

B-IV Laser capture microdissection (LCM) / real-time PCR for aromatase

非腫瘍性乳腺組織7件、DCIS8件、IDC9件をLCM / real-time PCRで解析した。LCMはLaser Scissors CRI-337 (Cell Robotics Inc, Albuquerque, NM, USA)を用いて行い、乳腺凍結組織片から癌細胞ないし腫瘍内間質細胞をそれぞれ約5000個ずつ採取した。Real-time PCRは上記IIIと同様に行った。

B-V 免疫組織化学

抗体の情報は、STS, 17βHSD1, 17βHSD5, 5αRed1, 5αRed2に関しては表2にまとめてある。他のモノクローナル抗体に関しては、市販抗体ERα (ER1D5) (Immunotech (Marseille, France)), PR (MAB429) (Chemicon (Temecula, CA, USA)), AR (AR441) (DAKO (Carpinteria, CA, USA)), Ki-67 (MIB1) (DAKO (Carpinteria, CA, USA))を使用し、Histofine Kit (streptavidin-biotin増幅法 (Nichirei, Tokyo, Japan))にて免疫染色を行った。ERα, PR, AR, Ki-67の抗原賦活化には、クエン酸緩衝液を用いてオートクレーブで120℃5分の熱処理を行った。希釈倍率はそれぞれ以下の通りである。[aromatase; 1/6000, STS; 1/9000, 17βHSD1; 1/500, 17βHSD5; 1/1000, 5αRed1; 1/1000, 5αRed2; 1/1000, ERα; 1/50, PR; 1/30, AR; 1/100, Ki-67; 1/50]

抗原-抗体複合体の発色には3,3'-diaminobenzidine (DAB)溶液(1mM DAB, 50mM Tris-HCl buffer (pH7.6), 0.006% H₂O₂)を使用した。

ステロイド産生酵素は細胞質に検出されるため、10%以上の癌細胞に認められるものを陽性とした。ERα, PR, AR, Ki-67は核に検出され、labeling index (LI; 陽性細胞の割合(%))で評価した。

B-VI 統計解析

2グループ間の解析にはMann-Whitney' s U testを使用し、P-values 0.05未満で有意差ありとした。2グループ間のrelative ratioはそれぞれの中央値で評価した。生存曲線はKaplan-Meier法にて作成し、log-rank testにて統計学的評価を行った。

C. 研究結果

C-I 性ステロイドのDCIS腫瘍内濃度(LC-MS/MS)

Estradiol濃度の中央値(min-max)は、非腫瘍性乳腺組織で16(5-83)pg/g, DCISで52(10-494)pg/g, IDCで206(11-1586)pg/gであり、DCIS症例が非腫瘍組織より3.3倍有意に高値(P=0.048)であった(図2A参照)。IDCではDCISの中央値の4.0倍高かったが、統計学的に有意差は認められなかった(P=0.20)。

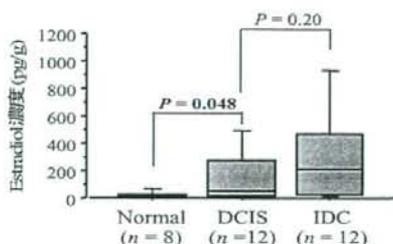
DHT濃度の中央値(min-max)は、非腫瘍組織で100(63-128)pg/g, DCISで323(140-1593)pg/g, IDCで162(41-990)pg/gであり、DCISにて非腫瘍組織(P=0.03, 3.2倍)およびIDC(P=0.04, 2.0倍)よりも有意に高値を示した(図2B参照)。

EstradiolのDCIS腫瘍内濃度は、閉経前(93(10-494)pg/g (n=5))にて閉経後(42(13-70)pg/g (n=7))の2.2倍高値であったが、有意差は認められなかった(P=0.46)。また、DCIS症例での組織内DHT濃度も閉経前260(253-380)pg/gと閉経後326(140-1593)pg/gとで有意差

は認められなかった(P=0.52)。

図2.

A



B

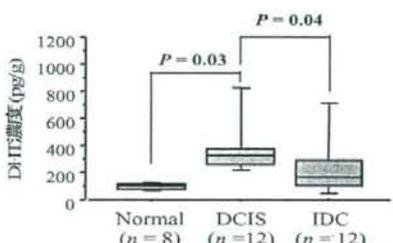


図2. 非腫瘍性乳腺組織(normal)、DCIS、IDCにおけるestradiol(A)およびDHT(B)濃度。灰色のボックスが25-75%を示しており、ボックス内の線は中央値、ボックス上下の線は、それぞれ90%と10%を示している。DCIS、IDC間の統計解析はMann-Whitney' s U testで行い、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

C-II DCISの性ステロイド産生酵素のmRNA発現の検討

表3に結果をまとめてあるが、aromatase(P=0.03, 4.0倍), STS(P=0.01, 9.5倍); 17βHSD1(P=0.04), 17βHSD5(P=0.01, 18倍), 5αRed1(P=0.02, 5.1倍)のmRNA発現量は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISの方ですべて有意に高い値を示した(括弧内の倍数は非腫瘍性乳腺組織よりもDCIS症例が何倍高いかを示している)。5αRed2のmRNAレベルは少量であり、DCISと非腫瘍組織間で有意差は認められなかった(P=0.67)。AromataseのmRNA発現量はDCISよりもIDC症例で有意に高値を示した(P=0.046, 5.9倍)が、他の性ステロイド合成酵素の発現量はDCISとIDC症例との間で有意差はみられなかった。

ヒト乳癌組織中には癌細胞の他に種々の割合で間質細胞が混在しており、Aromataseはヒト乳癌組織内の癌細胞と間質細胞とに局在しているため²¹⁾、LCM / real-time PCRを用いて各々の細胞分画のaromatase mRNA発現を検索した。図3Aにて示すように、上皮細胞成分におけるaromatase mRNA中央値(min-max)は、非腫瘍性乳腺組織では0.00(0.00-0.30)×10⁻³%, DCISの癌細胞では0.06(0.00-0.29)×10⁻³%, IDCの癌細胞では1.00(0.01-3.00)×10⁻³%であり、IDCの方が非腫瘍組

織(P=0.01)およびDCIS(P=0.03)よりも有意に高値を示す aromatase mRNAは、非腫瘍組織で0.00(0.00-0.04) × 10⁻²%、DCISで0.04(0.00-0.10) × 10⁻²%、IDCでは4.00(1.00-6.23) × 10⁻²%であり、上皮細胞成分同様にIDCの方が非腫瘍組織(P=0.001)およびDCIS(P=0.001)よりも有意に高値であった。なお、aromatase以外の性ス

テロイド合成酵素は癌細胞に局限して発現しているため¹⁵⁾、癌細胞と間質細胞を分けての評価は行わなかった。

表3. 非腫瘍性乳腺組織, DCIS, IDCにおける性ステロイドmRNA発現

酵素	mRNA発現レベル(中央値 (min - max)) (%)			P value	
	Normal (n = 8)	DCIS (n = 12)	IDC (n = 12)	DCIS vs. Normal	DCIS vs. IDC
エストロゲン産生酵素					
Aromatase	3.5 (0.0 - 8.0)	14.1 (1.5 - 113.3)	82.5 (0.0 - 528.5)	0.03	0.046
STS	0.4 (0.0 - 1.5)	3.8 (0.0 - 93.1)	13.6 (0.3 - 241.3)	0.01	0.13
17 HSD1	0.0 (0.0 - 0.5)	0.6 (0.0 - 4.0)	1.5 (0.0 - 3.9)	0.04	0.07
アンドロゲン産生酵素					
17 HSD5	0.6 (0.0 - 3.1)	10.8 (1.0 - 57.3)	10.9 (0.0 - 39.6)	0.01	0.91
5 Red1	11.5 (0.0 - 19.8)	58.6 (3.0 - 223.6)	34.2 (0.0 - 438.4)	0.02	0.60
5 Red2	0.0 (0.0 - 15.9)	0.2 (0.0 - 49.0)	0.2 (0.0 - 58.8)	0.67	0.83

Normal; 非腫瘍性乳腺組織

2グループ間の統計解析はMann-Whitney's U test で行い、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

ステロイド産生酵素のmRNA レベルはRPL13A の割合(%)と同様にまとめた。

図3.

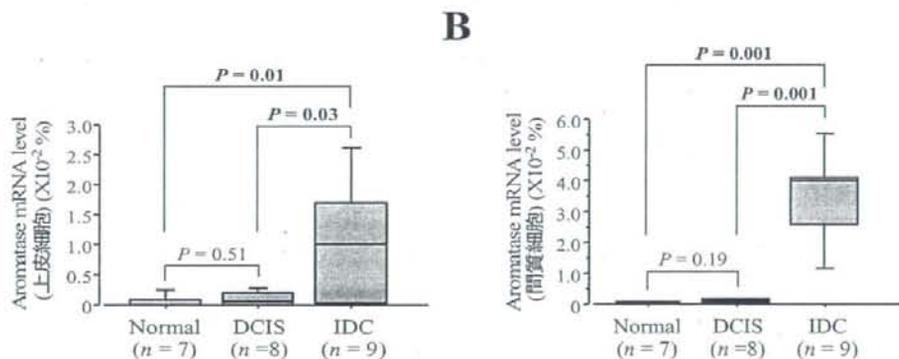


図3. 非腫瘍性乳腺組織(normal)、DCIS、IDCにおけるaromatase mRNA発現。上皮細胞(A)、間質細胞(B)。normal組織における上皮細胞と間質細胞、DCISおよびIDCにおける癌細胞と腫瘍内間質細胞は、いずれもLOMによって別々に集めた。2グループ間の統計解析はいずれもMann-Whitney's U testで行い、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

C-III DCISにおける性ステロイド産生酵素の免疫組織化学

Aromataseの癌細胞胞体における陽性所見はDCIS83件中45件に認められ(54%)、いくつかの腫瘍内間質細胞でもaromatase蛋白が検出された(図4A, 4B)。他の性ステロイド合成酵素はいずれも癌細胞でのみ検出され、陽性検体数と陽性率は以下の通りであった(図4C-4F)。[STS:45/83(54%), 17βHSD1:54/83(65%), 17βHSD5:59/83(71%), 5αRed1:52/83(63%), 5αRed2:13/83(16%)]

図4.

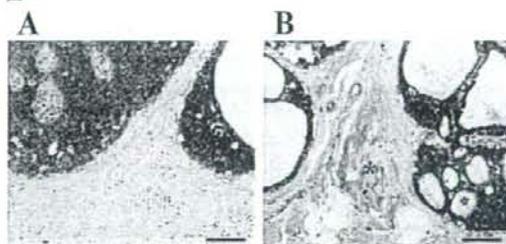


図4.

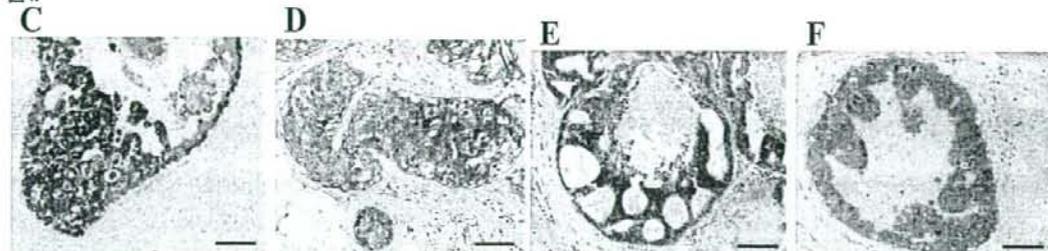


図4. DCISにおけるaromatase (A, B), STS (C), 17βHSD1 (D), 17βHSD5 (E), 5αRed1 (F)の免疫染色。Aromataseの免疫反応性は主として癌細胞の細胞質に認められる (A)が、腫瘍内間質細胞の一部にも陽性となる(*) (B)。STS, 17βHSD1, 17βHSD5, 5αRed1の免疫反応性は癌細胞の細胞質に認められる。Bar = 100 μm.

性ステロイド産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的因子との相関を表4および表5にまとめている。エストロゲン産生酵素の中では、STSがthe Van Nuys classificationと有意な相関を示したが (P=0.01)が、aromataseおよび17βHSD1には臨床病理学的因子との間に有意な相関は認められなかった(表4)。アンドロゲン産生酵素では、5αRed1はthe Van Nuys classification

(P=0.001)およびKi-67LI(P=0.02)と正相関を示す一方で、17βHSD5には臨床病理学的パラメータとの間に有意な相関は認められなかった(表5)。また、5αRed2陽性所見と臨床病理学的因子との間に有意な相関関係は認められなかった。なおDCISにおいて、これら5つの酵素の発現動態間に有意な相関関係は認められなかった。

表4. DCIS83件におけるエストロゲン産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的パラメータとの関係

Value	Aromatase免疫反応性		P value	STS免疫反応性		P value	17 HSD1 免疫反応性		P value
	+(n=45)	-(n=38)		+(n=45)	-(n=38)		+(n=54)	-(n=29)	
年齢* (年)	60 (34-80)	56 (30-77)	0.37	54 (34-77)	61 (30-80)	0.43	57 (30-80)	61 (34-77)	0.70
閉経									
閉経前	13 (16%)	14 (17%)		16 (19%)	11 (13%)		14 (17%)	13 (16%)	
閉経後	32 (39%)	24 (29%)	0.59	29 (35%)	27 (33%)	0.68	40 (48%)	16 (19%)	0.08
Van Nuys classification									
Group 1	14 (17%)	13 (16%)		8 (10%)	19 (23%)		17 (20%)	10 (12%)	
Group 2	21 (25%)	19 (23%)		25 (30%)	15 (18%)		26 (31%)	14 (17%)	
Group 3	10 (12%)	6 (7%)	0.75	12 (14%)	4 (5%)	0.01	11 (13%)	5 (6%)	0.93
ER LI*	69 (0-97)	82 (0-97)	0.20	67 (0-96)	80 (0-97)	0.13	78 (0-97)	66 (4-94)	0.13
PR LI*	52 (0-92)	33 (0-91)	0.12	33 (6-92)	47 (0-93)	0.63	38 (0-93)	31 (0-92)	0.60
AR LI*	56 (0-97)	55 (5-94)	0.54	53 (0-93)	59 (4-97)	0.39	56 (2-97)	55 (0-93)	0.86
Ki-67 LI*	16 (2-35)	13 (2-35)	0.22	17 (2-35)	12 (2-32)	0.23	13 (2-35)	17 (3-33)	0.45

*; LI 中央値(min-max(%))をMann-Whitney's U test にて解析。

表5. DCIS83件におけるアンドロゲン産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的パラメータとの関係

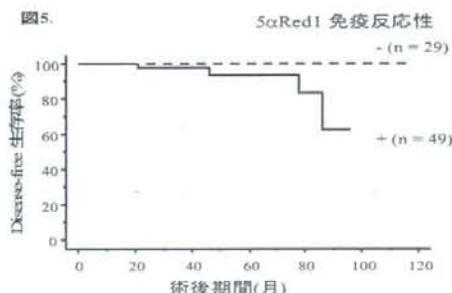
Value	17 HSD5免疫反応性		P value	5 Red1免疫反応性		P value
	+(n=59)	-(n=24)		+(n=52)	-(n=31)	
年齢* (年)	53 (30-80)	61 (42-69)	0.19	55 (30-80)	61 (39-77)	0.43
閉経						
閉経前	23 (28%)	5 (6%)	0.18	19 (23%)	8 (10%)	0.44
閉経後	36 (43%)	19 (23%)		33 (40%)	23 (28%)	
Van Nuys classification						
Group 1	20 (24%)	7 (8%)	0.43	11 (13%)	16 (19%)	0.001
Group 2	26 (3%)	14 (17%)		26 (31%)	14 (17%)	
Group 3	13 (16%)	3 (4%)		15 (18%)	1 (1%)	
ER LI*	71 (0-97)	87 (0-94)	0.12	73 (0-97)	79 (0-97)	0.48
PR LI*	53 (0-92)	57 (12-87)	0.96	32 (0-92)	43 (0-93)	0.14
AR LI*	73 (16-97)	83 (0-93)	0.10	54 (2-93)	62 (0-97)	0.12
Ki-67 LI*	20 (2-35)	13 (7-24)	0.07	18 (3-35)	11 (2-32)	0.02

*; LI中央値(min-max(%))をMann-Whitney's U testにて解析。

いずれの項目もカイ2乗検定で評価し、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

図5に示すように、78件のDCIS症例における検討にて、5 α Red1の免疫活性は再発リスクの上昇と相関していた(5 α Red1陰性乳癌症例では再発がなかったため、P valueは得られなかった)。一方で、他のステロイド産生酵素の免疫反応性と再発リスクとの間には有意な相関は認められなかった。

図5. DCIS症例(78件)における5 α Red1の免疫活性とdisease-free生存曲線との関係(Kaplan-Meier法)



D. 考察

今回の検討はDCISにおける局所性ステロイド濃度を検索した初めての研究である。なおIDC症例での研究において、腫瘍から十分に離れた組織学的に「正常」な部位では腫瘍やその周辺組織に比べてエストロゲン濃度および合成酵素の発現レベルが優位に低いことが既に報告されているため¹⁾、今回の検索で用いた担癌患者から採取された非腫瘍性検体でも非腫瘍性あるいは正常乳腺組織として乳癌組織との比較検討には使用可能であると判断した。EstradiolおよびDHT組織内濃度の中央値は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISで有意に高く、またエストロゲン(aromatase, STS, 17 β HSD1)およびアンドロゲン(17 β HSD5, 5 α Red1)産生酵素のmRNAレベルは非腫瘍組織よりもDCIS症例で有意に高いという結果も認められた。Oliveiraら¹⁷⁾は70%のDCIS症例で癌細胞および間質細胞にaromataseの陽性所見を呈したと報告しており、Arigaら¹⁸⁾はDCIS症例の63%に17 β HSD1が陽性であったとも報告している。今回の研究ではaromataseは54%、17 β HSD1は65%のDCIS症例に陽性であり、上述の従来の研究報告と矛盾しない結果を示した。一方で、DCISにおけるSTS, 17 β HSD5,

5 α Red1発現に関する研究報告は今まで全くなされてはいない。今回の私の研究結果ではDCISにおけるSTS, 17 β HSD5, 5 α Red1, 5 α Red2の陽性所見はそれぞれ54%, 71%, 63%, 16%であり、これらの割合はSuzukiらの研究¹⁵⁾におけるIDCでの酵素発現と極めて類似している(それぞれ59-88%, 53%, 58%, 15%)。尚、5 α Red2発現が非常に低いことから、IDCにおける5 α Red活性は主として5 α Red1から構成されている可能性が高い¹⁾。尚、図1に示したIntracrine機構において、17 β HSD1および17 β HSD5の逆転換酵素として17 β HSD2が、STSの逆転換酵素としてestrogen sulfotransferase (EST)が知られている¹⁵⁾。これら17 β HSD2とESTはいわば性ステロイド分解酵素と位置づけられるが、このうち17 β HSD2に関してはIDC, DCISともに癌細胞での発現がほとんどみられないことが既に報告されている¹⁸⁾⁴⁾。一方ESTに関しては、癌細胞のみならず正常な乳管上皮細胞にも発現が認められ、またIDCでの研究にてESTの免疫反応性と乳癌リスクの減少とは相関するがER発現との相関はみられないと報告されており⁴⁾、癌組織中のIntracrine機構での役割には未だに検討の余地が残っている。今回の研究では、IDC同様にDCISでもestradiolおよびDHTの腫瘍内濃度が上昇しており、DCIS

においてもIDCと同じように性ステロイド産生酵素によって血中の不活性ステロイドからestradiol, DHTが局所合成されていることが示唆された。また, estradiolのDCIS腫瘍内濃度に閉経前と閉経後とで有意差が認められなかったことから、閉経後のIDCにてestradiol濃度の高値が認められたという報告¹⁴⁾と同様に、閉経後のDCISでもestradiolの局所合成が行われていると考えられた。DCISの発育はアロマターゼ阻害剤 (letrozole, anastrozoleなど)によって抑制されるとFaratianらが報告しており²²⁾、今後抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤、LH-RH agonistなどの内分泌療法が特定のDCIS患者にも臨床的に効果的となる可能性があると考えられるが、治療効果に関しては今後の更なる検討も必要と考えられた。

今回の私の研究では、DCIS症例でもaromatase mRNAは癌細胞と腫瘍内間質細胞の両方に検出され、いずれの発現レベルもDCISよりIDCで有意に高かった。従来のin vitro研究²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾にて、乳癌細胞が様々なアロマターゼ発現誘導因子 (prostaglandin E₂, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11, tumor necrosis factor α) を分泌することが報告されてきた。一方Rydeら²⁷⁾やZhangら²⁸⁾の研究により、いくつかの外因性の成長因子 (epidermal growth factor, transforming growth factor, keratinocyte growth factor)がMCF-7乳癌細胞にてアロマターゼ活性を刺激することも知られている。また、Mikiら²¹⁾はMCF-7乳癌細胞のaromatase mRNAレベルおよび酵素活性が、乳癌組織から分離された間質細胞との共同培養にて著しく上昇したと報告している。従って、DCISにおけるアロマターゼ発現も一部は腫瘍-間質間の相互作用によって調節されていることが示唆され、これらの相互作用は癌細胞の間質への浸潤によってさらに増進している可能性があると考えられる。

Recchioneら²⁹⁾やMistryら³⁰⁾が報告したようにIDCにおける腫瘍内DHTレベルはtestosteroneレベルに相関しており、testosteroneはDHT前駆物質とみなされている。図1に示すようにaromataseはandrostenedione \rightarrow estroneおよびtestosterone \rightarrow estradiolの転換をそれぞれ触媒している。Spinolaら³¹⁾は、ラットによる研究でアロマターゼ阻害剤によって腫瘍内testosterone濃度が著明に上昇すると報告しており、それに加えてSonne-HansenとLykkesfeldtのMCF-7細胞による研究³²⁾では、aromataseはtestosteroneをよりその基質として使用するという事も報告されている。更にSuzukiら³³⁾は、IDCにおけるaromatase発現は腫瘍内のDHT濃度と逆相関し、aromataseはandrostenedioneからのDHT合成を抑制すると報告している。これらの研究報告から、aromataseはヒト乳癌における局所DHT産生のnegative regulatorであることも示唆される。今回の研究では腫瘍内DHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、aromatase発現はDCISよりもIDCで有意に高くなっていた。一方アンドロゲン産生酵素の発現レベルはDCISとIDC間で有意差はみられなかった。従って、IDC症例でaromataseが顕著に発現する事によりアンドロゲンからエストロゲンへの転換が増加した結果、腫瘍内DHT濃度が減少した可能性があるという今回の研究結果からは示唆された。

いくつかのin vitro研究³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾にて、DHTは乳癌細胞の増殖を阻害することが示されている。更にKandouzらの研究³⁷⁾では、乳癌細胞でDHTがアポトーシスを

誘導すると報告されており、Dauvoisら³⁸⁾によるZR75-1細胞を注入した無胸腺マウスの研究では、DHT治療によって腫瘍量が急速に減少したと報告されている。しかしこのDHTの乳癌に対する作用に関しては多くの論議がある事も事実である。例えば、Birrellら³⁹⁾はDHTおよびmibolerone (代謝されないアンドロゲン)がMCF-7, MDA-MB-453細胞の増殖を増やすと報告しており、Zhangら⁴⁰⁾はDHT-bezonate (DHT-B)がマウスの乳管細胞の増殖を促し、その効果はestradiolより弱いにもかかわらず、estradiolとDHT-Bの両者併用療法ではそれぞれ単独で使用した時に比べて乳管と腺房の著明な過形成を呈したと報告している。私の今回の研究では、5 α Red1の発現動態がKi-67およびthe Van Nuys classificationと有意に相関しており、再発リスクの増加とも有意に相関していた。Vandesompeleら⁴¹⁾は、Ki-67抗体はG0期以外の全ての腫瘍細胞で認められ、Ki-67 LIは特にS期の細胞および核分裂指数とに密接に関連すると報告している。The Van Nuys classificationはDCISの重要な予後因子として知られており、Silversteinら¹⁹⁾はDCIS患者の乳房温存術後の再発率をGroup 1では4%、Group 2では11%、Group 3では27%と報告している。DCISにおけるER, PR発現は組織学的分化度や核グレードと逆相関すると報告されているが⁷⁾⁸⁾、DCISにおけるAR発現はERとは相関せず¹¹⁾、低分化なDCISでもかなりの割合でER-/PR-/AR+となることも報告されている⁹⁾。これらの報告や私の今回の研究結果から、DHTがDCISの発育に関与している可能性も示唆されるが、現在のところDCISにおけるアンドロゲン作用に関する情報は十分に得られておらず、今後のさらなる研究が必要と考えられた。

E. 結論

腫瘍内estradiolおよびDHT濃度は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISで有意に高く、エストロゲン産生酵素 (aromatase, STS, 17 β HSD1)およびアンドロゲン産生酵素 (17 β HSD5, 5 α Red1)はすべてDCISの多くの症例で発現していた。腫瘍内DHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、aromatase mRNA発現はIDCで有意に高かった。この事からIDCでは組織内DHTがaromataseによりエストロゲンに効率よく転換されているが、DCISではaromataseの発現程度がIDCよりも低いためにDHTの濃度が高くなっているという可能性が示唆された。このDHTのDCISにおける作用を今後更に検討していく重要性が今回の私の研究成果からは考えられた。また免疫組織化学で検討したDCISにおける5 α Red1の陽性所見は、Ki-67 LI, histological gradeおよび再発リスクの上昇と相関していた。今回の私の研究結果から、DCISでも腫瘍内でのステロイド局所合成によりestradiolおよびDHTの濃度が上昇している可能性が示された。DCISの多くの症例ではERやARを腫瘍細胞で発現しており、estradiol, DHTいずれもDCISの発育に重要な役割を果たしているのではないかと私は考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Endocrine-RelatedCancer(2008)15113-124.に掲載
予定

2. 学会発表

(1)2007/06/02~2007/06/05 海外・国際 学会

[その他] J. Akahira, T. Suzuki, F. Suzuki, I. Miura
et al.

The Expression of Estrogen beta Related
Receptors in Human Epithelia

Adenocarcinoma.

THE ENDOCRINE SOCIETY' S 89th Annual Meeting
ENDO 07.

(2)2007/06/02~2007/06/05 海外・国際 学会

[その他] T. Suzuki, Y. Miki, T. Moriya, J. A.

Akahira, T. Ishida, Y. Yamaguchi, S. Hayashi

and H. Sasano. Early Growth Responsive Gene 3

(EGR3) in Human Breast

Carcinoma.

THE ENDOCRINE SOCIETY' S 89th Annual Meeting
ENDO 07.

(3)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 赤平純一、鈴木貴、鈴木史彦、三浦伊久
美、三木

康宏、長崎修治、鴨川由紀子 and 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)

β 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。

(4)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 三木康宏、長崎修治、赤平純一、鈴木貴、
笹野公伸。

ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質Bisphenol A の
細胞増殖作用。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(5)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 新井川弘道、鈴木貴、鈴木聡、近藤丘、笹
野公伸。

肺癌における組織内Estradiol濃度とEstrogen
receptor発現の関係。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(6)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 森本玲、佐藤文俊、村上治、戸恒和人、鈴
木貴、笹

野公伸、伊藤貞嘉 and高橋和広。

副腎腫瘍におけるAdrenomedullin2/intermedin発現の
検討。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(7)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 中村恵美、鈴木貴、林 富、笹野公伸。

難治性副腎悪性腫瘍組織における標的治療因子の検索。
第80回日本内分泌学会学術総会。

(8)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 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。

(9)2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 鈴木貴、三木康宏、森谷卓也、赤平純一、
石田孝宣、山口ゆり、林慎一

and 笹野公伸。

ヒト乳癌におけるEGR3 (early growth response3)
の発現意義。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(10)2007/09/01~2007/09/01 日本国内 学会

[その他] 笹野公伸。

副腎皮質癌の病理診断の最近の進歩。

第7回日本内分泌学会四国支部学術集会。

(11)2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Osamu Dohi, Masahito Hatori, Takashi
Suzuki, Katsuhiko Ono, Masami Hosaka, and Jun-

ichi Akahira, Yasuhiro Miki,

Shunji Nagasaki, Hironobu Sasano.

Sex steroids and human osteosarcoma -Hormone
dependent cell proliferation.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer
Association.

(12)2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Jun-ichi Akahira, Takashi Suzuki,
Fumihiko Suzuki, Ikumi

Miura, Yasuhiro Miki, et al.

The expression of estrogen receptor-related
receptors in human epithelial

ovarian cancer.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer
Association.

(13)2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Kojiro Tanabe, Mitsuyo Matsumoto, Jun-
ichi

Akahira, Takashi Suzuki et al.

Expression of midkine in human endometrium and
its disorder.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer
Association Teamwork for

Effective Reduction of Cancer.

(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 12in 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, Hytioglou 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

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 : $P=0.007$)。

⑦vasohibin-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事が証明された。

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 type12 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

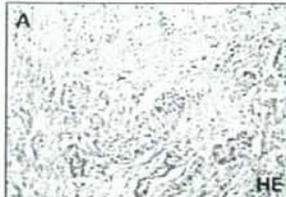
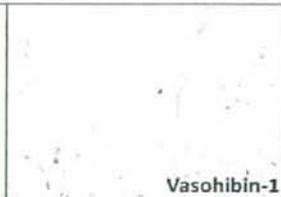
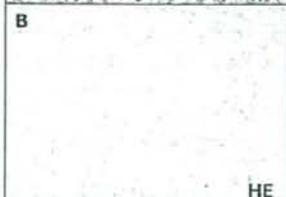
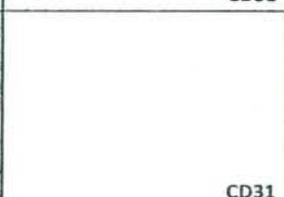
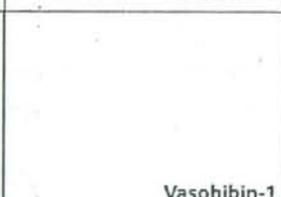
 <p>A HE</p>	 <p>CD31</p>	 <p>Vasohibin-1</p>
 <p>B HE</p>	 <p>CD31</p>	 <p>Vasohibin-1</p>
 <p>C HE</p>	 <p>CD31</p>	 <p>Vasohibin-1</p>

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 vsohibin-1 陽性率, C:200 倍 10 視野における平均微小血管密度.

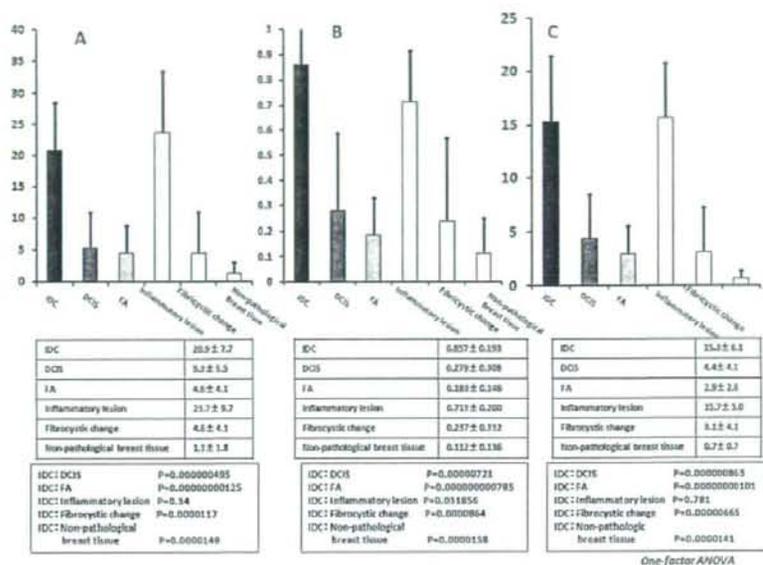


Fig.3 vasohibin-1 と VEGF-A, Flk-1 との相関関係

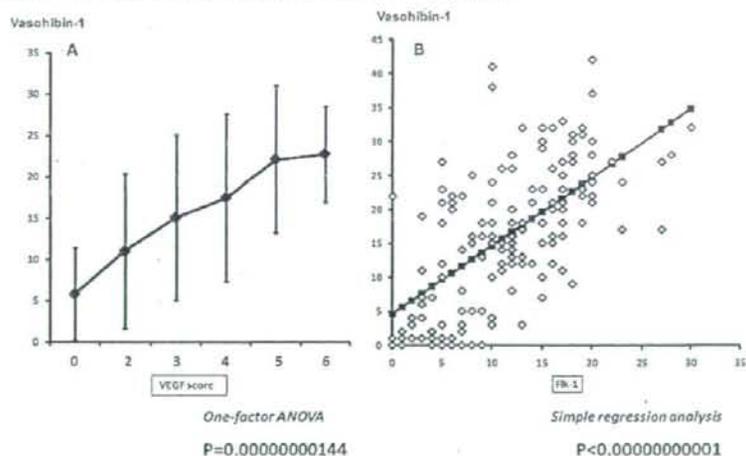
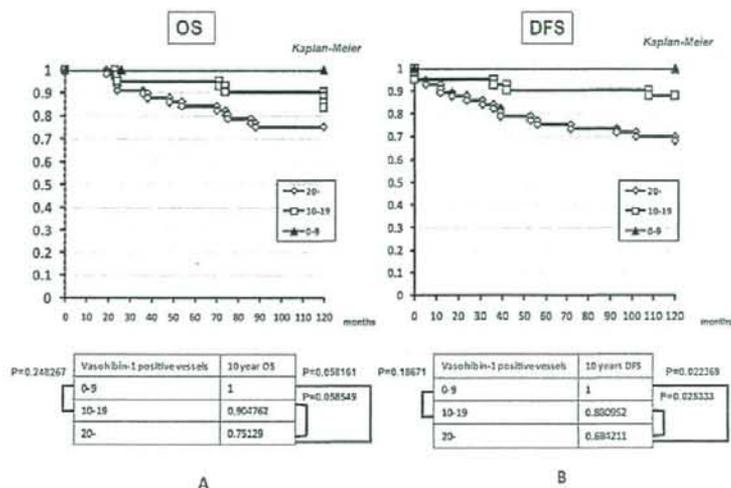


Fig.4 vasohibin-1 の発現と OS, DFS.



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. Scneider 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

研究分担者 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

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。新規3次元型マイクロアレイ法や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の定量的RT-PCR法でのエストロゲン応答性候補遺伝子を解析を試みた。また、新規分子診断法としてエストロゲンシグナルを可視化する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行なった。

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。

- 2) そこで、これらの候補遺伝子 36 個のプロープを搭載した 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) また、臨床応用の点でより実用的な定量的 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いれて進める。
- 4) 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。

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。