検討
長崎修治、鈴木貴、三木康宏、赤平純一、
笹野公伸 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008.10.28-30

玉城研太郎、笹野公伸 他 新しい血管新生抑制因子(vasohibin)の乳腺疾患における検討と乳癌標的治療への展望。日本乳癌学会総会(大阪).2008.9.26-27.

玉城研太郎、笹野公伸 他 新しい血管新生抑制因子(vasohibin)の乳腺疾患における検討と乳癌標的治療への展望。東北がん分子標的治療研究会(仙台).2008.11.21.

H. 知的財産権の出願・登録状況。
特に予定なし。

Fig.1 vasohibin-1 の免疫染色。 A,B:浸潤癌, C:非浸潤癌

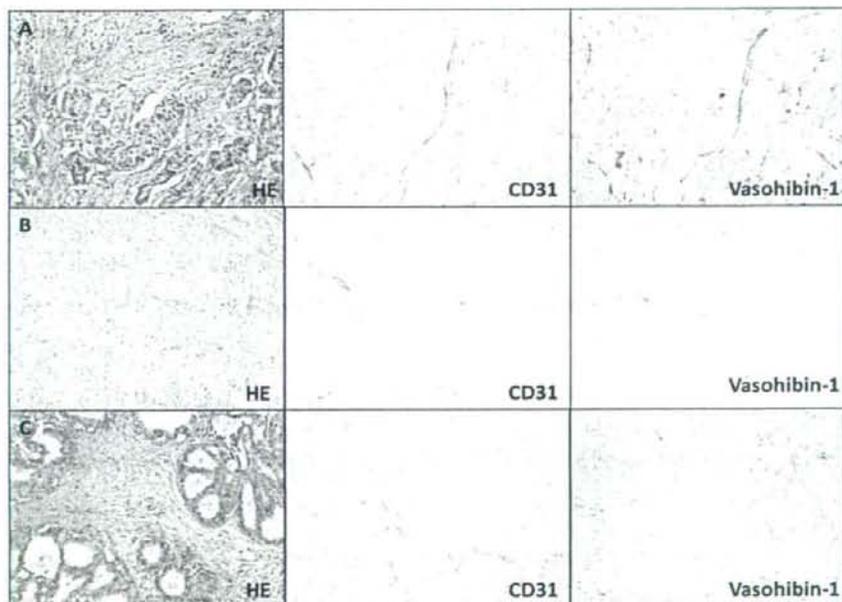


Fig.2 A:vasohibin-1 で染色された微小血管密度. B:vasohibin-1/CD31 で規定される vasohibin-1 陽性率. C:200 倍 10 視野における平均微小血管密度.

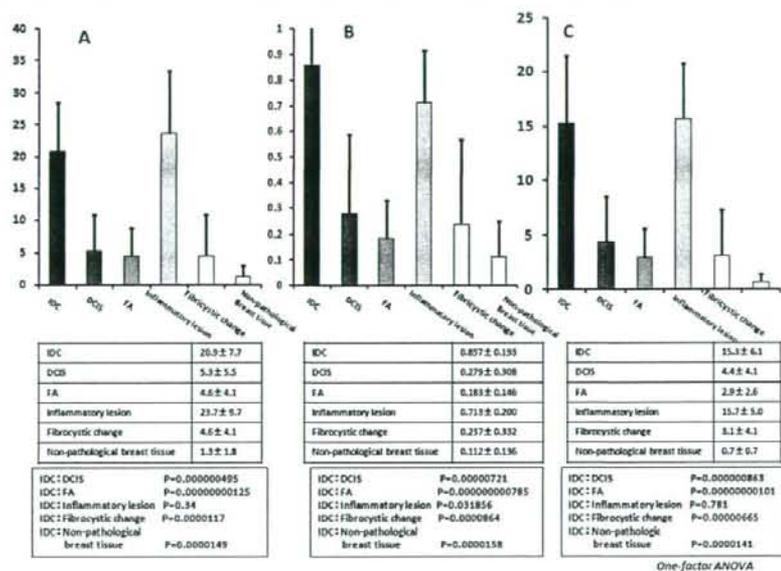


Fig.3 vasohibin-1 と VEGF-A, Flk-1 との相関関係

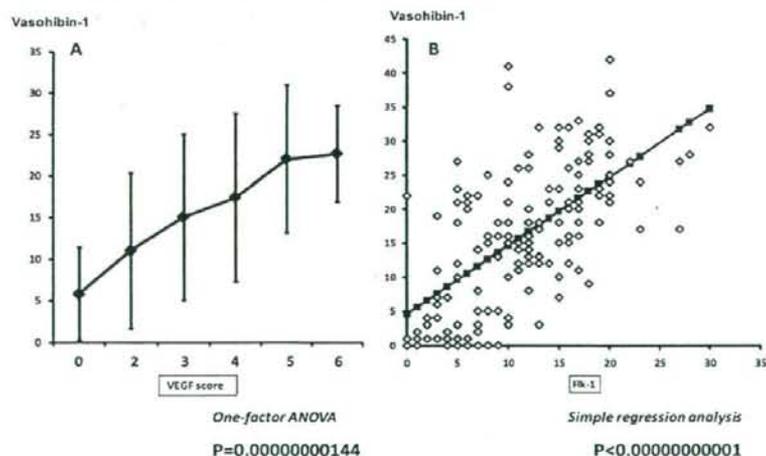
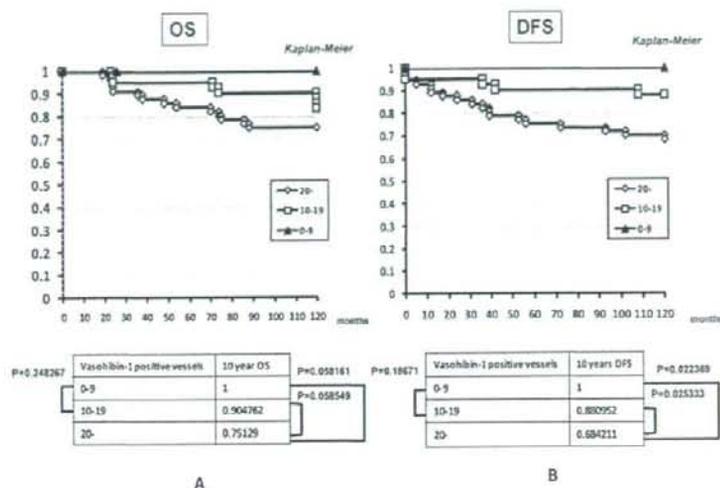


Fig.4 vasohibin-1 の発現と OS, DFS.



参考文献

1. Folkman J. Angiogenesis in cancers, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
2. Sato Y, Sonoda H. The Vasohibin Family: A negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 37-41.
3. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest.* 2004; 114: 898-907.
4. Shimizu K, Watanabe K, Yamashita H,

- et al. Gene regulation of novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 327: 700-706.
5. Kerbel RS. Vasohibin: the feedback on a new inhibitor of angiogenesis. *J. Clin Invest.* 2004; 114: 884-886.
6. Sonoda H, Ohta H, Watanabe K et al. Multiple processing forms and their biological activities of a novel angiogenesis inhibitor vasohibin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342: 640-646.
7. Abe M, Sato Y. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein

- endothelial cells. *Angiogenesis*. 2001;4:289-298.
8. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004; 25: 581-611.
 9. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci* 2008; 99: 914-919.
 10. Weidner N, Semple JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
 11. Weidner N, Folkman J, Pozza F et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887.
 12. Silverstein MJ. Prognostic classification of breast ductal carcinoma in situ. *Lancet* 1995; 345: 1154-1157.
 13. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a larger study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
 14. Yamashita H, Abe M, Watanabe K et al. Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345: 919-925.
 15. Nijsten T, Copaert C.G, Vermeulen P.B et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 36 cases. *Br J Dermatol* 2004; 151: 837-845.
 16. Hoskin P.J, Sibtain A, Daley F.M et al. The immunohistochemical assessment of hypoxia, vascularity and proliferation in bladder carcinoma. *Radiother Oncol* 2004; 72: 159-168.
 17. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M et al. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*. 2004; 64: 2941-2955.
 18. Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1997; 80: 1945-1953.
 19. Cao Y, Paner GP, Kahn LB et al. Non-invasive carcinoma of the breast: angiogenesis and cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128: 893-896.
 20. Aas T, Borresen AL, Geisler S et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 811-814.
 21. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn.J.Cancer Res*. 1994; 85: 1045-1049.

22. Begum S, Zhang Y, Shintani T et al. Immunohistochemical expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) as an angiogenic factor in head and neck tumorigenesis. *Oncol Rep.* 2007 Mar;17(3):591-6.
23. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine*, 2003; 3: 643-651.
24. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-674.
25. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9: 653-660.
26. Lord B.I. Feedback regulators in normal and tumor tissues. *J. Cell Sci. Suppl.* 1988; 10: 231-242.
27. Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H et al. Isolation of vasohibin-2 as a sole homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin: a comparative study on their expressions. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1051-1057.
28. Shen JK, Yang XR, Sato Y et al. Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppress VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *FASEB J.* 2006; 20: 723-725.
29. Lichtenbeld HC, Barendsz-Janson AF, ven Essen H et al. Angiogenic potential of malignant and non-malignant human breast tissue in an *in vivo* angiogenesis model. *International Journal of Cancer* 1998; 77: 455-459.
30. Dabrosin C, Palmer K, Muller WJ et al. Estradiol promotes growth and angiogenesis in polyoma middle T transgenic mouse mammary tumor explants. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 1-6.
31. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 22: 609-614.
32. Sledge GW Jr. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 2002; 29(suppl 11): 104-110.
33. Linderholm B, Lindh B, Beckman L et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and associations to first metastasis site in 1307 patients with primary breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 4a.
34. Rugo HS. Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data. *The Oncologist* 2004; 9(suppl 1): 43-49.
35. Fox SB, Generail DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 216 (doi:10.1186/bcr1796).
36. Miller KD, Chap LI, Holmes FA et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 792-799.
37. Wedam SB, Low JA, Yang SX et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with

inflammatory and locally advanced
breast cancer. J Clin Oncol 2006; 24:
769-777

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

乳癌の集学的治療アルゴリズム構築のための症例の個別化には、より高精度なホルモン療法奏効性予測のための、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。本年度は特に臨床への導入が容易なパラフィン包埋標本を対象として RT-PCR 法でエストロゲン応答性候補遺伝子を解析することを試みた。また、ERE-GFP レポーター遺伝子を用いて臨床検体の ER 活性を解析する手法の開発研究も継続している。

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、化学療法と並んでホルモン療法（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。原発性乳癌のおよそ 3 分の 2 以上の症例がエストロゲン受容体

（ER）を発現している ER 陽性乳癌であり、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 陽性乳癌を対象に術後の補助療法として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ことも知られている。

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、さらに実際に臨床で使用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

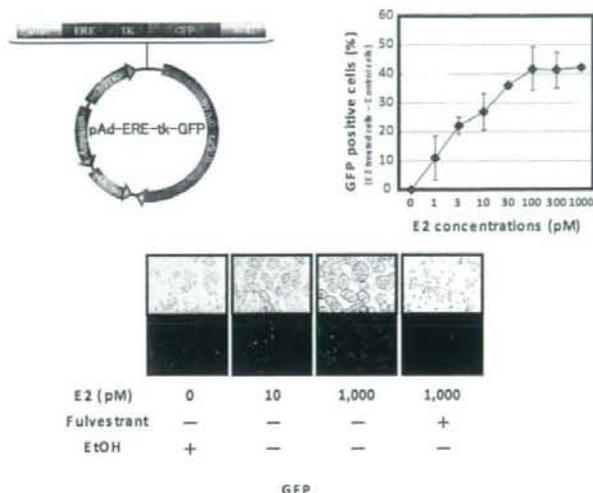
- 1) これまで網羅的マイクロアレイ解析によって抽出・同定した乳癌細胞のエストロゲン応答遺伝子約 200 個を搭載したガラススライド型マイクロアレイチップを作成し、それを用いて様々な乳癌培養細胞や乳癌手術検体を用いた解析を行い、ホルモン療法の反応性予測や乳癌の予後予測に有用な遺伝子を絞り込んできた。その中から代表例として HDAC6、IGFBP4、EGR3 などの遺伝子を取り上げ、免疫染色法や RT-PCR 法解析によって乳癌手術検体の解析を行い、臨床病理学的因子との相関を検討し、これらが乳癌の予後、特に Tamoxifen 治療群の予後と相関することを明らかにした。さらに昨年、これらの候補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

- 2) そこで本年度は、より臨床応用の点で実用的な定量的 RT-PCR 法を用いて、候補遺伝子の発現状況を、特にパラフィン包埋標品を対象に解析する方法を確立する。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より合致する発現を示すマーカーが見出せれば、従来の免疫染色法による解析も行なうことを視野に入れて進める。
- 3) さらに、ERE-GFP 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 ERE 活性をアッセイすることによって、ER の活性を指標とする診断法が可能かどうかを検証する。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。

図1 ERE-GFPアデノウイルスベクターを用いたER転写活性の測定
MCF-7細胞に感染させてその定量性を確認した。



C. 研究結果

これまでマイクロアレイを駆使し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。中でもHDAC6、IGFBP4、EGR3などの遺伝子は、免疫染色法やRT-PCR法解析による乳癌手術検体の解析から、臨床病理学的因子と相関し、特にタモキシフェン治療群の予後と相関することを明らかにした。

さらに昨年、候補遺伝子をチップに搭載した3次元型マイクロアレイ解析装置を用いた解析を行い、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と低発現群の2群に明瞭に分けられること、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、完全には一致しないこと、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。

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、今回、HDAC6、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、PgRなどのエストロゲン応答遺伝子と既知の予後因子、MIB-1、Her2、Bcl-2、ERをReal-time PCR法を用いて定量的解析を試みた。また、

臨床で入手しやすい手術検体のパラフィン包埋切片よりなるべく状態の良いRNAの抽出を試みた。その結果、十分な量的PCR解析に耐えうる精度のRNAが得られることが確認された。また、エストロゲン応答遺伝子の発現は後述のアデノウイルスERE-GFPアッセイで測定したERの活性と相関を示し、中には免疫染色においてER陰性と判定された症例において発現が見られるものも観察された。ER陽性群はER応答遺伝子によってやはり2群に分類され、これらの予後との関係が興味深い。今後、厳密なバリデーション研究を行なう必要がある。

また、昨年アデノウイルスに構築し

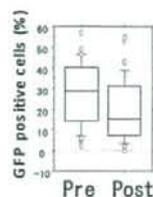
たERE-GFPレポーターを67例の原発乳癌症例に導入してERの転写活性を解析したところ、ERの免疫染色による発現の解析結果と傾向は示すものの有意な相関ではなく、むしろPgRの発現と相関することが明らかとなった。このことから臨床検体のERの活性を評価することは新たなホルモン療法の反応性の指標となる可能性が考えられる。現在、これら62例のER応答遺伝子群の発現を解析中であり、乳癌臨床検体におけるERタンパクの発現とER転写活性とER標的遺伝子の発現の関係を明らかにしたい。

図2 原発乳癌62症例の臨床病理学的諸因子とER活性(GFP陽性率)と相関

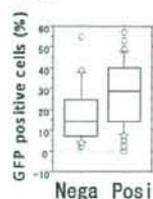
	n	P Value		n	P Value		n	P Value
Total	62		ER			Grade (NA)		
Age			negative	13	0.1427*	2	30	0.2952*
<50	27		positive	46		3	19	
≥50	35	0.1366*	unknown	3		unknown	11	
Menopausal			PgR			Grade (NM)		
pre	28		negative	17	0.0483**	1	9	
post	33	0.0188**	positive	46		2	9	0.1862**
No (men)	1		unknown	3		3	32	
						unknown	12	
Size			Her2			Grade (NG)		
<2 cm	27		negative	31	0.1115*	1	7	
≥2 cm	30	0.6129*	positive	23		2	9	0.5350**
unknown	5		unknown	8		3	33	
						unknown	13	
Stage			V			Ly		
0	3		-	53	0.9626*	0	30	
1	13		+	4		1	21	0.6525**
2	33	0.7199**	unknown	5		2	3	
3	5					3	3	
unknown	8					unknown	5	

*Mann-Whitney test, **Kruskal-wallis test

Menopausal



PgR



D. 考察

乳癌の治療の中でホルモン療法の占める位置は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、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。昨年度は 3 次元型アレイチップを用いて約 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指標である 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。一方、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。

そこで、現状ではマイクロアレイよりも実用化しやすい PCR 法を基本とした検査法による診断キット化を目指し、前述のようにエストロゲン応答遺伝子群をパラフィン包埋検体を対象に Real-time PCR 法で解析した。

その結果、十分定量的 PCR 解析に耐えうる精度の RNA が得られることが確認された。このことは今後の臨床検体を使った研究が非常に実行しやすくなると同時に、次の段階として、綿密なバリデーション研究の必要性を強く感じるものとなった。また、ウイルスによる ERE-GFP アッセイが可能になり、臨床検体の ER 活性が測定できるようになったことによって、ER の発現と ER の活性を個々の症例において直接比較検討することができるようになった。このように臨床検体の ER の活性を評価することは ER の発現を免疫染色で判定することとは異なった視点から新たなホルモン療法の反応性の指標となる可能性が考えられる。

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

ン慮法の奏効性予測に有用かもしれないバイオマーカー候補のパラフィン標品からのRT-PCR法を用いた検出、定量的解析を行い、より実用的なホルモン療法応答性予測診断法として利用できる可能性を示した。アデノウイルス ERE-GFP アッセイによって個々の症例の ER の転写活性を解析できることが示され、ホルモン療法反応性を評価する新たな診断指標となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.*, 99, 1125-1130, 2008.
2. 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*, 15, 451-463, 2008.
3. 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.*, 99, 267-271, 2008.

4. Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109, 201-206, 2008.
5. Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi SI, Kondo T, Sasano H. Intratumoral Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 14, 4417-4426, 2008.
6. Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, Hayashi S, Nakachi K, Eguchi H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630, 19-34, 2008.
7. Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15, 256-261, 2008.
8. Hayashi, S., Yamaguchi, Y.

- Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, in press, 2009.
9. Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosuni, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.*, in press, 2009.
 10. Azuma K, Urano T, Horie K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, Inoue S. Association of Estrogen Receptor α and Histone Deacetylase 6 Causes Rapid Deacetylation of Tubulin in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* in press, 2009.
 11. 林 慎一：ホルモン依存性増殖の分子機構。「みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床」(戸井雅和編) in press, 2009.
2. 学会・研究会発表
1. 林 慎一：アロマターゼ阻害剤耐性乳癌の治療戦略をそのメカニズムから考える。第44回東海乳腺疾患懇話会(名古屋) 2008
 2. 林 慎一：アロマターゼ阻害剤の奏功性予測について。Breast Cancer Round Meeting (仙台) 2008
 3. 林 慎一：乳癌の mRNA 解析-その実体と問題点、今後の展望。シンポジウム「乳癌の内分泌療法の効果予測因子の手術/生検検体を用いた検索の実際」第20回日本内分泌外科学会総会(仙台) 2008
 4. 林 慎一：ホルモン依存性喪失癌。シンポジウム「ホルモン依存性喪失癌」第9回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008
 5. 林 慎一：特別講演。蛍光タンパクを用いたレポーター細胞による乳癌・子宮癌の診断を目指して- ER 転写活性のイメージングとその臨床応用。第18回日本サイトメトリー学会学術集会(東京) 2008
 6. 林 慎一：特別講演。ERE-GFPを用いたエストロゲンシグナル解析による乳癌の個別化。第18回乳癌基礎研究会(福島) 2008
 7. Shin-ichi Hayashi : Estrogen signaling and response to hormonal therapy. Symposium: Hormonal Carcinogenesis and Hormonal Therapy. 2nd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Breast Cancer Research (淡路) 2008
 8. 林 慎一：エストロゲン受容体研究のトランスレーショナルリサーチ。シンポジウム。第7回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会(名古屋) 2008
 9. Shin-ichi Hayashi : Estrogen signaling in breast cancer