

- prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chrom Cancer* in press
- 2) Ohshima, J., Haruta, M., Arai, Y., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ariga, T., Okita, H., Fukuzawa, M., Hata, J., Horie, H. and Kaneko, Y. Two candidate tumor suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. *Genes Chrom Cancer* 48: 1037-1050, 2009.
  - 3) Kubo, T., Kuroda, Y., Shimizu, H., Kokubu, A., Okada, N., Hosoda, F., Arai, Y., Nakamura, Y., Taniguchi, H., Yanagihara, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 30: 1857-1864, 2009.
  - 4) Nakamura, Y., Migita, T., Hosoda, F., Okada, N., Gotoh, M., Arai, Y., Fukushima, M., Ohki, M., Miyata, S., Takeuchi, K., Imoto, I., Katai, H., Yamaguchi, T., Inazawa, J., Hirohashi, S., Ishikawa, Y. and Shibata, T. Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer* 125: 1859-1867, 2009.
  - 5) Kubo, T., Kuroda, Y., Kokubu, A., Hosoda, F., Arai, Y., Hiraoka, N., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing analysis of the human tyrosine kinase gene family in pancreatic cancer. *Pancreas* 38: e200-e206, 2009.
  - 6) Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M. and Morishita, K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 48: 768-776, 2009.
  - 7) Furukawa, S., Haruta, M., Arai, Y., Honda, S., Ohshima, J., Sugawara, W., Kageyama, Y., Higashi, Y., Nishida, K., Tsunematsu, Y., Nakadate, H., Ishii, M., Kaneko, Y. Yolk sac tumor but not seminoma or teratoma is associated with abnormal epigenetic reprogramming pathway and shows frequent hypermethylation of various tumor suppressor genes. *Cancer Sci.* 100: 698-708, 2009
2. 学会発表
    - 1) 新井康仁、細田文恵 他 : Identification of a novel tumor suppressor gene candidate in gastric cancer using SNP microarrays. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
    - 2) 細田文恵、新井康仁 他 : Cooperation of multiple oncogenes on chromosome 6p21 amplicon in gastric cancer. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
    - 3) 金子安比古、新井康仁 他 : 4q deletion identified by SNP array predicts poor outcome in patients with hepatoblastoma. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
    - 4) 大島淳二郎、新井康仁 他 : Candidate tumor suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
    - 5) 中村 裕、新井康仁 他 : Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
    - 6) 浜崎 誠、新井康仁 他 : NDRG2 is a candidate tumor suppressor gene in adult-T cell leukemia/lymphoma. 第 68 回日本癌学会学術総会記事、2009 年、10 月、横浜.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

分担研究報告書

乳癌のSNPアレイによるゲノム構造異常解析と術前化学療法の効果予測

研究分担者 武井 寛幸 埼玉県立がんセンター病院 科長 兼 部長

**研究要旨** 近年乳癌の術前化学療法が行なわれるようになり、治療成績改善への寄与が期待されている。化学療法のレジメンとして、anthracycline、taxanに加え、HER2陽性乳癌にHerceptinを使用することでpCR (pathological complete response) rateが向上した。既予後因子解析の結果、HER2陽性であっても、約15%はHerceptinに反応しない例があるなど、現在の予後因子では化学療法の効果予知が十分できてはいない。新たな予後因子の確立をめざして、SNPアレイによる乳癌のゲノム異常の解析を98例について実施した。ゲノム増減領域と化学療法反応性の関係では、17q (HER2) 領域増加腫瘍の治療反応性が良好であり、Herceptinの治療効果を反映していると考えられた。一方、HER2免疫染色陽性例の中にはHER2増幅例とHER2正常コピー数例があり、後者にHerceptin不応例が多かった。また、8q24領域増加と16q22領域欠失は治療反応性不良と相関した。前者にはMYC とPVT1、後者にはCDHI が位置しており、それぞれ有力な候補癌遺伝子、癌抑制遺伝子である。責任遺伝子を解明し、乳癌の診断・治療法の改善に役立てたい。

**A. 研究目的**

乳癌治療における術前化学療法は、術後化学療法と同様の治療効果があるとして、標準的治療法として確立しつつある。一方、術前化学療法の欠点として、効果がなかった場合、手術が遅れることである。したがって、化学療法の効果予測因子が重要となる。そこで、われわれは化学療法前に腫瘍組織を生検し、SNPアレイによりゲノム解析を行う。その結果明らかになったゲノム異常と術前化学療法の効果と関連性を検討する。化学療法の効果予知に役立つゲノム異常や遺伝子異常を確立することを研究の目的としている。

**B. 研究方法**

対象は埼玉県立がんセンター病院で2007年4月以降に術前化学療法を受けた浸潤性乳癌患者98症例である。そのうち化学療法後、手術を行い、病理学的に治療効果が判定できた患者は62例である。術前に針生検で腫瘍を採取し、凍結切片を作成する。腫瘍細胞が20%以上浸潤している検体からDNAを抽出した。また、

正常末梢血を採取し、腫瘍DNAの対照として用いた。DNA検体をSNPアレイ(Affymetrix mapping 250K-Nsp array)を用いてゲノム異常の解析を行った。化学療法はHER2免疫染色の結果、2+ (FISH+) と3+に対しては、Anthracycline、Taxan、およびHerceptin (ATH)、0、1、2 (FISH-) に対してはAnthracycline とTaxan (AT) を使用した。化学療法6コース終了後、手術を行い、組織学的治療効果の判定基準に従い、無効grade 0、やや有効1、かなり有効2、完全奏効3のいずれかに分類した。E-cadherinの免疫染色を16q22欠失例8例と16q22正常例15例に実施し、両者の関係を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、試料提供者の人権とプライバシーに十分な配慮のもと実施している。研究計画は、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けている。

**C. 研究結果**

化学療法前に針生検により腫瘍の得られた98例につき、SNPアレイによるゲノム増減の解析を行った。

全例になんらかのゲノム異常がみられた。異常の頻度は1～29箇所分布した。20例以上に共通した染色体増加領域は1q, 6p, 8p, 8q12, 8q24, 11q, 14q, 17q21, 17q24, 20qの10領域であり、20例以上に共通した染色体欠失領域は9p24, 9p21, 8p, 13q11-q14, 14q, 16q, 17pの7領域であった。

手術により、術前化学療法の効果判定可能であったのは62例であった。HER2免疫染色の結果、2+(FISH+)または3+であり、Herceptinを含む化学療法を受けた患者は23例おり、そのうちHER2(17q21.1)領域の増幅は17例にみられた。残り6例のHER2コピー数は正常であった。この6例では、遺伝子増幅以外の機構でHER2蛋白発現が増加していると考えられた。免疫染色2+(FISH+)4例のうち2例はHER2コピー数増加を、2例は正常HER2コピー数を示した。2+(FISH-)6例のうち1例はHER2コピー数増加を、5例は正常HER2コピー数を示した。このように、HER2免疫染色所見とHER2コピー数は必ずしも一致しなかった。Herceptinを含む化学療法を受けた23例をHER2増幅例17例とHER2正常コピー数例6例に分類し、術前化学療法の効果との関係を分析したところ、HER2増幅例は全例grade 2, 3と効果を示したが、HER2正常コピー数例は6例中1例のみがgrade 3を示し( $P < 0.001$ )、HER2正常コピー数例の中に治療抵抗性を示す腫瘍が多かった。

HER2以外のゲノム異常と術前化学療法の効果との関係を分析したところ、8q24(MYC)増幅例または16q22(CDHI:E-cadherin)欠失例の予後が、それぞれ、8q24正常コピー数例または16q22正常コピー数例に比して不良である傾向を示した( $P=0.076$ と $P=0.093$ )。E-cadherinの免疫染色を16q22欠失例8例と16q22正常例15例に実施したところ、陰性例は16q22欠失例に多かった( $P=0.008$ )。

#### D. 考察

術前化学療法を受けた乳癌98例をSNP array解析した結果、全例に何らかのゲノムコピー数異常を見出した。ゲノムコピー数異常の部位と数はさまざまであり、術前化学療法の適応になる臨床所見を示す腫瘍であっても、ゲノム異常はheterogeneousであることがわかった。HER2免疫染色の結果とHER2領域のゲノム増加との関係を分析したところ、HER2免疫染色陽性腫瘍の中にはHER2増幅例とHER2正常コピー数例があることがわかった。HER2増幅を認めた腫瘍は全例Herceptin

治療に反応しているが、HER2正常コピー数を示す6例中5例は治療に対する反応が不良であった。これまで私たちの行った乳癌患者の臨床的検討の結果、HER2免疫染色陽性であっても15%はHerceptin治療に反応不良であることがわかっている。Herceptin抵抗性乳癌は異常HER2転写産物を発現しているという報告がある。HER2免疫染色陽性、HER2正常コピー数を示す乳癌がHerceptin治療に対して反応不良の理由をHER2転写産物を分析することにより明らかにしたい。今後、多数例についてHER2免疫染色、HER2コピー数、HER2転写産物を分析し、その結果とHerceptin治療効果の関係を検討し、どのような、HER2解析法がHerceptin併用術前化学療法の効果を的確に予知するのか明らかにしたい。8q24領域増加を示す腫瘍と16q22領域欠失を示す腫瘍の化学療法への反応は不良であった。8q24領域にはMYC, PVT1などの癌遺伝子が、16q22にはCDHI(E-cadherin)などの癌抑制遺伝子が位置している。免疫染色の結果、16q22欠失例はE-cadherin陰性であることが多かった。乳癌細胞におけるE-cadherin消失は浸潤、転移を促進し、予後不良因子であることが報告されている。今後、CDHIのメチル化や遺伝子変異と予後や病期との関係を分析する予定である。

#### E. 結論

今回実施した乳癌のSNP array分析から、HER2免疫染色陽性であっても、HER2正常コピー数の腫瘍はHerceptinに対する反応が不良であることがわかった。これまで、HER2陽性腫瘍の約15%はHerceptinを含む術前化学療法に対して反応を示さないことがわかっている。その理由はHerceptin不応腫瘍は異常HER2転写産物を発現しているためと考えて、現在、発現解析を実施している。8q24領域増加と16q22領域欠失を示す腫瘍は治療反応不良と相関傾向を示した。この領域に位置する責任遺伝子が新たな分子標的になることを期待して、研究を進めている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Tozuka, K.,

- Asakawa, H., Oba, H., Inoue, K., Tabei, T. Positive sentinel lymph node biopsy predicts the number of metastatic axillary nodes of breast cancer. *The Breast*, 18;244-247, 2009.
- 2) Matsumoto, M., Sakamoto, H., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Sasano, H., Yaegashi, N., Hayashi, S. 3-Dimensional microarray analysis of breast cancer tissues: its potential clinical use in prognosis prediction and chemotherapy individualization. *Anticancer Res.*, 29(10)3971-3976. 2009.
  - 3) Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-Ma K, Ito I., Yamaguchi, Y., Ohie, SH., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, YI., Takei, H., Hayashi, SI., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K., Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat. Cell Biol.*, 11(3):312- 319, 2009.
  - 4) Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Ninomiya, J., Tozuka, K., Oba, H., Inoue, K., Nagai, S., Saito, Y., Kazumoto, T., Saitoh, Jun-ichi, Tabei, T. Axillary lymph node dissection can avoided in women with breast cancer with intraoperative, false-negative sentinel lymph node biopsies. *Breast Cancer*, 17:9-16, 2010.
2. 学会発表
- 1) Takei H.: Breast conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. Case-study. Kyoto Breast Cancer Consensus Conference. 2009. 4. 16-18. Kyoto, Japan
  - 2) Takei H., Ohsumi S, Shimozuma K, Takehara M, Suemasu K, Ohashi Y, Hozumi Y: Health-Related Quality of Life and Psychological Distress in Japanese Postmenopausal Women with Breast Cancer Treated with Tamoxifen, Exemestane or Anastrozole for Adjuvant Endocrine Therapy: A Final Analysis of National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (N-SAS BC) 04. The 32nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2009. 12. 10-13, San Antonio, TX, USA.
  - 3) 山口ゆり、井上賢一、清野祐子、田部井敏夫、武井寛幸、大庭華子、黒住昌史、林 慎一：乳癌のエストロゲンシグナルに対するアロマターゼ阻害剤 Exemestane の短期術前治療の効果. 第10回ホルモンと癌研究会. ワークショップVI「アロマターゼ」. 2009. 7. 31-8. 1. 仙台（東北大学大学院医学系研究科、林慎一教授）
  - 4) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析. 第10回ホルモンと癌研究会. ワークショップVI「アロマターゼ」. 2009. 7. 31-8. 1. 仙台（東北大学大学院医学系研究科、林慎一教授）
  - 5) 武井寛幸、吉田 崇、石川裕子、戸塚勝理、林 祐二、黒住昌史、大庭華子、井上賢一、永井成勲、田部井敏夫：年齢によるホルモン環境の変化と乳癌の臨床病理学的特徴および予後. パネルディスカッション1. 「ホルモン環境の変化と内分泌療法」. 第17回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京（ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授）
  - 6) 井本 滋、愛甲 孝、北島政樹、武井寛幸、和田徳昭、千葉明彦、柄川千代美、元村和由、増田慎三、坂本純一：T1-2N0 乳癌における標準的なセンチネルリンパ節生検法に確立に関する多施設共同研究. パネルディスカッション3. 「センチネルリンパ節生検の諸問題」. 第17回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京（ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授）
  - 7) 吉田 崇、武井寛幸、黒住昌史、石川裕子、林 祐二、戸塚勝理、樋口 徹、大庭華子、永井成勲、井上賢一、田部井敏夫：閉経後乳癌における術前ホルモン療法の位置づけ. 要望演題4「乳癌術前薬物療法」. 第21回日本内分泌外科学会総会. 2009. 5. 29-30. 岡山（岡山コンベンションセンター. 川崎医科大学 園尾博司）
  - 8) 戸塚勝理、武井寛幸、吉田 崇、二宮 淳、石川裕子、林 祐二、田部井敏夫、黒住昌史、井上賢一、大庭華子、永井成勲、末益公人、堀口 淳、飯野佑一、竹吉 泉：術前化学療法後の乳房温存療法症例の乳房内再発に関する臨床病理学的検討. シンポジウム6「乳がんの術前化学療法と手術療法」. 第109回日本外科学会定期学術集会.

2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
- 9) 石川裕子、武井寛幸、吉田 崇、二宮 淳、樋口 徹、林 祐二、大庭華子、黒住昌史：石灰化病変に対するステレオガイド下マンモトーム (ST-MMT) と超音波 (US) 所見の有無との関連性. 一般演題/口演 B-26 マンモトーム 2. 第 19 回日本乳癌検診学会総会. 2009. 11. 5-6. 札幌 (京王プラザホテル、浅石和昭)
  - 10) 吉田 崇、武井寛幸、石川裕子、林 祐二、樋口 徹、二宮 淳、大庭華子、黒住昌史：エコーガイド下針生検で非浸潤癌と診断された症例の検討. 一般演題/口演 B-18 細胞診・生検・病理. 第 19 回日本乳癌検診学会総会. 2009. 11. 5-6. 札幌 (京王プラザホテル、浅石和昭)
  - 11) 武井寛幸、吉田 崇、黒住 昌史、井上 賢一、石川 裕子、林 祐二、樋口 徹、二宮 淳、大庭 華子、永井 成勲、田部井 敏夫：腋窩リンパ節転移陽性乳癌における術前化学療法後の腋窩リンパ節転移状況の予測. 口演 41. 乳腺薬物療法 1. 第 47 回日本癌治療学会学術集会. 2009. 10. 22-24. 横浜 (パシフィコ横浜、岩手医科大学産婦人科 杉山 徹教授)
  - 12) 吉田 崇、武井 寛幸、石川 裕子、林 祐二、樋口 徹、二宮 淳、井上 賢一、永井 成勲、大庭 華子、黒住 昌史、田部井 敏夫：術前化学療法後の乳房温存療法症例の乳房内再発に関する臨床病理学的検討. 口演 33. 乳腺再発治療. 第 47 回日本癌治療学会学術集会. 2009. 10. 22-24. 横浜 (パシフィコ横浜、岩手医科大学産婦人科 杉山 徹教授)
  - 13) 樋口 徹、武井 寛幸、吉田 崇、黒住 昌史、石川 裕子、林 祐二、二宮 淳、大庭 華子、井上 賢一、永井 成勲、田部井 敏夫：乳癌リンパ管侵襲の予後予測因子としての意義ーリンパ節転移との関連性. 口演 90. 乳腺診断 2. 第 47 回日本癌治療学会学術集会. 2009. 10. 22-24. 横浜 (パシフィコ横浜、岩手医科大学産婦人科 杉山 徹教授)
  - 14) 吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、林 祐二、石川裕子、戸塚勝理、井上賢一、永井成勲、大庭華子、黒住昌史、田部井敏夫：乳房温存術後の乳房内再発形式と予後との検討. 口演 5 乳房温存 (1). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 15) 石川裕子、堀口 淳、林 光弘、多賀谷信美、吉田 崇、武井寛幸、黒住昌史、小山徹也：Triple negative (TN) 乳癌の組織亜型別無病再発期間 (DFS) の検討. 口演 2 2 トリプルネガティブ乳癌. 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 16) 井上賢一、永井成勲、戸塚勝理、林 祐二、石川裕子、二宮 淳、吉田 崇、武井寛幸、大庭華子、黒住昌史、田部井敏夫：ホルモン感受性閉経後乳がんにおける内分泌+化学療法術前治療の pilot 試験と SBCCSG13 試験について. 口演 2 6 術前化学療法 (2). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 17) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析. 口演 6 2 基礎 (1). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 18) 本田隆司、仲沢弘明、上村万理、清水忠夫、櫻井裕之、野崎幹弘、飯塚雅季、岡本高宏、久保和之、斎藤 喬、武井寛幸：Expander/Implant を用いた一期的乳房再建における乳房下溝作成の整容的意義. 口演 7 1 乳房再建 (2). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 19) 戸塚勝理、武井寛幸、吉田 崇、二宮 淳、林 祐二、石川裕子、井上賢一、永井成勲、大庭華子、川野輪香織、黒住昌史、田部井敏夫：アロマターゼ阻害剤投与後閉経後乳癌患者における再発危険因子の検討. 示説討論 5 4 予後因子 (1). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
  - 20) 永井成勲、井上賢一、戸塚勝理、石川裕子、林 祐二、吉田 崇、武井寛幸、黒住昌史、田部井敏夫：閉経後ホルモン感受性転移・再発乳癌に対する、

- アロマトーゼ阻害剤と LH-RH analogue 併用療法の検討. 示説討論 7 6 再発 (3). 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
- 21) 二宮 淳、大庭華子、武井寛幸、吉田 崇、林 祐二、石川裕子、戸塚勝理、井上賢一、黒住昌史、田部井敏夫: 術前ホルモン療法における Ki67 の発現と臨床病理学的効果との検討. 示説討論 6 9 術前ホルモン療法. 第 17 回日本乳癌学会学術総会. 2009. 7. 3-4. 東京 (ホテル日航東京・ホテルグランパシフィック LeDaiba、日本医大芳賀駿介教授)
- 22) 武井寛幸、吉田 崇、二宮 淳、石川裕子、林 祐二、戸塚勝理、黒住昌史、大庭華子、田部井敏夫、井上賢一、堀口 淳、飯野佑一、竹吉 泉: 乳癌におけるリンパ管侵襲の臨床的意義と治療法に関する検討. サージカルフォーラム. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
- 23) 吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、石川裕子、林 祐二、戸塚勝理、黒住昌史、大庭華子、田部井敏夫、井上賢一、飯野佑一、堀口 淳、竹吉 泉: 乳房温存療法後の乳房内再発に関する検討. サージカルフォーラム. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
- 24) 石川裕子、小山徹也、堀口 淳、林 光弘、多賀谷信美、吉田 崇、武井寛幸、飯野佑一、竹吉 泉: Triple negative 非浸潤性乳癌と浸潤性乳癌の免疫組織学的検討. ハイブリッドポスター. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
- 25) 林 祐二、武井寛幸、吉田 崇、二宮 淳、石川裕子、戸塚勝理、黒住昌史、大庭華子、田部井敏夫、井上賢一、堀口 淳、飯野佑一、竹吉 泉: 乳癌における乳房温存術およびセンチネルリンパ節政権の予後に及ぼす影響. ハイブリッドポスター. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009. 4. 2-4. 福岡 (九州大学 田中雅夫)
- 26) 樋口 徹、吉田 崇、石川裕子、林 祐二、大庭華子、永井成勲、井上賢一、武井寛幸、黒住昌史、田部井敏夫: 腫瘍マーカーの上昇を伴った乳腺炎を契機に発見された DCIS の 1 例. 第 6 回日本乳癌学会 関東地方会. 2009 年 12 月 5 日. 大宮 (ソニックシティ)
- 27) 永井成勲、井上賢一、樋口 徹、石川裕子、林 祐二、吉田 崇、武井寛幸、早瀬宣昭、本清史、大庭華子、黒住昌史、田部井敏夫: Lapatinib+ Capecitabine 療法で放射線照射後の乳癌脳転移巣が縮小傾向にある一例. 第 6 回日本乳癌学会 関東地方会. 2009 年 12 月 5 日. 大宮 (ソニックシティ)
- 28) 樋口 徹、林 祐二、吉田 崇、二宮 淳、石川裕子、大庭華子、井上賢一、永井成勲、武井寛幸、黒住昌史、田部井敏夫: インプラント再建後に局所再発した症例の検討. 第 40 回埼玉群馬乳腺疾患研究会. 2009. 6. 6. 大宮ソニックシティ (当番世話人 小島誠人)
- 29) 戸塚勝理、吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、石川裕子、浅川英輝、林 祐二、田部井敏夫、黒住昌史、井上賢一、小野亮子、下岡華子、川野輪香織、末益公人、堀口 淳、飯野佑一、竹吉 泉: 術前化学療法後の乳房温存療法症例の乳房内再発に関する臨床病理学的検討. 第 108 回日本外科学会定期学術総会 2008. 5. 15-17. 長崎 (長崎大学医学部、兼松隆之教授)
- 30) 黒住昌史、武井寛幸: 乳癌のセンチネルリンパ節微小転移診断法としての real-time RT-PCR 法の有用性と複数マーカー検索の意義. パネルディスカッション 2 「センチネルリンパ節生検の state-of-the-art」 第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生. 大阪国際会議場)
- 31) 吉田 崇、武井寛幸、二宮 淳、林 祐二、石川裕子、浅川英輝、戸塚勝理、井上賢一、小野亮子、大庭華子、川野輪香織、黒住昌史、田部井敏夫: 若年者乳癌に関する臨床病理学的検討. ワークショップ 1 「若年者乳癌をめぐる諸問題」. 第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪府立成人病センター 稲治英生. 大阪国際会議場)
- 32) 武井寛幸、吉田 崇、黒住昌史、石川裕子、戸塚勝理、林 祐二、浅川英輝、大庭華子、川野輪香織、小野亮子、井上賢一、田部井敏夫: 乳癌センチネルリンパ節生検 (SLNB) の術中迅速病理診断偽陰性例に腋窩郭清 (ALND) は必要か. 第 16 回日本乳癌学会学術総会. 2008. 9. 26-27. 大阪 (大阪

- 府立成人病センター 稲治英生. 大阪国際会議場)
- 33) 川野輪香織、黒住昌史、大庭華子、戸塚勝理、浅川英輝、石川裕子、林 祐二、二宮 淳、吉田 崇、武井寛幸、小野亮子、井上賢一、田部井敏夫：トリプルネガティブ乳癌（TN）に対する術前化学療法（NAC）の組織学的効果と効果予測因子についての検討．第16回日本乳癌学会学術総会．2008. 9. 26-27. 大阪（大阪府立成人病センター 稲治英生. 大阪国際会議場）
- 34) 武井寛幸、黒住昌史、吉田 崇、石川裕子、戸塚勝理、林 祐二、小野亮子、大庭華子、川野輪香織、井上賢一、田部井敏夫：リンパ節転移陽性乳癌に対する術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検の有効性（口演）．第46回日本癌治療学会総会．2008. 10. 30. -11. 1. 名古屋（平川弘聖、大阪市立大学 腫瘍外科学）
- 35) 武井寛幸：2. 乳癌ホルモン療法一過去から未来へー．特別企画「過去から学ぶ現在の治療」．第5回日本乳癌学会関東地方会．2008. 12. 13. 大宮ソニックシティ（当番世話人 堀口 淳）．

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

乳癌の新規診断法によるホルモン療法の効果予測

研究分担者 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 分子機能解析学分野 教授

**研究要旨** 乳癌のホルモン療法の治療効果予測法の確立を目指した研究を行った。ERE-GFP レポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込んだものを用い、乳癌検体の癌細胞に導入して、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。また、それらの標品のERの標的遺伝子の発現を解析し、ERの発現とERの活性との相関を検討した。その結果、ERタンパク発現とERmRNA発現は良く相関するが、ERE活性とは傾向はあるものの有意な相関を示さなかった。ERE活性はむしろPgRタンパクやPgRmRNAと相関した。ERの標的遺伝子のmRNAはER陽性群の中でER発現と良く相関した。以上のことから現在の診断指標であるERタンパクの発現は、ERの転写活性を必ずしも反映していないことが示された。ERE活性がどのような診断指標としてどのような意味を持つのか、今後の研究が必要である。この点に関しては術前治療の生検標品のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較を継続している。また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌におけるER活性の評価も症例数を蓄積しつつ継続している。

**A. 研究目的**

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

**B. 研究方法**

- 1) ERE-GFP レポーターカセットをアデノウイルスベクターに組み込んだものを用い、乳癌検体の組織をコラゲナーゼで処理し、調製された分散細胞の初代培養に感染導入して、3日後のGFP活性を測定することによって、個々の癌細胞自身のER活性を解析した。
- 2) また、それらの標品中の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の発現をReal-Time RT-PCR法で解析し、それらの遺伝子の発現とERの発現、およびERE-GFP活性との相関を検討した。
- 3) さらに現在術前治療の生検標品に対して上述のウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較のデータを蓄積している。
- 4) 一方、アロマターゼ阻害剤治療後再発乳癌のERE活性を同様のウイルスアッセイによって解析し、その症例数を蓄積している。
- 5) また、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療法開発のための基礎研究として、ERE-GFPを安定導入したER陽性乳癌培養細胞株MCF-7-E10細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株を複数株樹立し、耐性の

メカニズムの解明を進めた。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

1) ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析した。また、それらの標品の ER の標的遺伝子 HDAC6、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、PgR と既知の予後因子、MIB-1、HER2、Bcl-2、ER の発現を Real-Time RT-PCR 法で解析し、それらの遺伝子の発現と ER の発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。その結果、ER タンパクの発現および mRNA の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、むしろ PgR のタンパクや mRNA 発現と正の相関を示すことが明らかとなった。また、ER 標的遺伝子群の mRNA と ERE 活性は、ER 陽性群において総じて正相関する傾向にあることが明らかとなった。また、興味深いことに ER 陽性で ERE 活性が高い群において ERE 活性と Her2 発現が正相関することが観察された。

2) さらに現在術前治療の生検標品に対して上述の ERE-GFP ウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較のデータを蓄積している。

3) これまで十数例のアロマターゼ阻害剤投与後再発症例の検体を入手して ERE-GFP ウイルスアッセイを行なったところ、アロマターゼ阻害剤耐性と考えられる症例であるにも関わらず、ER 活性を有しているものが多く観察された。また、これらに対して *in vitro* で抗エストロゲン剤が効果を示したものがみられた。

4) そこで、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、MCF-7-E10 細胞を用いて、その長期エストロゲン枯渇耐性株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇培地で長期間培養し、耐性となって再び増殖するようになった細胞のコロニーを蛍光顕微鏡下で観察し、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高い ERE 活性を示すコロニーを選択的に単離、培養し、その様な複数の株を樹立した。それらの株について各種解析を行ったところ、MAPK 系や AKT 系のリン酸化過剰は認められず、従来報告されているエストロゲン枯渇耐性株とは異なったメカニズムで、ER が恒常的活性化をしている可能性

が示唆された。現在さらに詳細に検討中である。

### D. 考察

我々はこれまで、基礎研究として癌細胞におけるエストロゲンの作用の分子機序を解明する一助とするため、エストロゲン応答遺伝子を搭載した、エストロゲン応答マイクロアレイチップを開発し、様々な研究を行ってきた。それらの研究で、HDAC6 や EGR3 などいくつかの遺伝子については実際に乳癌の予後と相関することが示された。そこで、臨床応用研究として、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てきた。昨年用いた新型のマイクロアレイ装置である 3 次元型アレイチップによる解析では、約 27 症例の原発乳癌を明瞭に 2 群に層別化でき、搭載コンテンツの有用性が示された。一方、最小限の遺伝子セットの候補遺伝子が絞られれば、マイクロアレイでなく、より臨床に導入しやすい RT-PCR での診断キット化も可能かもしれない。そこでマイクロアレイ研究からその臨床的有用性を確認できたエストロゲン応答遺伝子群について、既知の予後因子とともに、Real-Time RT-PCR 法によって 60 例以上の乳癌症例を解析した。さらに解析対象は、より臨床で容易に実現可能なものとするため、パラフィン包埋標品とすることを試みた。その結果、その後の解析に耐えうる十分な品質の RNA が得られることを確認した。そしてほとんどの症例と遺伝子において定量的解析が可能なが示され、臨床への実用化に大きく近づいたと思われる。今後、臨床的有用性を確立するため、本法を用いて、ホルモン療法の反応性のデータとその他の臨床病理学的データが整えられている症例についての厳密なスタディを計画する必要がある。

さらに、ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析したところ、それらの活性には高いものから低いものまで多様な個性があることが明らかとなった。そしてその ERE 活性は免疫染色で判定した ER の発現とは必ずしも相関しないことが明らかとなった。ER の発現は現在臨床で用いられている主要なホルモン療法の予測因子であり、また一方、ER 陽性と判定された症例でも、ホルモン療法が奏効しない症例も多くあることも知られている。ERE 活性を見ることが ER の正しい機能を評価することになるのか、それがホルモン療法の奏効性予測に

重要な意味を持つのかは臨床的にも非常に重大な問題である。そこで、さらに ERE 活性を検討した症例について、標品の ER の標的遺伝子の発現を Real-Time RT-PCR 法で解析し、標的遺伝子の発現と ER の発現、および ERE-GFP 活性との相関を検討した。その結果、ER タンパクの発現および mRNA の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、むしろ PgR のタンパクや mRNA 発現と正の相関を示すことが明らかとなった。また、ER 標的遺伝子群の mRNA と ERE 活性は、ER 陽性群において総じて正相関する傾向にあることが明らかとなった。また、興味深いことに ER 陽性で ERE 活性が高い群において ERE 活性と Her2 発現が正相関することが観察された。全体的に ER の発現はその活性や標的遺伝子の発現とは有意に相関しない傾向が明らかとなり、今後、ER 活性はどのような臨床的意義を持つのかを検討する必要がある。それらの結果如何では従来の ER による診断法を大きく見直す必要性が出てくるかもしれない。

また現在、術前のホルモン療法の試みが行なわれつつあるが、術前化学療法とは異なり、その効果判定には困難な点が多く、その後の治療選択に曖昧さをもたらしている。そこで、術前治療の生検標品に対して上述の ERE-GFP ウイルスアッセイを行い、臨床効果との比較のデータを蓄積しているが、まだ意味ある数には至っていない。今後さらにデータを蓄積して、この点においても ERE-GFP アッセイが有用かどうかを検証していきたい。

さらに、他施設も含め、十数例のアロマターゼ阻害剤投与後再発症例の検体を入手して ERE-GFP ウイルスアッセイを行なったところ、アロマターゼ阻害剤耐性と考えられる症例であるにも関わらず、ER 活性を有しているものが多く観察された。このことは引き続き 2 次治療としてホルモン療法の適応の可能性が残されていることを示しており、このことは *in vitro* で抗エストロゲン剤の効果が認められたことから示唆された。さらに、これらの結果は耐性獲得のメカニズムが一様でないことも示しており、そのメカニズムの解明によって他の有効な治療法の選択や開発も可能になると思われる。そこで、アロマターゼ阻害剤抵抗性乳癌の治療選択や治療法開発のための基礎研究として、そのモデル細胞となるよう MCF-7-E10 細胞を用いて、ER を恒常的に活性化して長期エストロゲン枯渇に耐性となった株の樹立を試みた。すなわち、エストロゲン枯渇にも関わらず蛍光を発し、高い ERE 活性を示す株を複数

樹立した。現在順次、それらの細胞株の性質を詳細に調べているが、これまでのところ、MAPK 系や AKT 系のリン酸化の過剰は認められず、従来報告されているエストロゲン枯渇耐性株とは異なったメカニズムで、ER が恒常的に活性化をしている可能性が示唆された。網羅的リン酸化プロテオミクス解析も行い、現在さらに詳細に検討中である。

## E. 結論

新規診断法開発を目的として ERE-GFP アデノウイルスベクターを用い、60 数例の個々の癌細胞自身の ER 活性を解析し、さらにそれらの検体のエストロゲン応答遺伝子、HDAC6、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、PgR と既知の予後因子、MIB-1、HER2、Bcl-2、ER について Real-Time RT-PCR 法で mRNA 発現を解析した。その結果、ER の標的遺伝子の発現と免疫染色法による ER の発現と ERE 活性は必ずしも相関しないこと、ER 標的遺伝子と ERE 活性は相関する傾向にあることが明らかとなった。今後、臨床的有用性評価のために適切な症例群についての綿密な試験を行なう必要がある。

さらに現在術前治療の生検標品に対して上述の ERE-GFP ウイルスアッセイを行い、術前ホルモン療法の臨床効果との比較のデータを蓄積している。また、数例のアロマターゼ阻害剤投与後再発症例の検体について ERE-GFP ウイルスアッセイにおいて、ER 活性を有しているものが多く観察され、また、これらに対して *in vitro* で抗エストロゲン剤が効果を示したものがみられた。そこで、MCF-7-E10 細胞を用いて、AI 耐性モデル細胞株の樹立を試み、ER が恒常的に活性化している株を複数樹立し、それらの細胞株の性質を詳細に調べた結果、従来の耐性株とは異なったメカニズムの存在が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, 56(1), 1-7, 2009.
- 2) 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.*, Mar. 11(3), 239-241, 2009.
- 3) Azuma, K., Urano, T., Horie, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. and Inoue, S. Association of Estrogen Receptor and Histone Deacetylase 6 Causes Rapid Deacetylation of Tubulin in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, 69 (7), 2935-2940, April, 2009.
- 4) Hayashi, S., Niwa, T. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. *Cancer Sci.*, 100(10), 1773-1778, 2009. (Jun)
- 5) Matsumoto, M., Sakamoto, H., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosuni, M., Sasano H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. 3-Dimensional microarray analysis of estrogen signal-related genes in breast cancer tissues. *Anticancer Res.*, 29(10) 3971-3976, 2009.
- 6) Kato, K., Takao, T., Kuboyama, A., Tanaka, Y., Ohgami, T., Yamaguchi, S., Adachi, S., Yoneda, T., Ueoka, Y., Kato, K., Hayashi, S., Asanoma, K. and Wake, N. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am. J. Pathol.*, 176(1), 381-392, 2010.
- 7) Imach, H., Murao, K., Dobashi, H., Bhuyan, M. M., Cao, X., Kontani, K., Niki, S., Murazawa, C., Nakajima, H., Kohno, N., Yamashita, H., Iwase, H., Hayashi, S., Ishida, T. and Yamauchi, A. Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* In press, 2010.
- 8) 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) 医薬ジャーナル社, p53-63, 2009.
2. 学会・研究会発表
- 1) 林 慎一 : 特別講演. エストロゲンシグナルの可視化とその臨床応用. 熊本乳癌カンファレンス (熊本) 2009年2月14日(土)
- 2) 林 慎一 : 特別講演. 乳癌の個別化とエストロゲンシグナル. 第26回信州内分泌談話会 (松本) 2009年2月21日(土)
- 3) 林 慎一 : Breast Cancer Education TV Seminar. AstraZeneca Breast Cancer TV lecture (東京) 2009年5月8日(金)
- 4) 林 慎一 : 特別講演. ホルモン療法の奏効性予測とAI耐性機序. Meet The Professors (横浜) 2009年6月26日(金)
- 5) 林 慎一 : 特別講演. アロマターゼ阻害剤耐性機序の基礎研究と治療戦略. 第17回日本乳癌学会学術総会ランチョンセミナー4 (東京) 2009年7月3日(金) 11:50~12:50
- 6) 林 慎一, 山口ゆり : シンポジウム. 乳癌における治療効果予測因子の現状と今後の展望. 第17回日本乳癌学会学術総会 (東京) 2009年7月3日(金) 15:00~17:00
- 7) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi : Simposia. Growth factors and estrogen signaling implicated in the hormonal therapy for human breast cancer. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology ICE 2010 (Kyoto) 2010/03/29 (Mon)
- 8) Shin-ichi Hayashi : Simposia. Translational research of estrogen signaling for hormonal therapy in breast cancer. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology ICE 2010 第83回日本内分泌学会学術総会 JES-Sponsored Symposia (kyoto). 2010/03/29 (Mon)
- 9) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi : Symposium. Classification of breast cancer by estrogen signaling and acquisition of ai-resistance. 第23回国際がん研究シンポジウム (東京) 2010年4月23日(金) 13:10~13:30
- 10) 東 浩太郎, 堀江 公仁子, 大内 尉義, 林 慎一, 堺 隆一, 井上 聡 : Tubulin 脱アセチル化を介するエストロゲンおよび SERM の新規核外作用. 第5回 SERM 学術研究会学術集会 2009
- 11) S Saji, N Honma, M Hirose, S Hayashi, K Kuroi : Translational cell study exploring the role of

- Estrogen Receptor beta expression as a predictive and/or prognostic factor in breast cancer patients. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2009.
- 12) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質繊維芽細胞の特性の解析. 第 17 回日本乳癌学会学術総会（東京）2009 年 7 月 4 日（土）9:30～9:40
  - 13) 林 慎一、山口ゆり：エストロゲン依存性腫瘍（乳癌、子宮内膜癌）の癌特異的微小環境への喫煙の影響. 第 24 回平成 20 年度助成研究発表会（東京）2009 年 7 月 16 日（木）9:10～9:20
  - 14) 今野広海、郷野辰幸、植松智有希、清野祐子、今見考志、石濱 泰、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：リガンド非依存的な ER 活性化を呈するホルモン療法耐性モデル乳癌細胞株の樹立. 第 19 回乳癌基礎研究会（群馬県渋川市）2009 年 7 月 26 日（日）9:15～9:30
  - 15) 郷野辰幸、清野祐子、松本光代、大庭華子、黒住昌史、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：新規エストロゲン応答遺伝子の発現解析と乳癌個別化への応用の検討. 平成 21 年度がん特定若手研究者ワークショップ（長野）2009 年 9 月 2 日（水）～5 日（土）
  - 16) 今野広海、郷野辰幸、植松智有希、白山知子、清野祐子、今見考志、石濱 泰、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：エストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株を用いたリガンド非依存性 ER 活性化メカニズムの検討. 第 10 回ホルモンと癌研究会（仙台）2009 年 7 月 31 日（金）13:40～13:50
  - 17) 郷野辰幸、清野祐子、松本光代、大庭華子、黒住昌史、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：新規エストロゲン応答遺伝子の発現解析と乳癌個別化への応用の検討. 第 10 回ホルモンと癌研究会（仙台）2009 年 7 月 31 日（金）15:10～15:20
  - 18) 山口ゆり、井上賢一、清野祐子、田部井敏夫、武井寛幸、大庭華子、黒住昌史、林 慎一：乳癌のエストロゲンシグナルに対するアロマターゼ阻害剤 Exemestane の短期術前治療の効果. 第 10 回ホルモンと癌研究会（仙台）2009 年 8 月 1 日（土）9:30～9:40
  - 19) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質繊維芽細胞の特性の解析. 第 10 回ホルモンと癌研究会（仙台）2009 年 8 月 1 日（土）9:40～9:50
  - 20) 山口ゆり、井上賢一、清野祐子、武井寛幸、大庭華子、黒住昌史、林 慎一：乳癌のエストロゲンシグナルに対するエグゼメスタンの短期術前治療による効果. アロマターゼ阻害剤 Exemestane の短期術前治療の効果. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 2 日（金）16:55～17:05
  - 21) 今野広海、郷野辰幸、植松智有希、白山知子、山口ゆり、清野祐子、今見考志、石濱 泰、丹羽俊文、林 慎一：エストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株を用いたリガンド費依存性 ER 活性化メカニズムの検討. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 2 日（金）17:15～17:25
  - 22) 大庭華子、清野祐子、小林康人、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質繊維芽細胞の特性の解析. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 2 日（金）17:25～17:35
  - 23) 郷野辰幸、清野祐子、松本光代、大庭華子、黒住昌史、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：新規エストロゲン応答遺伝子の発現解析と乳癌個別化への応用の検討. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 2 日（金）16:00～16:10
  - 24) 丹羽俊文、藤谷この美、高橋 綾、山口 裕、今野広海、郷野辰幸、林 慎一：乳癌細胞膜型 ER に対する選択的リガンドの開発. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 2 日（金）16:20～16:30
  - 25) 神代理史、土屋 舞、大家祥平、仲島由佳、山口ゆり、伊藤一明、林 慎一、黒住昌史、村山明子、木村圭志、柳澤 純：ユビキチンリガーゼ CHIP は乳癌の悪性を抑制する. 第 68 回日本癌学会学術総会（横浜）2009 年 10 月 3 日（土）16:50～17:00
  - 26) 今野広海、植松智有希、郷野辰幸、清野祐子、今見考志、石濱泰、丹羽俊文、山口ゆり、林 慎一：エストロゲン受容体の恒常的活性化を呈するエストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株の樹立. 第 17 回日本ステロイドホルモン学会（福岡）2009 年 11 月 14 日（土）10:15～10:30

- 27) 丹羽俊文、佐藤哲史、藤谷この美、高橋 綾、山口 裕、今野広海、郷野辰幸、林 慎一：細胞膜型エストロゲン受容体信号経路解析を目的とする選択的リガンドの創製. 日本薬学会第130年会(岡山) 2010年3月28~30日
- 28) Yuri Yamaguchi, Hanako Oba, Ken-ichi Inoue, Yuko Seino, Toshio Tabei, Hiroyuki Takei, Masafumi Kurosumi, Sin-ichi Hayashi : Evaluation of tumor microenvironment-regulated estrogen signals in individual breast cancers and their adjacent stromal fibroblasts. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (Kyoto) March 26-30, 2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願3件

- 1) 出願番号：特願2005-160621  
出願日：2005.05.31  
名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願2005-160685  
出願日：2005.05.31  
名称：細胞分析方法
- 3) Application No./Patent No. : 06756855.0-1222  
PCT/JP2006310935  
Date : 08.02.08  
Title : A transgenic cell and method for cell analysis.

分担研究報告書

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

研究分担者 角 純子 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 主任研究員

研究要旨 NM23 を高発現している白血病では血清 NM23 蛋白質レベルも高く、生存率において有意な独立した予後不良因子となる。血清のような細胞外環境における NM23 分子は初代培養白血病細胞の増殖・生存を促進する。この増殖・生存促進活性は血清 NM23 蛋白質レベルが予後不良因子となる生物学的機能基盤と推察されるが、その分子機構は明らかにされていない。この NM23 と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関連した新しい分子標的を開発することを目指している。これまでに白血病細胞から7個の NM23 結合候補蛋白質を同定しているが、今年度は NM23 の受容体候補分子として報告された腫瘍抗原 MUC1 (a membrane-bound MUC1 cleavage product=MUC1\*)の白血病細胞における発現と機能を検討した。MUC1\*の細胞外ドメインペプチドを抗原として MUC1\*を検出するための特異抗体を作製した。この抗体は、白血病細胞においては分子サイズ 33kDa の MUC1\*抗原 (MUC1\*-33) を認識した。MUC1\*-33 は、慢性骨髄性白血病細胞 (K562/KU812/MEG01) や赤白血病細胞 (HEL/TF1/M6) で発現していたが、他の骨髄性白血病細胞 (NB4/HL60/THP1) では顕著な発現は認められなかった。白血病臨床検体における MUC1\*-33 発現解析から、細胞外 NM23 に反応して増殖した白血病細胞は MUC1\*-33 を高発現していることが明らかになった。MUC1\*の発現 (受容体) と細胞外 NM23 (リガンド) に対する反応性には顕著な関連があることを示している。今後、MUC1\*発現細胞の生物学的特性および臨床的意義の解析へ進める。

A. 研究目的

がん転移関連遺伝子 NM23 は、多くの腫瘍で高発現している。白血病における NM23 の高発現は、白血病細胞の生物学的特性 (分化抑制/増殖促進) やその臨床的特性 (予後不良) と関連する。NM23 を高発現している白血病では血清 NM23 蛋白質レベルも高く、生存率において有意な独立した予後不良因子となる。血清のような細胞外環境における NM23 分子は初代培養白血病細胞の増殖・生存を促進する。この増殖・生存促進活性は血清 NM23 蛋白質レベルが予後不良因子となる生物学的機能基盤と推察されるが、その分子機構は明らかにされていない。一方、神経芽腫では分化誘導や予後不良と関連し、乳がんでは転移能抑制や予後良好と関連する。がん細胞の特性発現における NM23 の多彩な作用は、NM23 と相互作用する蛋白質の存在によると示

唆されている。この NM23 と相互作用する蛋白質の探索という新しい視点から、がん細胞の特性に関連した新しい分子標的を開発することを目指している。これまでに白血病細胞から7個の NM23 結合候補蛋白質を同定しているが、今年度は NM23 の受容体として報告された腫瘍抗原 MUC1 の a membrane-bound MUC1 cleavage product (MUC1\*)の白血病細胞における発現と機能を解明し、NM23 高発現白血病の診断治療の分子標的として発展させることを目標としている。

B. 研究方法

1. NM23 受容体候補 MUC1\*の特異抗体作製
  - ・ MUC1\*細胞外ドメインペプチド合成
  - ・ キャリアー蛋白の結合
  - ・ ウサギ (3羽) 免疫

- ・採血
- ・抗体評価
- 2. 白血病細胞における MUC1\*発現解析
  - ・諸種白血病細胞抽出液調整
  - ・western blotting による発現検証
- 3. 白血病細胞の増殖分化における MUC1\*の発現動態解析
- 4. 臨床検体における MUC1\*発現と NM23 に対する反応性の関連解析
- 5. MUC1\*発現と血清 NM23 蛋白質レベル併用の臨床的意義の検討

### C. 研究結果

1. 白血病細胞における NM23 受容体候補 MUC1\*の発現を調べるために、MUC1\*の細胞外ドメインペプチドを抗原として MUC1\*抗体を作製した。MUC1\*の細胞外ドメインペプチド CNVHDVETQFNQYKTEAAS を合成し、これを抗原として3羽のウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を得た。抗原カラムにて特異精製抗体を得た（免疫生物研究所との共同研究）。
2. 乳癌細胞 T47D を MUC1\*発現陽性の対照として、各種白血病細胞における MUC1\*の発現を検討した。乳癌細胞の MUC1\*-2 3 kDa とは異なり、白血病細胞では3抗体とも共通して分子サイズ 33kDa の蛋白 (MUC1\*-33) を認識した。
3. 抗原ペプチドで完全に中和されることから、これらの抗体は抗原ペプチド特異的に MUC1\*-33 を認識していると考えられた。
4. MUC1\*-33 の発現は、細胞外 NM23 に反応性があり、その受容体の存在が想定される白血病株細胞 (K562/HEL/KU812/M6) で検出されたが、細胞外 NM23 に反応性のない、白血病株細胞 (HL60/NB4/THP1) では検出されなかった。MUC1\*の発現(受容体)と細胞外 NM23 (リガンド)に対する反応性とは顕著な相関が見られた。
5. K562 細胞を用いた発現解析から、MUC1\*-33 の発現は細胞増殖に伴ってその発現が変動することが示された。
6. 急性骨髄性新鮮白血病細胞においても MUC1\*-33 の発現が認められ、細胞外 NM23 蛋白質の機能(増殖促進活性)に対する感受性と顕著に相関することが明らかになった。

### D. 考察

細胞外環境にある NM23 蛋白質が腫瘍抗原 MUC1\*に結合し、その下流シグナル伝達系を活性化し、白血病細胞の増殖を促進する構図が示された。多くのがん細胞において MUC1\*が高発現していることを考えると、血清 NM23 蛋白質レベルの臨床的意義が大きくなっていく。リガンド血清 NM23 とその受容体 MUC1\*の両発現解析により、予後予測精度の向上を図ることが可能になってきた。さらなる臨床応用に向けて MUC1\*抗体の開発・改良 (Flow cytometry 適用抗体・治療分子標的薬としての MUC1\*シグナル抑制抗体等) を目指したい。

### E. 結論

白血病細胞の増殖・生存の促進因子となる血清 NM23 蛋白の受容体 MUC1\*を検出するための特異抗体を作製した。この抗体を用いて、白血病細胞における新規 MUC1\*-33蛋白を同定した。MUC1\*-33の発現は白血病細胞の細胞外 NM23 に対する反応性と顕著な相関があり、細胞の増殖に伴ってその発現が変動した。今後、診断治療の分子標的としての新しい NM23 受容体候補分子 MUC1\*-33 の生物学的および臨床的意義を解明していく予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, T., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth/survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci.* 100:1885-1894, 2009
- 2) Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Extracellular NM23-H1 protein inhibits the survival of primary cultured normal human peripheral blood mononuclear cells and activates the cytokine production. *Int. J. Hematol.* 90:143-152, 2009

#### 2. 学会発表

- 1) 角 純子、粕壁 隆、萩原由貴、金子安比古

「Expression of NM23-interacting proteins in leukemia cells」第71回日本血液学会（2009.10, 京都）

- 2) 角 純子、粕壁 隆、萩原由貴、本間良夫、金子安比古「MUC1 expression in leukemia cells as a possible receptor of extracellular NM23 protein」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 3) 萩原由貴、粕壁 隆、金子安比古、新津 望、角 純子「Ellagic acid induces apoptosis and enhances ATRA-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 4) 粕壁 隆、角 純子、本間良夫「Rapamycin and arsenic trioxide synergistically induce apoptosis of human ovarian cancer cells.」第68回日本癌学会学（2009.10, 横浜）
- 5) 粕壁 隆、角 純子、本間良夫「新規分化誘導剤コチレニンAによる固形癌細胞の増殖抑制の分子基盤の解析」第13回日本がん分子標的治療学会（2009.6, 徳島）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

角 純子

「NM23 蛋白質の測定方法及びそれを用いた悪性腫瘍の診断方法」

特許第3557367号.

平成16年5月21日 特許権取得.

現在維持継続中

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Fukushi, D., Watanabe, N., Kasai, F., Haruta, M., Kikuchi, A., Kikuta, A., Kato, K., Nakadate, H., Tsunematsu, Y., Kaneko, Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy divergence, but not with *MYCN* amplification in neuroblastoma tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 188: 32-41, 2009.
2. Furukawa, S., Haruta, M., Arai, Y., Honda, S., Ohshima, J., Sugawara, W., Kageyama, Y., Higashi, Y., Nishida, K., Tsunematsu, Y., Nakadate, H., Ishii, M., Kaneko, Y. Yolk sac tumor but not seminoma or teratoma is associated with abnormal epigenetic reprogramming pathway and shows frequent hypermethylation of various tumor suppressor genes. *Cancer Sci.*, 100: 698-708, 2009.
3. Oue T, Fukuzawa M, Okita H, Mugishima H, Horie H, Hata J, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate H, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Kitano Y, Tanaka Y; Japan Wilms Tumor Study (JWiTS) Group. Outcome of pediatric renal tumor treated using the Japan Wilms Tumor Study-1 (JWiTS-1) protocol: a report from the JWiTS group. *Pediatr Surg Int.*, 25: 923-929, 2009.
4. Ohshima, J., Haruta, M., Arai, Y., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ariga, T., Okita, H., Fukuzawa, M., Hata, J., Horie, H. and Kaneko, Y. Two candidate tumor suppressor genes, *MEOX2* and *SOSTDC1*, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 1037-1050, 2009.
5. 金子安比古: 小児がんの臨床遺伝学. *小児科診療* 72: 87-91, 2009.
6. Kubo, T., Kuroda, Y., Shimizu, H., Kokubu, A., Okada, N., Hosoda, F., Arai, Y., Nakamura, Y., Taniguchi, H., Yanagihara, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing and copy number analysis of the human tyrosine kinase gene family in poorly differentiated gastric cancer. *Carcinogenesis*, 30: 1857-1864, 2009.
7. Nakamura, Y., Migita, T., Hosoda, F., Okada, N., Gotoh, M., Arai, Y., Fukushima, M., Ohki, M., Miyata, S., Takeuchi, K., Imoto, I., Katai, H., Yamaguchi, T., Inazawa, J., Hirohashi, S., Ishikawa, Y. and Shibata, T. Krüppel-like factor 12 plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. *Int J Cancer* 125: 1859-1867, 2009.

8. Kubo, T., Kuroda, Y., Kokubu, A., Hosoda, F., Arai, Y., Hiraoka, N., Hirohashi, S. and Shibata, T. Resequencing analysis of the human tyrosine kinase gene family in pancreatic cancer. *Pancreas* 38: e200–e206, 2009.
9. Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M. and Morishita, K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 48: 768–776, 2009.
10. Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H. and Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and *MDM* amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chrom. Cancer* ,49: 596–609, 2010.
11. Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ninomiya, J., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Tozuka, K., Asakawa, H., Oba, H., Inoue, K., Tabei, T. Positive sentinel lymph node biopsy predicts the number of metastatic axillary nodes of breast cancer. *The Breast*, 18:244–247, 2009.
12. Takei, H., Kurosumi, M., Yoshida, T., Ishikawa, Y., Hayashi, Y., Ninomiya, J., Tozuka, K., Oba, H., Inoue, K., Nagai, S., Saito, Y., Kazumoto, T., Saitoh, Jun-ichi, Tabei, T. Axillary lymph node dissection can avoided in women with breast cancer with intraoperative, false- negative sentinel lymph node biopsies. *Breast Cancer*, 17:9–16, 2010.
13. Yamaguchi, Y. Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, 56(1), 1–7, 2009.
14. 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.*, Mar. 11(3), 239–241, 2009.
15. Azuma, K., Urano, T., Horie, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. and Inoue, S. Association of Estrogen Receptor and Histone Deacetylase 6 Causes Rapid

- Deacetylation of Tubline in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, 69 (7), 2935-2940, April, 2009.
16. Hayashi, S., Niwa, T. and Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. *Cancer Sci.*, 100(10), 1773-1778, 2009. (Jun)
  17. Matsumoto, M., Sakamoto, H., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Sasano H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. 3-Dimensional microarray analysis of estrogen signal-related genes in breast cancer tissues. *Anticancer Res.*, 29(10) 3971-3976, 2009.
  18. Kato, K., Takao, T., Kuboyama, A., Tanaka, Y., Ohgami, T., Yamaguchi, S., Adachi, S., Yoneda, T., Ueoka, Y., Kato, K., Hayashi, S., Asanoma, K. and Wake, N. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am. J. Pathol.*, 176(1), 381-392, 2010.
  19. Imach, H., Murao, K., Dobashi, H., Bhuyan, M.M., Cao, X., Kontani, K., Niki, S., Murazawa, C., Nakajima, H., Kohno, N., Yamashita, H., Iwase, H., Hayashi, S., Ishida, T. and Yamauchi, A. Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* In press, 2010.
  20. 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) 医薬ジャーナル社, p58-63, 2009.
  21. Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, T., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko. Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth/survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Sci.* 100:1885- 1894, 2009
  22. Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko. Y. Extracellular NM23-H1 protein inhibits the survival of primary cultured normal human peripheral blood mononuclear cells and activates the cytokine production. *Int. J. Hematol.* 90:143- 152, 2009

