

Table 1 Association between Early growth responsive gene 3 (EGR3) immunoreactivity and clinicopathological parameters in 190 breast carcinomas

| | EGR3 immunoreactivity | | P value | EGR3 LI | P value |
|---|-----------------------|----------|--------------|----------|--------------|
| | +(n=99) | -(n=91) | | | |
| Age (years) | 52.3±1.2 | 54.4±1.2 | 0.23 | | 0.59 |
| Menopausal status | | | | | |
| Premenopausal | 46 (24%) | 38 (20%) | | 19.1±2.3 | |
| Postmenopausal | 53 (28%) | 53 (28%) | 0.61 | 19.2±2.2 | 0.96 |
| Stage | | | | | |
| I | 18 (10%) | 26 (14%) | | 15.8±2.8 | |
| II | 56 (30%) | 51 (27%) | | 18.8±2.1 | |
| III | 9 (5%) | 9 (5%) | | 16.1±5.2 | |
| IV | 16 (8%) | 5 (3%) | 0.07 | 30.6±6.4 | 0.07 |
| Tumor size (mm) | 34.6±2.7 | 30.0±3.4 | 0.29 | | 0.20 |
| Lymph node status | | | | | |
| Positive | 54 (28%) | 29 (15%) | | 24.6±2.8 | |
| Negative | 45 (24%) | 62 (33%) | 0.002 | 14.9±1.7 | 0.003 |
| Distant metastasis | | | | | |
| Positive | 16 (8%) | 5 (3%) | | 30.6±6.4 | |
| Negative | 83 (44%) | 86 (45%) | 0.02 | 17.7±1.6 | 0.01 |
| Histological grade | | | | | |
| 1 (well) | 26 (14%) | 24 (13%) | | 19.7±3.1 | |
| 2 (moderate) | 40 (21%) | 31 (16%) | | 21.5±2.7 | |
| 3 (poor) | 33 (17%) | 36 (19%) | 0.60 | 16.3±2.6 | 0.48 |
| Tubule formation | | | | | |
| 1 (>75%) | 12 (6%) | 22 (12%) | | 13.2±2.9 | |
| 2 (10–75%) | 23 (12%) | 29 (15%) | | 14.9±2.5 | |
| 3 (<10%) | 64 (34%) | 40 (21%) | 0.01 | 23.2±2.4 | 0.20 |
| ER α status | | | | | |
| Positive | 78 (41%) | 57 (30%) | | 22.0±2.0 | |
| Negative | 21 (11%) | 34 (18%) | 0.01 | 12.2±2.3 | 0.01 |
| ER α LI (%) | 47.9±3.4 | 37.3±3.7 | 0.02 | (r=0.23) | 0.001 |
| ER β LI (%) | 16.2±2.3 | 15.2±2.1 | 0.82 | | 0.37 |
| PR LI (%) | 42.9±3.3 | 36.9±3.6 | 0.23 | | 0.33 |
| HER2 status | | | | | |
| Positive | 29 (15%) | 28 (15%) | | 15.4±2.5 | |
| Negative | 70 (37%) | 63 (33%) | 0.82 | 20.8±2.0 | 0.23 |
| KI-67 LI (%) | 24.8±1.8 | 24.4±1.9 | 0.89 | | 0.93 |
| EGR3 immunoreactivity in recurrent lesions (n=13) | | | | (r=0.65) | 0.02 |
| Positive | 9 (69%) | 1 (8%) | | | |
| Negative | 1 (8%) | 2 (15%) | 0.03 | | |

Data are presented as mean \pm 95% confidence interval (95% CI) or the number of cases with percentage. P values <0.05 were considered significant, and described as boldface.

and these cases were ER α -positive breast cancers. The disease-free and overall survival curves in these patients were summarized in Fig. 2E and F respectively. EGR3 immunoreactivity was also associated with an increased risk of recurrence and worse prognosis in the group of breast cancer patients who received tamoxifen therapy ($P=0.01$ and 0.03 in the log-rank test respectively). An association between EGR3 immunoreactivity and clinical outcome of the patients was not significantly changed regardless of the status of adjuvant chemotherapy after surgery in this study (data not shown).

Estrogen-mediated expression of EGR3 in MCF-7 breast carcinoma cells

As shown in Fig. 3A, EGR3 mRNA expression was induced by estradiol in a dose-dependent manner in MCF-7 cells. This induction became significant from 1 nM estradiol ($P<0.001$ versus control (non-treatment with estradiol)), and EGR3 mRNA level of MCF-7 cells treated with 10 nM estradiol ($100.0\pm 2.0\%$) was 14-fold increased when compared with the control level ($7.2\pm 2.0\%$). The estradiol-mediated mRNA expression of EGR3 was suppressed by addition of

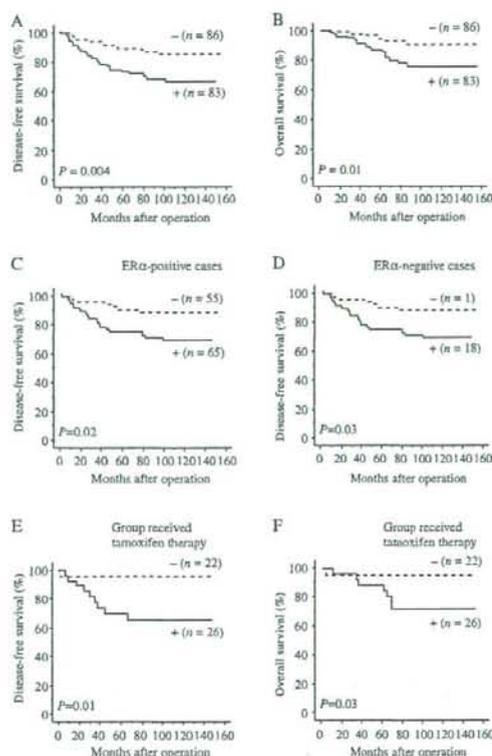


Figure 2 Disease-free and overall survival of 169 patients with breast carcinoma according to EGR3 immunoreactivity (Kaplan–Meier method). (A and B) EGR3 immunoreactivity was significantly associated with an increased risk of recurrence ($P=0.0036$, log-rank test) (A) and worse prognosis ($P=0.0090$, log-rank test) (B). (C and D) EGR3 immunoreactivity was significantly correlated with a risk of recurrence regardless of the ER α status ($P=0.0154$ in ER α -positive cases (C), and $P=0.0348$ in ER α -negative cases (D)). (E and F) EGR3 immunoreactivity was significantly associated with an increased risk of recurrence ($P=0.0123$) (E) and worse prognosis ($P=0.0316$) (F) in the 48 patients received tamoxifen therapy.

tamoxifen in a dose-dependent manner (Fig. 3B). EGR3 mRNA level in MCF-7 cells treated with 10 nM estradiol and 10 μ M tamoxifen ($21.8 \pm 6.2\%$) was decreased into 22% of that treated with 10 nM estradiol alone ($100.0 \pm 2.0\%$), but its level remained significantly higher ($P < 0.001$ and threefold) than the control level (neither estradiol nor tamoxifen; $7.2 \pm 2.0\%$). Tamoxifen (10 μ M) alone did not significantly change the EGR3 mRNA level in MCF-7 cells.

Estradiol also induced EGR3 mRNA expression in LY-2 cells, a tamoxifen-resistant MCF-7 cell variant, in a dose-dependent manner (Fig. 3C), which was

Table 2 Uni- and multivariate analyses of disease-free survival in stages I–III breast cancer patients examined ($n=169$)

| Variable | Uni- variate <i>P</i> | Multivariate | |
|--|-----------------------------|---------------|---------------------------|
| | | <i>P</i> | Relative risk (95% CI) |
| Lymph node status (positive/negative) | <0.0001 | 0.0002 | 3.8 (1.9–7.7) |
| EGR3 immunoreactivity (positive/negative) | 0.01 | 0.01 | 2.5 (1.3–4.8) |
| HER2 status (positive/negative) | 0.01 | 0.08 | |
| Tumor size (≥ 20 mm/ < 20 mm) | 0.04 | 0.48 | |
| Ki-67 LI (≥ 10 / < 10) | 0.15 | | |
| Adjuvant chemotherapy (no/yes) | 0.34 | | |
| ER α status (negative/positive) | 0.44 | | |
| Tamoxifen therapy (no/yes) | 0.46 | | |
| Histological grade (3/1, 2) | 0.78 | | |

Data considered significant ($P < 0.05$) in the univariate analyses were described as boldface, and were examined in the multivariate analyses.

significant from 10 pM estradiol ($P < 0.05$ versus the control level). The level of EGR3 mRNA in LY-2 cells treated with 10 nM estradiol ($1245 \pm 222\%$) was 31-fold higher than the control level ($39.7 \pm 14.2\%$), and was 12-fold higher than that in MCF-7 cells treated

Table 3 Uni- and multivariate analyses of overall survival in stages I–III breast cancer patients examined ($n=169$)

| Variable | Uni- variate <i>P</i> | Multivariate | |
|--|-----------------------------|--------------|---------------------------|
| | | <i>P</i> | Relative risk (95% CI) |
| Lymph node status (positive/negative) | <0.0001 | 0.001 | 6.0 (2.2–16.5) |
| Histological grade (3/1, 2) | 0.003 | 0.03 | 2.5 (1.1–4.7) |
| HER2 status (positive/ negative) | 0.004 | 0.38 | |
| EGR3 immunoreactivity (positive/negative) | 0.01 | 0.01 | 3.0 (1.3–7.0) |
| Tumor size (≥ 20 mm/ < 20 mm) | 0.02 | 0.28 | |
| Ki-67 LI (≥ 10 / < 10) | 0.11 | | |
| Adjuvant chemotherapy (no/yes) | 0.21 | | |
| Tamoxifen therapy (no/yes) | 0.37 | | |
| ER α status (negative/ positive) | 0.42 | | |

Data considered significant ($P < 0.05$) in the univariate analyses were described as boldface and were examined in the multivariate analyses.

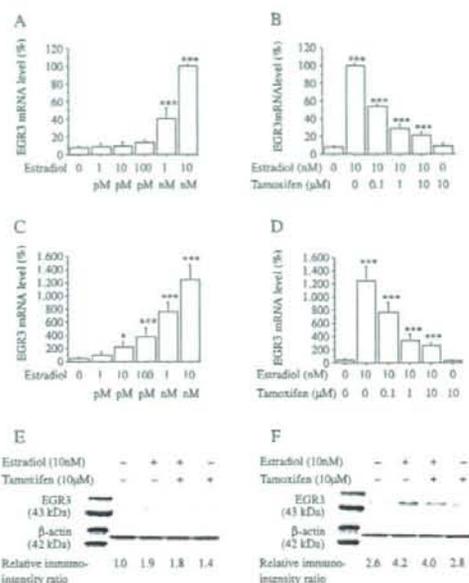


Figure 3 Induction of EGR3 expression by estradiol in MCF-7 cells. (A and C) MCF-7 (A) or LY-2 (C) cells were treated with indicated concentrations of estradiol for 3 days, and the EGR3 mRNA was evaluated as the ratio of RPL13A mRNA level (%). (B and D) MCF-7 (B) or LY-2 (D) cells were treated with estradiol (10 nM) with indicated concentrations of tamoxifen for 3 days, and the EGR3 mRNA was evaluated as the ratio of RPL13A mRNA level (%). Data are presented as mean \pm s.d. ($n=4$). * $P<0.05$ and *** $P<0.001$ versus control (no treatment with estradiol or tamoxifen for 3 days; left column) respectively. The statistical analyses were performed using a one-way ANOVA and Bonferroni test. (E and F) Immunoblotting for EGR3 in MCF-7 (E) and LY-2 (F) cells. Cells were treated with estradiol (10 nM) and/or tamoxifen (10 μ M) for 3 days. Amount of protein loaded in each lane was 25 μ g (immunoblotting for EGR3) or 5 μ g (immunoblotting for β -actin). Immunointensity of EGR3 in each sample was normalized to that of β -actin, and relative immunointensity ratio of EGR3 was summarized as a ratio compared with that of MCF-7 cells treated without estradiol or tamoxifen (left lane in E).

under the same condition. Tamoxifen dose-dependently suppressed the estradiol-mediated mRNA expression of EGR3 in LY-2 cells (Fig. 3D). EGR3 mRNA level in LY-2 cells treated with 10 nM estradiol and 10 μ M tamoxifen ($278 \pm 35.0\%$) was decreased into 22% of that treated with 10 nM estradiol alone ($1,245 \pm 222\%$), but was still significantly higher ($P<0.001$ and sevenfold) than the control level ($39.7 \pm 14.2\%$). Tamoxifen (10 μ M) did not significantly change the EGR3 mRNA level also in LY-2 cells. Similar tendency was detected at EGR3 protein levels both in MCF-7 and LY-2 cells by immunoblotting analyses (Fig. 3E and F).

Pure anti-estrogen, ICI 182 780, alone did not significantly change EGR3 mRNA level in MCF-7 cells (Fig. 4A). EGR3 mRNA level was slightly increased by addition of estradiol in MCF-7 cells under the treatment with 10 nM ICI 182 780, but no significant association was detected (2.3-fold and $P=0.06$, 10 nM estradiol versus control (Fig. 4B; non-treatment with estradiol).

On the other hand, as shown in Fig. 4C, ICI 182 780 alone significantly inhibited the EGR3 mRNA level of LY-2 cells in a dose-dependent manner, and the EGR3 mRNA level of LY-2 cells treated with 10 μ M ICI 182 780 was decreased to 21% ($7.8 \pm 3.6\%$, $P<0.001$) of the basal level (non-treatment with ICI 182 780; $37.8 \pm 11.8\%$). When LY-2 cells were treated with 10 nM ICI 182 780, the EGR3 mRNA level was significantly induced by estradiol in a dose-dependent manner (43-fold and $P<0.001$, 10 nM estradiol versus control (Fig. 4D; non-treatment with estradiol).

Estradiol (10 nM) did not significantly induce the EGR3 mRNA expression when MCF-7 or LY-2 cells were treated with 10 μ M ICI 182 780 (0.9-fold and $P=0.83$ in MCF-7, and 1.2-fold and $P=0.77$ in LY-2).

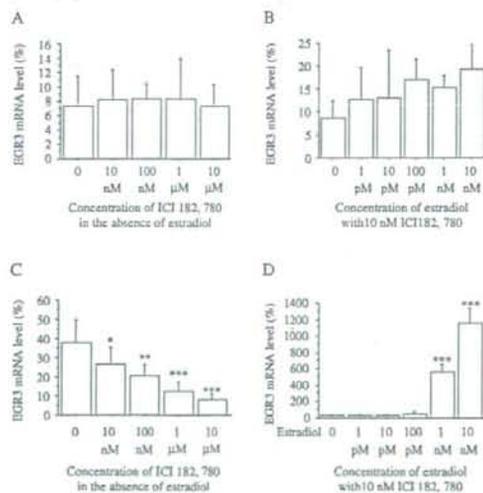


Figure 4 Effects of ICI 182 780 on EGR3 mRNA expression in MCF-7 cells. (A and C) MCF-7 (A) or LY-2 (C) cells were treated with indicated concentrations of ICI 182 780 for 3 days in the absence of exogenous estradiol. (B and D) MCF-7 (B) or LY-2 (D) cells were treated with indicated concentrations of estradiol and ICI 182 780 (10 nM) for 3 days. Data are presented as mean \pm s.d. ($n=4$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$ versus control (non-treatment with ICI 182 780 (A and C) or 10 nM ICI 182 780 in the absence of estradiol (B and D) for 3 days (left column in each figure)). The statistical analyses were performed using a one-way ANOVA and Bonferroni test.

Increased invasion properties in *Egr3*-expressing MCF-7 Tet-Off cells

In order to further characterize the biological functions of EGR3 in breast carcinoma cells, we then employed Eg-10 and Eg-11 *Egr3*-expressing transformants derived from MCF-7 Tet-Off cells (Inoue *et al.* 2004). EGR3 mRNA levels of these transformants were 57 and 540% in Eg-10 and Eg-11 respectively. As a control, we used Ctl-7, which was stably

transfected with empty vector in the MCF-7 Tet-Off cells (Inoue *et al.* 2004), and the EGR3 mRNA level was negligible ($2.2 \times 10^{-3}\%$). In the immunohistochemistry, EGR3 immunoreactivity was detected in the nuclei of Eg-10 and Eg-11 cells (Fig. 5A), but not in Ctl-7 cells (Fig. 5B). The EGR3 mRNA levels decreased into negligible levels in both Eg-10 ($5.0 \times 10^{-3}\%$) and Eg-11 ($1.4 \times 10^{-2}\%$) cells, when these cells were treated with doxycyclin (50 ng/ml) for 3 days.

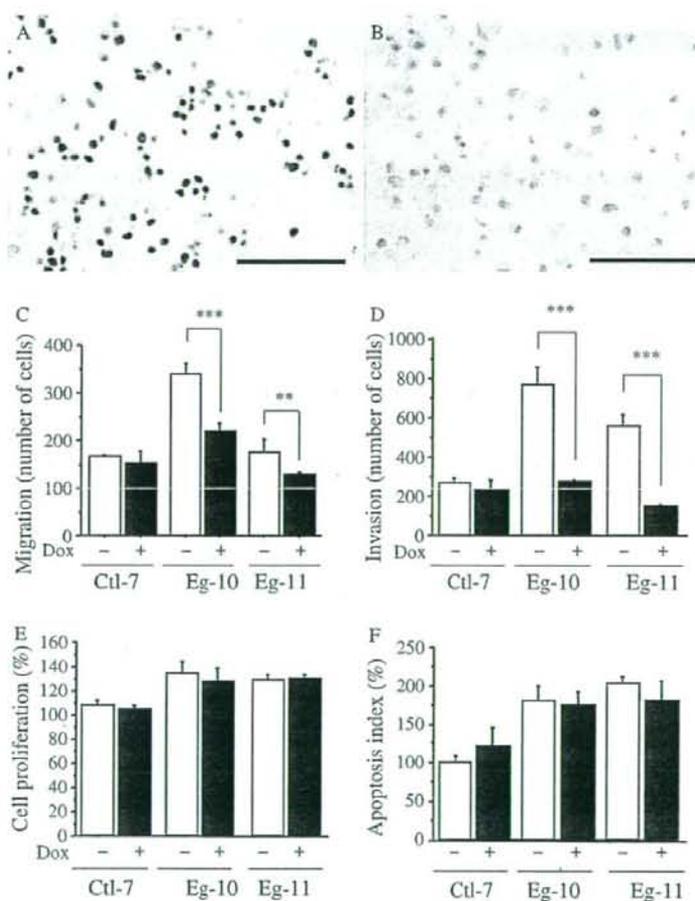


Figure 5 (A and B) Immunohistochemistry for EGR3 in *Egr3*-expressing MCF-7 Tet-Off cells. Immunoreactivity of EGR3 was detected in the nuclei of Eg-11 cells (A), but not in Ctl-7 cells (B). Immunohistochemistry was performed using cell blocks from formalin-fixed and paraffin-embedded specimens. Bar = 100 μ m. (C–F) Migration assay (C), invasion assay (D), cell proliferation assay (E), and apoptosis analysis (F) in *Egr3*-expressing cells. Eg-10, Eg-11, and Ctl-7 cells were incubated with 6 h, 24 h, 3 days, and 3 days at 37 °C respectively, without or with the treatment of doxycyclin (50 ng/ml). A total number of cells on the lower surface of membrane of Chemotaxicell was counted in the migration and invasion assays (C and D). While, the cell number and apoptosis index were calculated and evaluated as a ratio (%) compared with that at 0 day after the treatment in the cell proliferation assay and apoptosis analysis (E and F). Data are presented as mean \pm s.d. ($n=4$). An open bar represents the value of cells treated without doxycyclin, and a closed bar shows that under the treatment with doxycyclin. The statistical analyses were performed between the values in the absence and presence of doxycyclin using a one-way ANOVA and Bonferroni test, and ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ respectively.

Figure 5C shows the result of migration assay in *Egr3*-expressing MCF-7 cells. The number of migrated cells was significantly higher in Eg-10 ($P < 0.001$) and Eg-11 ($P < 0.01$) when compared with that in the treatment with doxycyclin. However, a number of migrated Ctl-7 cells were not significantly altered between the absence and presence of doxycyclin. Moreover, the number of invaded cells was significantly higher in Eg-10 and Eg-11 ($P < 0.001$) than that under the treatment with doxycyclin, and it was 3.3-fold higher in Eg-10 and 3.7-fold in Eg-11 (Fig. 5D). Invasion property was not significantly altered in Ctl-7 cells according to the treatment with doxycyclin.

Cell proliferation (Fig. 5E) and apoptosis index (Fig. 5F) of these three cells were not significantly altered between the absence and presence of doxycyclin for 3 days.

Morphological features of *Egr3*-expressing MCF-7 cells in athymic mice xenograft model

In order to study the biological roles of EGR3 in breast carcinoma cells *in vivo*, we injected Eg-11 and Ctl-7 cells into female nude mice, and the tumor tissues were resected after 2 months. As shown in Fig. 6A and B,

Ctl-7 showed a well-circumscribed tumor, and tubule formation was remarkable in the carcinoma tissue. Invasion into the surrounding tissue was not detected in any of the cases examined. On the other hand, Eg-11 cells arranged in clusters and trabeculae with focal glandular formation, and irregularly invaded into the adjacent peritumoral tissue such as adipose tissue in all of the cases examined (Fig. 6C and D). As shown in Table 4, Eg-11 carcinoma tissues significantly demonstrated invasion ($P = 0.01$) and less tubule formation ($P = 0.03$) when compared with the Ctl-7 carcinoma tissues. However, tumor volume, largest dimension histologically determined, and Ki-67 LI of the tumor were not significantly different between these two types of carcinoma. The tumor volumes of Eg-11 and Ctl-7 were monitored weekly, but no significant changes were detected when compared with the original volume (data not shown).

Discussion

In this study, EGR3 immunoreactivity was closely correlated with the mRNA level, and was significantly associated with the ER α status, but not with ER β , in the breast carcinoma tissues. In the previous studies using cDNA microarray, EGR3 mRNA was significantly

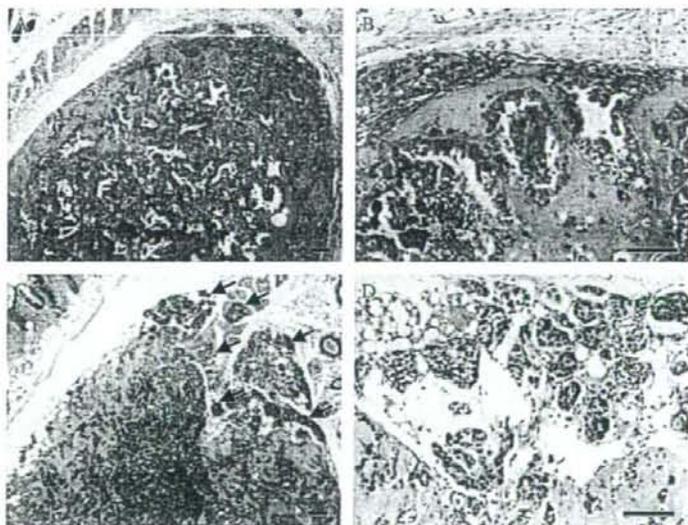


Figure 6 Histological features of *Egr3*-expressing MCF-7 cells in athymic mouse xenograft model. (A and B) Tubule formation was remarkable in the Ctl-7 carcinoma and no invasive components were detected. (C and D) Eg-11 carcinoma cells mainly arranged in clusters and trabeculae, and frequently invaded into a tissue which surrounded the primary carcinoma lesion (arrows). (D) shows invasive components of Eg-11 cells in the adipose tissue adjacent to the primary carcinoma site. Hematoxylin and eosin stain. Tumor tissues were resected at 2 months after the injection, and were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax. Bar=100 μ m.

Table 4 Histological features of Early growth responsive gene 3 (*Egr3*)-expressing MCF-7 cells injected into athymic mice

| | Eg-11 (n=4) | Ctl-7 (n=4) | P value |
|---|-------------|-------------|---------|
| Tumor volume ^a (mm ³) | 399±101 | 357±74 | 0.75 |
| Histologically determined largest dimension ^a (mm) | 4.8±0.6 | 5.1±0.4 | 0.61 |
| Tubule formation | | | |
| 1 (>75%) | 0 (7%) | 1 (13%) | |
| 2 (10–75%) | 0 (11%) | 3 (15%) | |
| 3 (<10%) | 4 (31%) | 0 (23%) | 0.03 |
| Invasive lesions | | | |
| Present | 4 (100%) | 0 (0%) | |
| Absent | 0 (0%) | 4 (100%) | 0.01 |
| Ki-67 LI of the tumor ^a (%) | 54.5±4.6 | 49.5±7.1 | 0.58 |

Tumor tissues were resected at 2 months after the injection, and were subsequently fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax. Tumor volume was evaluated by a formula for a semiellipsoid ($4/3\pi r^2/2$). P values <0.05 were considered significant and described as boldface.

^aData are presented as mean ± s.d. All other values represent the number of cases and percentage.

(the relative value of more than 2.0) induced by estradiol in various carcinoma cell lines derived from breast (MCF-7 and MCF-7 c9), endometrium (Ishikawa), ovary (SK-OV-3), and stomach (MKN-28; Inoue *et al.* 2002, 2004, Hayashi *et al.* 2003). Induction of EGR3 mRNA was detected at 6 h after estradiol treatment (10 nM) and reached the maximal level at 24–72 h in MCF-7 cells by northern blot analysis (Inoue *et al.* 2004), and ERE sequence was identified at 2.3 kb from the most upstream mRNA 5' end of *Egr3* (Bourdeau *et al.* 2004). The biological estrogenic actions are mainly mediated through ER α (Korach 1994, Hayashi *et al.* 2003), and MCF-7 cells highly express ER α but low level of ER β (Vladusic *et al.* 2000). Therefore, results from our present study suggest that EGR3 is expressed in the breast carcinoma cells, mainly through ER α , as a result of estrogenic action.

We also found that 21 out of 55 cases were immunopositive for EGR3 in breast carcinoma tissues negative for ER α (LI of <10%). This is partly because EGR3 expression was induced by a low or undetectable level of ER α . However, EGR3 was also reported to be induced by various factors, including mitogenic stimulation (Patwardhan *et al.* 1991, O'Donovan *et al.* 1998, Mercier *et al.* 2001, Jouvert *et al.* 2002). Therefore, factors other than estrogen may also be partly involved in the regulation of EGR3 expression in some breast carcinomas.

In our study, EGR3 immunoreactivity was inversely associated with tubule formation, and positively correlated with metastatic lesions of lymph nodes or other organs in the breast carcinomas. Moreover, overexpression of *Egr3* significantly enhanced invasion properties in MCF-7

cells in both *in vitro* study and nude mouse xenograft model. Therefore, EGR3 is postulated to play a pivotal role in carcinoma cell invasion mediated by estrogens in breast carcinomas. Metastasis is the major cause of treatment failure and death of carcinoma patients, and it is a multi-step process that involves not only invasion of carcinoma cells but also lymphogenous and/or hematogenous spread and cell proliferation in the metastatic sites. In our present study, EGR3 immunoreactivity was not associated with tumor size or Ki-67 LI in the breast carcinoma tissues, and overexpression of *Egr3* was not necessarily involved in the cell proliferation or apoptosis status in MCF-7 cells. Therefore, cooperation with EGR3 and other factors may be required for the metastasis of ER-positive breast carcinoma. It awaits further examinations for the detailed clarification of estrogen-mediated metastatic process, because biological function of a great majority of estrogen-responsive genes currently remains unclear. However, for instance, cyclin D (Steege & Zhou 1998) and estrogen-responsive finger protein (Efp; Urano *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2005b) were shown to induce the estrogen-mediated proliferation in breast carcinoma cells, and histone deacetylase (HDAC) 6 were reported as a regulator of cell motility in ER-positive breast carcinoma cells (Saji *et al.* 2005).

Both uni- and multivariate analyses in our study have demonstrated that EGR3 immunoreactivity is a potent prognostic factor for both the recurrence and overall survival in breast carcinoma patients, and similar tendency was also detected in the patients who received tamoxifen therapy. Estradiol is well known to be locally produced and act in breast carcinomas

regardless of the menopausal status (Suzuki et al. 2005a). In the present *in vitro* experiments, tamoxifen suppressed estradiol-mediated expression of EGR3 mRNA in a dose-dependent manner, but the EGR3 mRNA level in MCF-7 cells treated with estradiol and 10 μ M tamoxifen was significantly higher than the control level. Optimal concentrations of tamoxifen were generally considered 10 nM to 10 μ M in *in vitro* studies (Vendrell et al. 2005), and serum concentration of tamoxifen was reported at 1.8 μ M in patients who received high-dose tamoxifen (320 mg), nevertheless 20 mg tamoxifen is usually administered in breast carcinoma patients. Therefore, tamoxifen may not completely block the estradiol-mediated EGR3 expression in the breast carcinoma patients.

Regarding the molecular mechanism leading to tamoxifen resistance, recent studies demonstrated that breast carcinoma cells adapt by changing their response to estradiol and developing an increased sensitivity to the growth-stimulating action (Martin et al. 2003, Berstein et al. 2004, Santen et al. 2004). These processes are called 'hypersensitivity to estradiol', and the potential association with increased concentrations of ER α and ER-mediated events is proposed (Santen et al. 2001, Chan et al. 2002, Vendrell et al. 2005). In this study, EGR3 mRNA level in LY-2 cells was 5.5-fold higher than that in MCF-7 cells in the absence of exogenous estradiol, but it was dose-dependently decreased by ICI 182 780. In addition, LY-2 cells showed marked amplitude of estradiol-mediated EGR3 mRNA expression when compared with MCF-7 cells. Therefore, it is suggested that EGR3 expression is mainly mediated through ER in LY-2 cells, and these findings of our present study are possibly explained by the hypersensitivity to estradiol in tamoxifen-resistant state of MCF-7 cells. Considering that the EGR3 mRNA level in LY-2 cells treated with estradiol and 10 μ M tamoxifen was 2.8-fold higher than that in MCF-7 cells treated with estradiol alone, EGR3 may play an important role also in the tamoxifen-resistant breast carcinoma patients. Therefore, residual carcinoma cells following surgical treatment in EGR3-positive breast carcinomas could rapidly invade in the presence of local estrogens regardless of the tamoxifen therapy, thereby resulting in an increased recurrence and poor prognosis in these patients.

In summary, EGR3 immunoreactivity was detected in carcinoma cells in 52% of breast carcinoma tissues in this study, and it was associated with its mRNA level. EGR3 immunoreactivity was positively associated with lymph node status, distant metastasis into

other organs, ER α , or EGR3 immunoreactivity in the recurrent lesions, and negatively correlated with tubule formation. EGR3 immunoreactivity was significantly associated with an increased risk of recurrence or worse prognosis, regardless of the tamoxifen therapy. Estradiol significantly induced EGR3 mRNA expression in a dose-dependent manner in MCF-7 cells, which was markedly amplified in a tamoxifen-resistant MCF-7 cell variant (LY-2). Tamoxifen suppressed the estradiol-mediated induction of EGR3 mRNA in a dose-dependent manner in these cells, but tamoxifen could not inhibit its expression completely. EGR3-expressing MCF-7 cells significantly increased the invasion property, but not cell proliferation, both *in vitro* and *in vivo* experiments. These results from our present study suggest that EGR3 plays an important role in estrogen-mediated invasion and is a potent prognostic factor in human breast carcinoma.

Acknowledgements

We appreciate the skillful technical assistance of Ms Chika Kaneko, Mr Katsuhiko Ono, Ms Toshie Suzuki, and Ms Ikumi Miura (Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine). The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM & McEwan RN 1987 A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Research* **47** 3239–3245.
- Berstein LM, Wang JP, Zheng H, Yue W, Conaway M & Santen RJ 2004 Long-term exposure to tamoxifen induces hypersensitivity to estradiol. *Clinical Cancer Research* **10** 1530–1534.
- Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH & Mader S 2004 Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Molecular Endocrinology* **18** 1411–1427.
- Chan CM, Martin LA, Johnston SR, Ali S & Dowsett M 2002 Molecular changes associated with the acquisition of oestrogen hypersensitivity in MCF-7 breast cancer cells on long-term oestrogen deprivation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **81** 333–341.
- Dumoulin FL, Nischalke HD, Leifeld L, von dem Bussche A, Rockstroh JK, Sauerbruch T & Spengler U 2000 Semi-quantification of human C–C chemokine mRNAs with

- reverse transcription/real-time PCR using multi-specific standards. *Journal of Immunological Methods* **241** 109–119.
- Elston CW & Ellis IO 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19** 403–410.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B & Senn HJ 2005 Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Annals of Oncology* **16** 1569–1583.
- Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, Yoshida N & Yamaguchi Y 2003 The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer* **10** 193–202.
- Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, Kiyama R & Hayashi S 2002 Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *Journal of Molecular Endocrinology* **29** 175–192.
- Inoue A, Omoto Y, Yamaguchi Y, Kiyama R & Hayashi SI 2004 Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **32** 649–661.
- Jouvert P, Dietrich JB, Aunis D & Zwiller J 2002 Differential rat brain expression of EGR proteins and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration. *Neuromolecular Medicine* **1** 137–151.
- Korach KS 1994 Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* **266** 1524–1527.
- Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Marshall C & Dowsett M 2003 Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *Journal of Biological Chemistry* **278** 30458–30468.
- Mercier G, Turque N & Schumacher M 2001 Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Brain Research. Molecular Brain Research* **97** 137–148.
- O'Donovan KJ, Wilkens EP & Baraban JM 1998 Sequential expression of Egr-1 and Egr-3 in hippocampal granule cells following electroconvulsive stimulation. *Journal of Neurochemistry* **70** 1241–1248.
- O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J & Baraban JM 1999 The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends in Neurosciences* **22** 167–173.
- Paik S, Hartmann DP, Dickson RB & Lippman ME 1994 Antiestrogen resistance in ER positive breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **31** 301–307.
- Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, Shows TB, Le Beau MM & Sukhatme VP 1991 EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* **6** 917–928.
- Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M *et al.* 2005 Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* **24** 4531–4539.
- Santen R, Jeng MH, Wang JP, Song R, Masamura S, McPherson R, Santner S, Yue W & Shim WS 2001 Adaptive hypersensitivity to estradiol: potential mechanism for secondary hormonal responses in breast cancer patients. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **79** 115–125.
- Santen RJ, Song RX, Zhang Z, Yue W & Kumar R 2004 Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for sequential responses to hormonal therapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research* **10** 337S–345S.
- Steeg PS & Zhou Q 1998 Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **52** 17–28.
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N & Sasano H 2005a Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **12** 701–720.
- Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H & Inoue S 2005b Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clinical Cancer Research* **11** 6148–6154.
- Taniguchi S, Tatsuka M, Nakamatsu K, Inoue M, Sadano H, Okazaki H, Iwamoto H & Baba T 1989 High invasiveness associated with augmentation of motility in a fos-transferred highly metastatic rat 3Y1 cell line. *Cancer Research* **49** 6738–6744.
- Thomas DB 1984 Do hormones cause cancer? *Cancer* **53** 595–604.
- Tourtellotte WG & Milbrandt J 1998 Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nature Genetics* **20** 87–91.
- Tourtellotte WG, Keller-Peck C, Milbrandt J & Kucera J 2001 The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interactions during muscle spindle morphogenesis. *Developmental Biology* **232** 388–399.
- Tsai MJ & O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* **63** 451–486.
- Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y & Inoue S 2002 Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* **417** 871–875.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A & Speleman F 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3** research0034.1–11.

- Vendrell JA, Bieche I, Desmetz C, Badia E, Tozlu S, Nguyen C, Nicolas JC, Lidereau R & Cohen PA 2005 Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Endocrine-Related Cancer* **12** 75–92.
- Vihko R & Apter D 1989 Endogenous steroids in the pathophysiology of breast cancer. *CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology* **9** 1–16.
- Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lakins J & Lupu R 2000 Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncology Reports* **7** 157–167.
- Xi H & Kersh GJ 2004 Early growth response gene 3 regulates thymocyte proliferation during the transition from CD4⁻CD8⁻ to CD4⁺CD8⁺. *Journal of Immunology* **172** 964–971.

ホルモン療法奏効メカニズムと効果予測

——エストロゲンシグナルを標的に

Mechanisms and prediction of hormonal therapy



林 慎一

Shin-ichi HAYASHI

東北大学医学部保健学科検査技術科学専攻基礎検査学講座

◎現在の乳癌のホルモン療法の標的はエストロゲンシグナルである。エストロゲンに依存して生存し、増殖・進展する乳癌細胞に対してはきわめて効果的であり、その作用メカニズムは乳癌の発生・増殖機構と直結した問題として、基礎研究としても重要なテーマである。しかも、その成果は診断と治療に直接役立つことが期待できる。第三世代のアロマトラーゼ阻害剤の実用化など、近年著しい進歩を遂げると同時に複雑化しているホルモン療法の奏効性予測は、今後の乳癌の個別化治療にとって重要な問題である。遺伝子プロファイル解析などあらたな技術を取り入れた試みが行われており、今後の展開が注目される。



内分泌療法, エストロゲン, エストロゲン受容体, アロマトラーゼ

実地臨床で広範に施行されている乳癌のホルモン療法の有用性についてはあらためて述べるまでもないが、近年の LH-RH アゴニストや第三世代のアロマトラーゼ阻害剤などの登場は、ホルモン療法の有用性をいっそう高めるとともに、術前ホルモン療法のようなあらたな展開をももたらしている。一方、エストロゲンシグナルに関する基礎研究の進展とともに、ホルモン療法の奏効メカニズムについての理解も進んできた。しかし、奏効群と不応群の判別や耐性獲得の機構など臨床的にも重要な課題について、いまだ十分解明されているとはいえない。ホルモン療法の選択肢は多彩になってきており、それらの的確な選択・適用のためにはより高精度な効果予測が求められている。それにより、個々の乳癌患者の特性に合わせた個別化治療が可能になり、ひいては医療コスト削減にも寄与するであろう。

ホルモン療法の理論的背景

乳癌におけるホルモン療法の基本的な考え方は、エストロゲン依存性に増殖進展する乳癌細胞に対してエストロゲンの供給を遮断する、またはその作用の仲介者である受容体の機能を阻害するなどの手段により、癌細胞の増殖を止め、さらにアポトーシスを誘導するというものである。そのため、古くは閉経前の患者に対しては主要なエストロゲン産生臓器である卵巣を摘除するなどの手段がとられてきた。現在では LH-RH アゴニスト剤を用いて卵巣機能をブロックしている。また、閉経後の乳癌患者に対しては抗エストロゲン剤、とくに以前からタモキシフェンが使われてきたが、近年、アロマトラーゼ阻害剤によって局所のエストロゲン合成を阻害することによって、同等、あるいはこれまで以上の効果が得られるようになってきた。

いずれにせよ、乳癌におけるホルモン療法はエストロゲンシグナルの遮断が基本戦略であり、そ

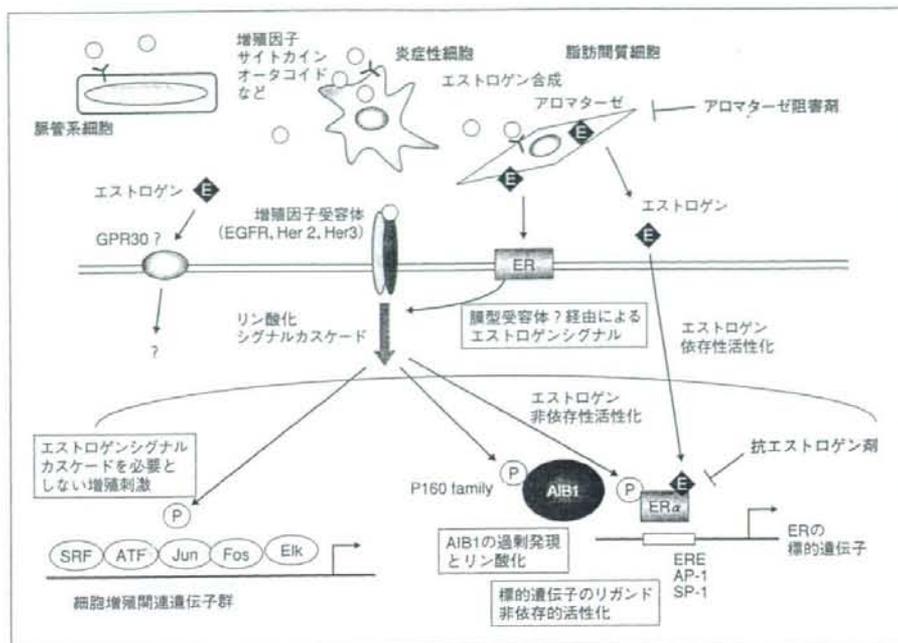


図1 乳癌局所および癌細胞内のエストロゲンシグナル経路とホルモン療法の作用点

れが奏効するかどうかは、乳癌細胞がエストロゲン依存性に増殖する性質を保持しているかどうか、強く依存すると思われる。

ホルモン療法に関連する基礎研究分野の新しい展開

これまでに核内転写因子としてのエストロゲン受容体(ER)の研究は、他の核内受容体研究と連動して急速に進んできた。とくに転写共役因子に関する研究の急速な進展が象徴的である。これによって抗エストロゲン剤の作用機序の分子レベルでの理解が進み、新規 SERM の開発などに大きく寄与してきた。ところが、エストロゲンの多彩な作用は従来の機序だけでは説明できず、近年、細胞質あるいは細胞膜に associate して存在する膜型 ER の存在やそれと関連したリン酸化シグナル経路の重要性が提唱され、それによってタモキシフェン耐性獲得など、臨床上観察される従来の古典的経路では理解が困難な各種の現象を説明する理論的根拠として議論されている(図1)。またこ

く最近、従来の経路とはまったく異なった G-coupled protein を介したエストロゲン作用の経路の存在も報告されている。

また、治療の主役が抗エストロゲン剤からアロマターゼ阻害剤などのエストロゲンの供給の遮断に移ってきたことから、乳癌局所の微小環境や癌細胞と周辺間質細胞との機能的相互作用の機構解明の重要性が高まってきた。癌細胞の増殖をサポートする CAF (carcinoma-associated fibroblast) の存在はその象徴である。著者らも乳癌の個々の間質細胞による癌細胞のエストロゲンシグナルの活性化を解析することにより、乳癌微小環境には患者ごとの個性があり、共存する癌細胞の性質と密接に関連していることを明らかにした。

これらの基礎研究の今後の展開は、ホルモン療法の臨床上の問題点の理解とその克服にきわめて重要と思われる。とくに分子標的治療の新しい標的の発見につながる可能性も期待できる。

ホルモン療法効果予測因子と問題点

2005年のSt. Gallen国際会議ではリスクカテゴリーが大きく変更され¹⁾、腫瘍径、grade、年齢、リンパ節転移のほか、あらたに脈管侵襲、HER2発現などの因子が追加された。一方、ERとプロゲステロン受容体(PgR)は、ホルモン感受性、非感受性の分類の指標に用いられ、予測因子として重要視されている。乳癌におけるホルモンレセプターの発現の評価は現在では免疫染色法で行われており、とくに陽性細胞の占有率と染色強度を合わせて評価するAllredスコア分類²⁾、あるいはそれに準じた方法が用いられている。しかし、どの数値を閾値としてホルモン療法適応群とするかについては国際的に統一されていない。とくに染色強度に関しては、各施設の手法・手法による違いが問題となるため、客観的評価が難しい。

ホルモン療法の奏効性が前述のように癌細胞のエストロゲン依存性増殖能の有無に強く関連していると考えられることから、治療の対象がER陽性乳癌であることは理にかなっている。しかし、ERの発現があればエストロゲン依存性であるとは限らず、その場合、ERの発現と治療効果が一致しないことが予想され、ER陽性/PgR陰性のようなケースもその一例と思われる。また少数例ではあるが、ER陰性でもホルモン療法が奏効する場合があることも知られており、ホルモンレセプターの存在の有無だけを奏効性の判断基準とするのは万全でない。ERが蛋白として発現し、存在しているも何らかの理由でその下流のシグナルカスケードが正常に機能していない場合には、たとえER陽性と判定されてもホルモン療法が奏効しないことは十分考えられる。たとえば、ERを含む転写複合体の活性化がリガンド非依存的に起こっている場合(転写共役因子の過剰発現、リン酸化による恒常的活性化、ER自身のリン酸化による活性化など)、あるいはERは存在しているも細胞の増殖がER関連シグナルカスケードに非依存性になっている場合などである。

それぞれのケースで各ホルモン療法の効果にもいろいろなパターンが予想され、それは患者ごとに異なると予想される。抗エストロゲン剤の適応がよいのか、アロマターゼ阻害剤の適応がよいのか、あるいは具体的にどの薬剤がよいのか、患者ごとの正確な予測が可能なあらたな予測因子が求められている。

か、あるいは具体的にどの薬剤がよいのか、患者ごとの正確な予測が可能なあらたな予測因子が求められている。

ホルモン療法効果予測の基礎研究

一方、より正確に、かつ普遍的に奏効性が予測できるようなあらたな手法・因子を模索する基礎研究も進められている。分子レベルの予後因子としてはこれまでもp53やBcl-2、Ki67、Her2などが検討されてきた。最近ではこのような既知の予後因子も含めた21遺伝子の発現をPCRによって判定する方法(Oncotype DXTM)によって効果的な化学療法の適応群を推定しようという試みが行われている³⁾。また、マイクロアレイ解析研究から同定した乳癌の予後予測に有用な70遺伝子のサブセットを解析することによって、実用的な予後予測をめざす研究(MINDACT Trial)もある。

しかし、これらはホルモン療法の効果予測をめざしたものではない。これまで、pS2やカテプシンDなどの以前から知られているER標的遺伝子について、ER、PgR以上の効果的な予測因子になりうるかの検討が行われてきたが、期待される結果は得られていない。ERの標的遺伝子についてはこれまで培養細胞を用いた研究が中心であり、結果が特定の細胞株においてのみ観察されるものであることが一因かもしれない。

ひとつの手段として考えられる戦略は、乳癌で発現が変動しているエストロゲン標的遺伝子を網羅的にとらえて、そのプロファイルを解析することにより、患者ごとのエストロゲンシグナル経路がどのような状況にあるのか把握し、最適な治療法を見出す、という手法である。すなわち、乳癌のホルモン療法の作用機序がエストロゲン経路の遮断であるなら、その反応性は標的遺伝子群のプロファイルとしてとらえることができるのではないかという考え方である。著者らは以前からこのような方法でホルモン療法の治療効果予測をめざした研究を行っているが、詳細は原著^{4,5)}や他の総説^{6,7)}を参考にしていきたい。

研究が進んで奏効性予測が可能な新規候補遺伝子の数が絞り込まれれば、従来の免疫染色法、またはマルチプレックスRT-PCR法など、より簡便

で実用的な手法による奏効性予測が可能かもしれない。これまでの研究の過程で他施設との共同研究によって HDAC6⁵⁹⁾や IGFBP4, EGR3¹⁰⁾などのエストロゲン応答遺伝子で、臨床病理学的因子や予後などに関連する新規因子を同定してきた。これらはそれぞれ単独では ER/PgR を超えるような強力な予測因子ではないが、複数遺伝子による診断用コンテンツとしては有用であろう。さらに、今後の研究の進展とともにあらたな因子が見出される可能性も考えられる。

アロマトラーゼ阻害剤の奏効性予測

アロマトラーゼ阻害剤の作用機序は、局所でのアロマトラーゼ酵素の活性を阻害して乳癌細胞へのエストロゲンの供給を遮断することである(図1)。癌細胞にもアロマトラーゼがあるという報告もあるが、大部分は腫瘍周囲の間質細胞に存在し、パラクリンにエストロゲンを供給している。ならば個々の乳癌に存在する間質の個性も治療効果に大きく影響するはずである。しかも癌細胞は、エストロゲンだけでなく他の増殖因子など、癌微小環境に存在するさまざまな因子によりその生存が支えられている。著者らは実際に、ERを活性化する間質細胞の能力は症例ごとに異なっていることを明らかにした¹¹⁾。高精度な治療奏効性予測には、これらの癌微小環境の特徴・個性を考慮することは必須であろう。そこで、エストロゲンシグナル活性を反映して蛍光を発する細胞やウイルスベクターを使用し、個々の乳癌の微小環境を解析する、あるいはアロマトラーゼ阻害剤の効果を *in vitro* で評価することを可能とする新しい解析法の開発を進めている。

今後のホルモン療法奏効性予測の 基礎研究の展望

ホルモン療法は乳癌のホルモン依存性という生物学的特性に依存した治療法であるため、その治療効果は個々の腫瘍の生物学的個性に依存する。

その個性の把握に個々の腫瘍のエストロゲンシグナル状態を知ることは重要であり、治療奏効性予測のためには必須と思われる。しかし、現時点では乳癌の場合に限らず、多数遺伝子の発現プロファイル解析を診断に応用しようという試みは、当初期待されていたほどのめざましい成果をあげていない。技術的問題点や標準化など、多くの困難が臨床への応用を難しくしている現実があるが、前述のような試みも含め、その克服のための研究は徐々に進んでおり、大きな流れは変わらないと思われる。

今後このような、ある程度まとまった数の遺伝子の発現をプロファイルという形でとらえ、スコア化して予後予測や感受性予測の指標とするという手法が普及してくる可能性は十分ある。一方、その実現のためにも乳癌の発生と増殖・進展のメカニズムに関する基礎研究のよりいっそうの進展は不可欠である。基礎研究と臨床研究が両輪となって今後の新規感受性予測因子の研究と先端技術に基づく診断技術が進歩し、患者にとってよりよい乳癌個別化治療が可能となっていくことを期待したい。

文献

- 1) Goldhirsch, A. et al. : *Ann. Oncol.*, **16** : 1569-1583, 2005.
- 2) Allred, D. C. et al. : *Mod. Pathol.*, **11** : 155-168, 1998.
- 3) Paik, S. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **351** : 2817-2826, 2004.
- 4) Inoue, A. et al. : *J. Mol. Endocrinol.*, **29** : 175-192, 2002.
- 5) Yoshida, N. et al. : *Cancer Sci.*, **95** : 496-502, 2004.
- 6) Hayashi, S. : *Biomed. Pharmacother.*, **58** : 1-9, 2004.
- 7) Hayashi, S. and Yamaguchi, Y. : *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **55** : 27-31, 2005.
- 8) Zhang, Z. et al. : *Clin. Cancer Res.*, **10** : 6962-6968, 2004.
- 9) Saito, S. et al. : *Oncogene*, **24** : 4531-4539, 2005.
- 10) Inoue, A. et al. : *J. Mol. Endocrinol.*, **32** : 649-661, 2004.
- 11) Yamaguchi, Y. et al. : *Cancer Res.*, **65** : 4653-4662, 2005.

日本臨牀 65 卷 増刊号 6 (2007 年 6 月 28 日発行) 別刷

乳 癌

—基礎・臨床研究のアップデート—

基礎研究

VI. 治療に向けての基礎研究

内分泌療法感受性予測因子

林 慎一

内分泌療法感受性予測因子

Predictive factors for endocrine therapy

林 慎一

Key words : ホルモン療法, エストロゲン, SERM, 抗エストロゲン剤, アロマターゼ阻害剤

はじめに

乳癌の薬物治療の中で内分泌療法は極めて重要な位置を占めており、あらゆる局面で広範に施行されている。なかでも術後内分泌療法はエストロゲン受容体(ER)陽性患者の再発を約半分に低減させるという著効を示し、しかもその有害事象は化学療法に比較するとかなり少ない。このような内分泌療法が効果的に広く行われていること自体が、他の癌にはみられない乳癌の治療の特徴ともいえよう。

一方、治療開始前に感受性群、非感受性群を正確に層別化する予測因子は現時点では見いだされていない。言うまでもなく、患者個々の治療効果を正確に予測し、適切な治療法を選択することは極めて重要である。特に近年、内分泌療法はLH-RHアゴニスト剤や複数の第3世代のアロマターゼ阻害剤の登場によって、急速に進歩しており、それに伴って治療の選択肢は多彩になってきており、それらの的確な選択、適応のためには、より精度の高い新しい効果予測因子が求められている。高精度な内分泌療法の効果予測は個々の乳癌患者の特性に合わせた個別化治療を可能にし、ひいては医療コストの低減にも貢献するであろう。

1. 乳癌に対する内分泌療法の概念

乳癌における内分泌療法の基本的な戦略は、エストロゲン依存性に増殖進展する乳癌細胞に対して、ERをブロックする、ないしはエストロゲンそのものの供給を遮断してしまうなどの手段により、その増殖を止めてしまう、あるいはアポトーシスを誘導するというものである。そのため、古くは閉経前の患者に対しては主要なエストロゲン産生臓器である卵巣を摘除するなどの手段がとられてきた。現在ではLH-RHアゴニスト剤を用いて卵巣に対するエストロゲン産生刺激をブロックすることによって同様の結果が得られるようになった。また、閉経後の乳癌患者に対しては抗エストロゲン剤、特にタモキシフェンが使われてきた。近年ではアロマターゼ阻害剤によって局所のエストロゲン合成を阻害することによって同等の、あるいは抗エストロゲン剤以上の効果が得られるようになってきた。これらの詳細は他稿を参照されたい。

いずれにせよ、乳癌における内分泌療法はエストロゲンシグナルのブロックが基本戦略であり、その戦略が奏効するか否かは乳癌細胞がエストロゲン依存性に増殖する性質を保持しているかどうかにかかっている。よって内分泌療法の奏効性は乳癌細胞のエストロゲン依存性の有無、あるいはその強弱にかかっているといえる。

Shin-ichi Hayashi: Department of Medical Technology, Course of Health Science, School of Medicine, Tohoku University 東北大学医学部 保健学科 検査技術科学専攻 基礎検査学講座

2. 術後内分泌療法感受性予測因子

乳癌の内分泌治療で最も多くの患者に施行されているのが術後の補助療法である。実地臨床で行われる乳癌の術後治療に関しては、St. Gallen 国際会議のような乳癌の初期治療の国際的合意を目的とした会議の結果が大きく影響する。2005年の会議ではリスクカテゴリーが大きく変更され¹⁾、腫瘍径、grade、年齢、リンパ節転移のほか新たに脈管侵襲、HER2発現などの因子が追加された。一方、ERとプロゲステロン受容体(PgR)はリスクから外され、ホルモン感受性、非感受性の分類に用いられている。その点からもER/PgRは予測因子として重要視されていることがわかる。

乳癌におけるホルモン受容体の発現の評価は、以前はEIA法が標準的に用いられてきたが、現在は免疫染色法で行われており、特に陽性細胞の占有率と染色強度を合わせて評価するAllredスコア分類²⁾、もしくはそれに準じた方法が用いられている。しかし、どの数値を閾値として内分泌療法適応群とするのが臨床最適であるかについてはいろいろな考え方があり、国際的に統一されているわけではない。特に染色強度に関しては各施設の手技、手法による違いが問題となるため評価が難しい。

一方、より正確に、かつ普遍的に奏効性が予測できるような新たな手法、因子を模索する基礎研究も進められている。分子レベルの因子としては、これまでもp53やBcl-2、Ki67、HER2などがレトロスペクティブに再発や生存率との関係から検討されてきた。しかし、その多くはいわゆる予後因子であって、内分泌療法の予測因子ではない。ただし、HER2に関してはトラスツズマブを用いる治療の効果予測因子といえる。また、pS2やカテプシンDなどの以前からよく知られているER標的遺伝子についても検討が行われてきたが、確立した評価は得られていない。ERの標的遺伝子についてはこれまで、培養細胞を用いた研究が中心であり、結果が特定の細胞株においてのみ観察されるものであることも多いと思われる(MCF-7でのみ誘導が

みられるpS2が良い例である)。

3. ER/PgR発現を予測因子とする問題点

内分泌療法の奏効性が癌細胞のエストロゲン依存性の有無に強く関連していると考えられることから、内分泌治療の対象がエストロゲン受容体を発現しているER陽性乳癌であることは理にかなっていると思われる。実際、過去においても、また現時点でも最も臨床の現場で汎用され、信頼性の高い分子レベルの予測因子はERの発現である。更にERの標的遺伝子の一つであるPgRも補助的に用いられている。

しかし、ERの発現があることがそのままエストロゲン依存性をもつということと同義でないことも事実であり、その点がERの発現と治療効果が一致しないことがあることやER陽性/PgR陰性のようなケースを生じる原因となっていると思われる。すなわち、ホルモン受容体の存在の有無だけを奏効性の判断基準とするのは万全でない。ERが蛋白として発現し、存在していても何らかの理由でその下流のシグナルカスケードが正常に機能していない場合などには、たとえER陽性と判定されても内分泌療法が奏効しないことは十分考えられる。

その場合、注意しなければならないことは、エストロゲンシグナルカスケードが正常に機能していないというケースも複数のパターンが考えられるという点である(図1)。例えばERを含む転写複合体の活性化がリガンド非依存的に起こっている場合(転写共役因子の過剰発現、リン酸化による恒常的活性化、ER自身のリン酸化による活性化等々)、あるいはERは存在していてもそのER関連シグナルカスケードに非依存性になっている、すなわちその経路をスキップし、増殖進展に必要としなくなっている場合などである。

それぞれのケースで、抗エストロゲン剤は無効であるがアロマターゼ阻害剤は奏効が期待される場合、あるいはその反対の場合、両者ともに奏効しない場合と、内分泌療法の奏効性にもいろいろなパターンが予想され、その状況は患者ごとに異なり、極めて複雑であることが予想

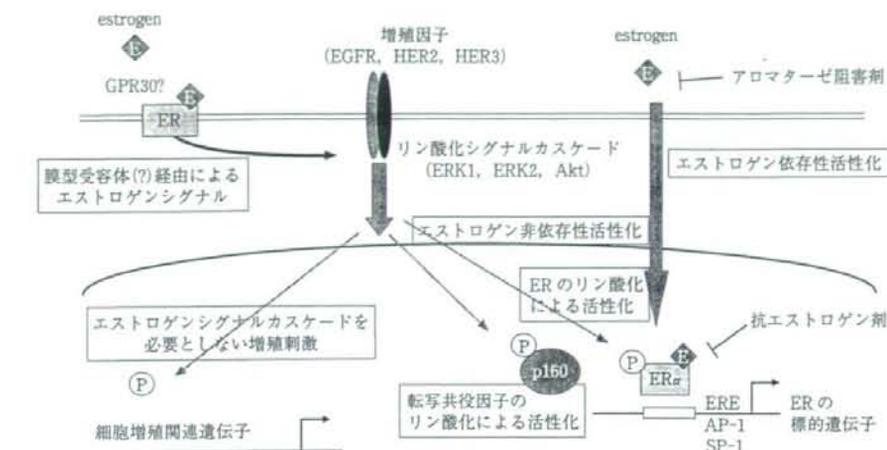


図1 内分泌療法の感受性予測を困難にしている複数のER活性化機構

される。抗エストロゲン剤の適応が良いのか、アロマターゼ阻害剤の適応が良いのか、あるいは具体的にどの薬剤が良いのか、患者ごとの正確な予測が可能な新たな予測因子が求められている。

4. 内分泌療法感受性予測の基礎研究

a. 発現プロファイル解析による感受性予測

このような問題を解決する手段の一つとして、乳癌で発現が変動しているエストロゲン標的遺伝子を網羅的に捕らえて、そのプロファイルを解析することにより、患者ごとのエストロゲンシグナル経路がどのような状況にあるのか把握し、最適な治療法を見出す、ということが考えられる。著者らは以前からこのような方法で内分泌療法の治療効果を詳細に予測することができないかという研究を行っている(図2)。本研究の詳細は原著^{3,6}や他の総説^{5,6}を参考にさせていただきたい。現在、これまでに同定、抽出した候補遺伝子数十個を搭載した新しいタイプのマイクロアレイ(3次元アレイ)⁷を用いて臨床応用の可能性を試みているが、更に研究が進んで、数個の新規候補遺伝子によって予測が可能になれば、従来の免疫染色法、ないしはマルチプレックスRT-PCR法などのより簡便な手法

によって奏効性予測が可能かもしれない。これまでの研究の過程で、HDAC6^{8,9}やIGFBP4、EGR3¹⁰などのエストロゲン応答遺伝子で、臨床病理学的因子や予後などに関連する新規因子を同定してきた。今のところ、これらはそれぞれ単独でER/PgRを凌駕するような強力な予測因子ではないようだが、診断用コンテンツとしては有用であろうと考えている。更に、今後の研究の進展とともに新たな因子が見いだされる可能性も考えられる。

b. アロマターゼ阻害剤の奏効性予測

閉経後の患者では卵巣機能の低下により血清中のエストロゲン濃度は低下するが、乳腺局所のエストロゲン濃度はある程度高いまま保たれている。現在閉経後内分泌療法の主流となりつつあるアロマターゼ阻害剤の作用機序は、局所でのアロマターゼを阻害して乳癌細胞へのエストロゲンの供給を遮断することである。癌細胞にもアロマターゼがあるという報告もあるが、大部分は腫瘍周囲の間質細胞に存在し、バラクリンにエストロゲンを供給している。ならば個々の乳癌に存在する間質の個性も治療効果に大きく影響するはずである。しかも癌細胞はエストロゲンだけでなく、他の増殖因子など、癌微小環境に存在する様々な因子によりその生存が



図2 内分泌治療感受性予測を目指した取り組み

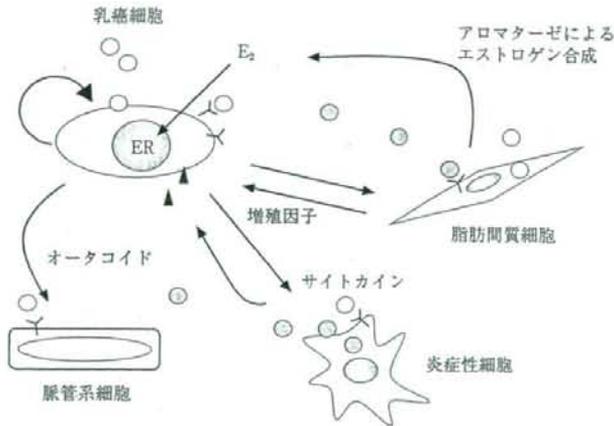


図3 乳癌の生存・増殖を支える局所のエストロゲンシグナルを中心とした微小環境

支えられている(図3)。著者らは実際にERを活性化する間質細胞の能力は症例ごとに異なっていることを最近明らかにした¹¹⁾。高精度な治療奏効性予測にはこれらの癌微小環境の特徴、個性を考慮することは必須であろう。そこで、そのための新しい解析法の開発を進めており、エストロゲンシグナル活性を反映して蛍光を発

する細胞やウイルスベクターを使用し、生検から得られた標本を用いて個々の乳癌の微小環境を解析する、あるいはアロマトラーゼ阻害剤の効果を *in vitro* で評価することが可能となった。再現性、汎用性を高めることが今後の課題であるが、臨床応用に向けた研究を継続している。

5. 術前内分泌療法感受性予測

近年、乳癌治療において化学療法を主体に術前治療が広範に行われているが、術前内分泌療法は術前化学療法とは単に用いる薬剤が違うだけでなく、生物学的背景が全く異なるため、その適応に対する考え方や期待される作用など、多くの異なった側面をもつ。ERの阻害、エストロゲン枯渇による治療という現在の内分泌療法は、その作用機序からして、元来、術前治療のような短期間での完全寛解を目指すものではない。しかし、pCRは得られなくても多くの症例で腫瘍の退縮がみられることは事実であり、その有用性は十分考えられ、今後の発展が期待される。現在の術前内分泌療法の効果予測は従来の臨床病理学的因子とホルモン受容体の有無しか確立されたものはないが、今後の発展のためにも新たな効果予測因子が求められる。内分泌療法反応性予測という点では、前述の術後補助内分泌療法の効果予測法ないしは因子と共通であることが期待できるが、術前治療の方が短期で治療効果との相関が検討できることから、研究としては結果を導きやすいと思われる。ただし、現時点では適応例が少なく、今後、質の高い系統的な臨床研究に付随したトランスレーショナル研究が必要である。現在は、術前治療そのものが術後補助療法の薬剤の選択、適応を決めるための試行的治療期間という側面もっており、その後の補助療法の重要性を考えるとこれも極めて重要と思われる。

一方で、前述のように術前内分泌療法ではpCR率は低くても、総合的な奏効率が高いと思われるが、その治療効果を明瞭に示すことができる客観的判定法はない。現状では触診計測、画像(超音波、マンモグラフィ、MRI)計測によって腫瘍縮小を判定している。そこで、分子生物学的治療効果判定法として治療前の生検標本と治療後の標本におけるエストロゲンカスケードの下流遺伝子群の発現を比較することで、エストロゲンシグナルを標的とした治療(すなわち内分泌療法)が効果的であったかどうかを判

定できないだろうか。著者らは数例の術前アロマターゼ阻害剤投与の症例から得られた治療前、治療後の標本を前述のエストロゲン応答性マイクロアレイで解析した結果、治療後に多くのエストロゲン応答遺伝子の発現が強く抑制されている症例とそうでない症例がみられることを観察した。ただし、エストロゲンシグナルが抑えられたからといって腫瘍が退縮するとは限らないという矛盾は、前項で述べたとおり理論的にもあり得ることであり、注意が必要である。この点、今後の更なる検討が必要である。

おわりに

内分泌療法は乳癌の生物学的特性に依存した治療法であるため、その治療効果は個々の腫瘍の生物学的個性に依存する。その個性の把握に個々の腫瘍のエストロゲンシグナル状態を知ることが重要であり、治療奏効性予測のためには必須と思われる。内分泌治療に限ったものではないが、遺伝子発現プロファイルから予後を判定しその結果を治療選択に反映していこうという臨床試験が欧米で行われている。その一つはマイクロアレイ解析研究から抽出した70遺伝子のセットを用いて解析し、予後不良のリスクの高い群、低い群を判定し、治療を選択する試みであり、もう一つは21遺伝子の発現をPCRによって判定(Oncotype DX™)し、同様に治療選択の指標にする試みである¹³⁾。今後このような、ある程度まとまった数の遺伝子の発現をプロファイルという形で捕らえ、スコア化して予後予測や感受性予測の指標とするという手法が一般的に普及してくる可能性は大いにある。このような遺伝子診断の流れは乳癌の診断と治療の領域にパラダイムシフトをもたらすであろう。

大規模な臨床試験の結果に基づいた、より良い標準治療の確立とともに、一方で癌の個性を重視した治療も重要となってくるのは疑いない。すなわち患者ごとの個別化内分泌療法が検討されるべき時期になっているように思われる。今後の新規感受性予測因子の研究と先端技術に基づく診断技術の進展が期待される。

■ 文 献

- 1) Goldhirsch A, et al; Panel members: Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 16: 1569-1583, 2005.
- 2) Allred DC, et al: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11: 155-168, 1998.
- 3) Inoue A, et al: Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol* 29: 175-192, 2002.
- 4) Yoshida N, et al: Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci* 95: 496-502, 2004.
- 5) Hayashi S: Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomed Pharmacother* 58: 1-9, 2004.
- 6) Hayashi S, Yamaguchi Y: Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 56: 27-31, 2005.
- 7) 坂本宙子, 林 慎一: 三次元マイクロアレイ. *医学のあゆみ* 218: 741, 2006.
- 8) Zhang Z, et al: HDAC6 expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 6962-6968, 2004.
- 9) Saji S, et al: Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 24: 4531-4539, 2005.
- 10) Inoue A, et al: Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 32: 649-661, 2004.
- 11) Yamaguchi Y, et al: Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. *Cancer Res* 65: 4653-4662, 2005.
- 12) Paik S, et al: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351: 2817-2826, 2004.