

C. 研究結果

TERT-NS/GNL3Lは物理的相互作用をする

免疫沈降法にて内在性レベルでのTERTとNSの物理的相互作用を確認した(図1)。

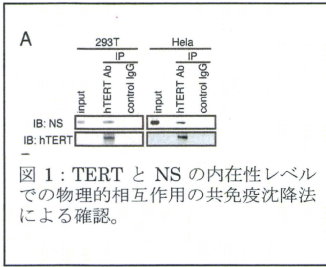


図1: TERTとNSの内在性レベルでの物理的相互作用の免疫沈降法による確認。

また、TERT, NS, GNL3Lに対する truncation mutant を作製し物理学的相互作用の責任領域を決定したところ、TERTではN末端側がまたNSとGNL3Lでは共通のmotifであることが知られているG4-G5領域がこれらの物理的相互作用に必須の領域であることが確認された(図2)。

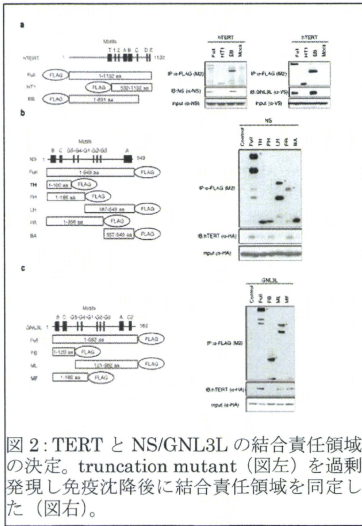


図2: TERTとNS/GNL3Lの結合責任領域の決定。truncation mutant(図左)を過剰発現し免疫沈降後に結合責任領域を同定した(図右)。

NS/GNL3Lはがん幹細胞機能維持に必須の分子である

脳腫瘍がん幹細胞として知られる細胞株(0308)を用いてNSの発現を抑制したところ、がん幹細胞形質の指標となる球状形成能が有意に低下した。これと同時にがん幹細胞マーカーであるCD133およびSOX2の発現量も低下することを確認した(図3)。

逆にNS/GNL3Lを人為的に過剰発現させた場合、colony formationと免疫不全マウスを用いての造腫瘍能が有意に亢進することを確認した(図4)。また、CD133やCD44などのがん幹細胞マーカーもNS/GNL3Lの発現上昇に伴い有意に上昇することが確認された(図5)。

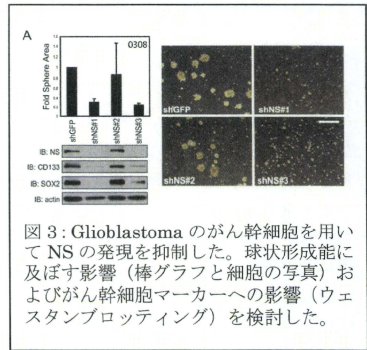


図3: Glioblastoma のがん幹細胞を用いてNSの発現を抑制した。球状形成能に及ぼす影響(棒グラフと細胞の写真)およびがん幹細胞マーカーへの影響(ウェスタンブロッティング)を検討した。

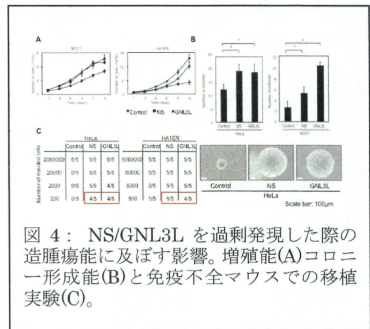


図4: NS/GNL3Lを過剰発現した際の造腫瘍能に及ぼす影響。増殖能(A)コロニー形成能(B)と免疫不全マウスでの移植実験(C)。

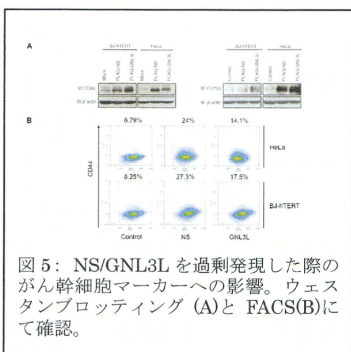


図5: NS/GNL3Lを過剰発現した際のがん幹細胞マーカーへの影響。ウエスタンブロッティング (A)と FACS(B)にて確認。

D. 考察

染色体末端の構造維持に関わることが知られているテロメラーゼは発がん過程に関与すると同時に幹細胞機能維持に関与することが示唆されている。本年度の研究成果から、これまで知られていなかった複合体として TERT-NS/GNL3Lを同定した。この複合体はがん幹細胞の機能維持に直接的に関与することが示されたことから、臨床検体を用いてNS/GNL3Lの発現状況と臨床経過の相関を検討することが重要と考えられた。また、がん幹細胞は造腫瘍能及び転移能の亢進を認めること、ES細胞様の遺伝子発現パターンを呈すること (Nagahama *et al.*, Cancer Research 2010) や、乳がんにおけるがん幹細胞分画がEMT関連タンパク質を高発現していること (Mani *et al.*, Nature), がん幹細胞の放射線療法抵抗性の分子機序としてDNA損傷応答機構の亢進が関わる (Bao *et al.*, Nature 2006) などの報告があり、今後は転移能の亢進およびES細胞様の遺伝子発現プロファイル、放射線療法抵抗性とNS/GNL3Lの機能に関しての分子基盤の解析を継続し新たなトランスレーショナル研究のシーズの開発が期待される。

E. 結論

テロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の新規結合パートナーであるnucleosteminおよびその類似タンパク質であるGNL3Lを複体内に同定し、NucleosteminあるいはGNL3Lががん幹細胞の機能維持に必須であることを示した。臨床検体を用いてのNS/GNL3Lの発現形式と臨床経過の相関の検討が適当と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, Masutomi K, Hayashizaki Y. Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER *BMC Molecular Biology* 2011;12:6
- Maida Y, Masutomi K RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing *Biological Chemistry* 2011; 392: 299-304
- 木下圭太, 毎田佳子, 増富健吉
- テロメラーゼ: テロメア伸長反応と新たな機能科学と生物 48(11):780-784, 2010
- 岡本奈緒子, 増富健吉 TERT, がん性幹細胞を標的としたがん治療の可能性 腫瘍内科 6(1):59-64, 2010

2. 学会発表

国際学会

- Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. "Induction of tumor initiating cell

behavior of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1 ” Keystone Symposia “Stem Cells, Cancer and Metastasis ” Keystone Resort, Keystone, Colorado

March 6 - March 11, 2011

(ポスター発表)

2. Eguchi T, Yoshida H, Taniguchi H, Masutomi K, Shimoda T, Yamada Y.

“Immunohistochemical analysis of CD133/44 expression in surgical specimens of squamous cell carcinoma of the esophagus after neoadjuvant chemotherapy”

AACR 101st Annual meeting 2010,

Walter E. Washington Convention Center, Whashington, DC

April 17-21, 2010 (ポスター発表)

3. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K.

“A complex of hTERT, Brg1 and the nucleolar GTP-binding proteins GNL3L and nucleostemin regulates tumor initiating cell behavior”

Cold Spring Harbor Asia Conferences

“James Watson Symposium on Cancer”

Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China

April 6 - 11, 2010 (口頭発表)

国内学会

1. 増富健吉 (招待講演)

がん幹細胞と放射線療法抵抗性

第69回日本癌学会総会

大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪 2010年9月22日～24日(口頭

発表)

2. 岡本奈緒子, 安川麻美, Christine

Nguyen, Kasim Vivi, 深見希代子,

William C. Hahn, 増富健吉

hTERT, BRG1, 核小体GTP結合タンパク質 GNL3L/NS からなる複合体は腫瘍形成能を制御する

第69回日本癌学会総会

大阪国際会議場、

リーガロイヤルホテル大阪

2010年9月22日～24日(口頭発表)

3. 増富健吉 (招待講演)

ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼとクロマチン構造維持

第2回日本RNAi研究会

グランドプリンスホテル広島

2010年8月27日～28日

4. 増富健吉 (招待講演)

テロメレース、がん幹細胞、転移

第19回日本がん転移学会学術集会・総会

金沢市文化ホール

2010年6月16日～17日

5. 増富健吉 (招待講演)

Human RNA dependent RNA polymerase and chromatin structure.

第62回日本細胞生物学会大会

大阪国際会議場

2010年5月19日～20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成22年度 研究分担報告書

研究分担課題名：エピゲノムの側面からの基礎研究とトランスレショナル研究

研究分担者：高田 江里子

国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野 ユニット長

研究要旨

がんの発生と進展には、がん関連遺伝子のエピジェネティック異常が深く関与する。従って、がんにおけるエピジェネティック異常の同定は、新たな分子機構の解明に繋がると同時に、がんの存在診断、リスク診断、及び、質的診断に有用な場合もある。本研究では、エピジェネティクスからのアプローチによるトリプルネガティブ乳がん(TNB)の本体解明及び新規診断・治療の開発を目指すことと目的とする。今年度は、乳がんのがん抑制遺伝子 *BRCA1*、*BRCA2* 及び *PTEN* について、高精度メチル化解析法である定量的 methylation-specific PCR (qMSP) 法の測定条件を確立することを目的とした。まず、本研究班に材料として豊富に存在するアセトン固定・パラフィン包埋検体で qMSP が実施可能であることを確認し、次に *BRCA1*、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子の qMSP の測定条件を決定した。さらに、乳がん検体を用いた予備的な検討から、TNB では *BRCA1* のメチル化が高頻度に存在することが示唆された。

A. 研究目的

DNA メチル化に代表されるエピジェネティック修飾は、体細胞分裂に際して忠実に複製される。多くのがんでは、様々ながん抑制遺伝子がプロモーター領域 CpG アイランドの異常 DNA メチル化により不活化されており、がんの発生と進展に、がん関連遺伝子のエピジェネティック異常が深く関与している。従って、がんにおけるエピジェネティック異常の同定は、新たな分子機構の解明に繋がる。同時に、がんの存在診断、リスク診断、及び、質的診断に有用な場合もある。DNA メチル化は、1) 周囲の細胞の環境変化では変動しない、2) 現在の遺伝子発現状態だけでなく、将来の発現状態が判定できる、3) 一部の細胞での劇的な変化により全体像が攪乱されない、4) 化学的に安定であり、検体の保存状態による影響を受けにくい、5) PCR 法の活用により高感度検出が可能である、等の様々な利点を有する。

ホルモン非依存性 HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳がん (TNB) は乳がん全体の 20% を占め、既存のホルモン療法、HER2 阻害剤に対し抵抗

性であり、他の亜型と比較して予後不良である。

TNB は、*BRCA1* の不活化が関与している basal-like 乳がんと、間葉系幹細胞が深く関与している claudin-low 乳がん等が混在する乳がんとして知られ、TNB のより詳細な分子生物学的分類、それらの新規診断・治療の開発は重要な課題である。

本研究では、エピジェネティクスからのアプローチによる TNB の本体解明、新規診断・治療の開発を目指すことを目的とする。我々の研究室ではこれまでに、高精度定量法であるメチル化解析技術、定量的 methylation-specific PCR (qMSP) 法を確立、様々ながんで異常メチル化を検出してきた。今年度は、乳がんのがん抑制遺伝子として知られる *BRCA1*、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子について、qMSP 測定の条件を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) 材料

国立がん研究センター中央病院で手術を施行された乳がん患者の凍結組織検体、及び、アセトン

固定・パラフィン包埋 (AFPE) 検体を用いた。

2) ゲノム DNA の抽出

凍結組織からのゲノム抽出は、フェノール・クロロホルム抽出法で行った。AFPE 検体からのゲノム抽出は、ヘマトキシリン・エオジン染色により、腫瘍存在率が多い検体については直接、また、間質の混入が多い検体についてはマクロダイセクションを施行した後、市販の Gentra® Puregene Tissue Kit (QIAGEN)により抽出した。

3) ゲノム DNA の bisulfite 処理

凍結組織から抽出したゲノム DNA は、制限酵素 *Bam*HI により断片化した後、また、AFPE 検体から抽出したゲノム DNA は、制限酵素未処理のまま用いた。水酸化ナトリウムにより DNA を変性した後、3.6N bisulfite 溶液 (pH 5.0) 中で、95°C 30秒、50°C 15分の反応を 15 サイクル行った。水酸化ナトリウムにより脱スルホン化後、Zymo-spin カラム (Zymo Research)により精製、-20°Cにて保存した。

4) qMSP 法

Bisulfite 処理した DNA を鋳型に、メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA それぞれに特異的なプライマーを用い、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR により増幅させた。コントロール用完全メチル化 DNA は、ヒトリンパ球のゲノム DNA を *Sss*I methylase (New England Biolabs)で処理した。コントロール用完全非メチル化 DNA は、ヒトリンパ球のゲノム DNA を GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare) を用いて増幅したものを用いた。メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA の各コントロールについて、分子数既知の標準 DNA により検量線を作成、これらと比較することで、検体中の分子数を測定した。得られた各分子数から、メチル化 DNA の比率をメチル化レベルとして、図 1 の式により算出した。

$$\text{メチル化レベル} = \frac{\text{メチル化DNAのコピー数}}{\text{非メチル化DNAのコピー数} + \text{メチル化DNAのコピー数}} \times 100$$

図 1 メチル化レベルの算出

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センターの理審査委員会の承認を得て実施した。臨床材料に関しては、疫学研究に関する倫理指針に従い、患者から文書による同意を得た臨床材料を使用し、手術材料等の残余材料の研究利用については、診断等に一切の不都合を来さないこと、連結可能匿名化を行った後に解析を行うこと等を実施した。

C. 研究結果

1) AFPE 検体由来ゲノム DNA の断片化の程度

本研究で用いる qMSP は、高精度定量化を可能とする優れたメチル化解析技術であるが、信頼性の高いデータの取得には、十分量のコピー数を検出できる良好なゲノム DNA の品質が不可欠の因子である。本研究ではまず、本研究班で豊富に維持・管理している AFPE 検体の利用が可能か否かを、ゲノム DNA の断片化の程度を解析することで判定した。

5 検体の AFPE 検体から抽出したゲノム DNA の電気泳動の結果を、凍結組織から抽出したゲノム DNA と比較して図 2 に示す。通常、qMSP には凍結組織から抽出し、制限酵素で断片化したゲノム DNA を用いる。凍結組織由来の DNA は、高分子量に中心を持つスミア上の泳動パターンを呈するのに対し(図 2A)、AFPE 検体由来の DNA は、やや品質が劣るものの、高分子量の DNA が高密度に存在し(図 2B)、qMSP に十分利用できることが推定できた。また、抽出したゲノム DNA の収量は、約 10mg の検体から 5-8μg が得られ、qMSP による測定に十分量であることも確認した。

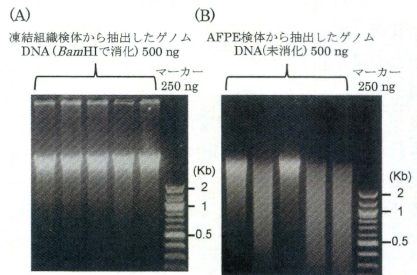


図 2 抽出したゲノム DNA の電気泳動
(A) 凍結組織検体から抽出し、*Bam*HI で消化したゲノム DNA 5 検体 (B) AFPE 検体から抽出したゲノム DNA 5 検体(未消化)

2) AFPE 検体由来ゲノム DNA のコピー数測定
ゲノム DNA の断片化の程度を確認したので、次に、qMSP において十分なコピー数が検出されるか否かを解析した。解析対象とした遺伝子は、本研究で解析を予定している *BRCA1* 遺伝子 (すでに測定条件を確立, Terada *et al.*, *Carcinogenesis*, 30:466, 2009)、及び、我々が同定した乳がんでサイレンシングを受ける *AKR1B1* 遺伝子を選択した。検出されたコピー数 (メチル化 DNA のコピー数と非メチル化 DNA のコピー数の総和) を図 3 に示す。AFPE 検体由来ゲノム DNA は、十分量のコピー数を示し、qMSP へ利用できる良好な品質であることを確認した。

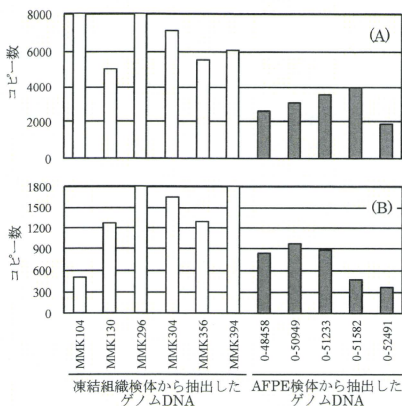


図 3 乳がん検体の定量MSPにおいて検出された非メチル化DNA及びメチル化DNAのコピー数の総和
(A) *BRCA1*遺伝子 (B) *AKR1B1*遺伝子

3) *BRCA2* 及び *PTEN* の qMSP 測定条件の確立

プライマー設計及び qMSP 測定の条件検討がなされていない *BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子について、測定条件を決定した。メチル化 DNA、非メチル化 DNA いずれも、転写開始点直上のヌクレオソームフリー領域にプライマーを設計、コントロール DNA を用いて条件検討を行った。その結果、いずれの遺伝子とも、メチル化 DNA、非メチル化 DNA の各条件で、良好な測定条件を決定できた (図 4)。

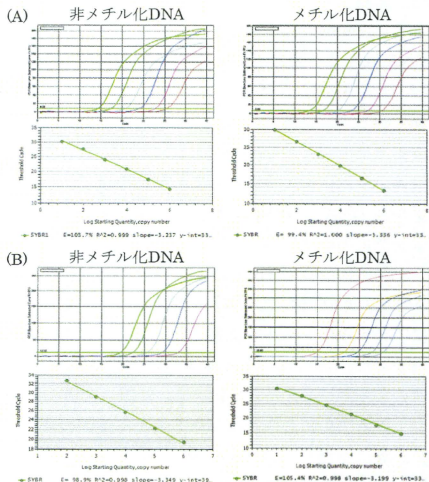


図 4 qMSPにおける標準DNAの増幅曲線及び検量線
(A) *BRCA2*遺伝子 (B) *PTEN*遺伝子

4) 乳がん検体でのメチル化レベル測定

予備的に、少数の TNB 及び Luminal A (LUA) 乳がん検体を用い、*BRCA1*、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子について qMSP によりメチル化レベルを測定した (図 5)。*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子は、今回測定した検体では、いずれもメチル化レベル上昇を示さなかった。一方、*BRCA1* 遺伝子については、解析した TNB 検体 7 例中 2 例 (29%) でメチル化レベルの上昇を認め、TNB で *BRCA1* のメチル化が高頻度で存在していることが示唆された。

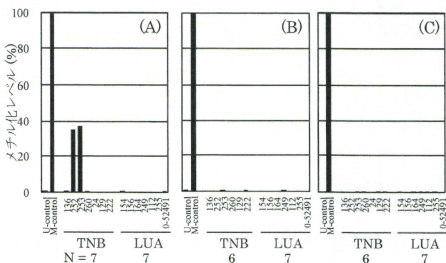


図 5 TNB 及び LUA 乳がん検体における DNA メチル化レベル
(A) *BRCA1* 遺伝子 (B) *BRCA2* 遺伝子 (C) *PTEN* 遺伝子

D. 考察

今年度の検討により、AFPE 検体由来のゲノム DNA は高分子量の断片を含み、qMSP におけるコピー数も十分検出することから、品質が良好に保たれていることを確認できた。本研究班ではすでに免疫組織染色により亜型分類がなされている AFPE 検体が多数維持・管理されており、今後これらサンプルが DNA メチル化解析に利用可能となることは、本研究班の研究推進の上で有益である。

予備的に少数の TNB 及び LUA 乳がん検体を用い、*BRCA1*、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子について qMSP にてメチル化レベルを測定したところ、*BRCA1* 遺伝子では、解析した TNB 検体 7 例中 2 例 (29%) と極めて高率にメチル化を認めた。TNB で *BRCA1* 遺伝子のメチル化が高頻度であることは米国のグループが既に報告しており (Vecek *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 28:e563, 2010)、TNB では *BRCA1* のメチル化が高頻度に存在していると考えられた。qMSP によるメチル化の定量は高精度であり、他の方法よりも正確な腫瘍の性質の測定が可能である。今後、PARP 阻害剤の治療効果の有無を、*BRCA1* メチル化の有無で層別化できるか否かが検討課題である。一方、*BRCA1* 不活化を認めない TNB の本体解明は、より重要な課題である。

今後は、今回確立した qMSP を多数の乳がん検体に応用し、TNB を層別化すると共に、ゲノム網羅的メチル化解析技術を導入することで、TNB の本体解明、及び、新規診断マーカーの同定を可能とする異常 DNA メチル化を分離することを目指す。

E. 結論

AFPE 検体で qMSP が実施可能であることを確認し、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子について qMSP の測定条件を新たに決定した。TNB では、*BRCA1* のメチル化が高頻度に存在すると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

国際学会

1. Hattori, N, Okochi-Takada, E, Yamashita, S, Watanabe, N and Ushijima, T. Identification of a gene silenced in rat mammary carcinomas by combination of DNA methylation microarray and chemical genomic screening. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Washington, D.C., April, 2010.
2. Hattori, N, Okochi-Takada, E, Takeshima, H, Wakabayashi, M, Yamashita, S and Ushijima, T. Screening of promoter CpG islands methylated in human mammary epithelial cells. NSFC A3 foresight program 2010 seminar. Beijing, September, 2010.
3. Hattori, N, Okochi-Takada, E, Kikuyama, M, Wakabayashi, M, Yamashita, S, Watanabe, N and Ushijima, T. Identification of five genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Kyoto, December, 2010.

国内学会

1. 服部奈緒子、大河内(高田)江里子、菊山みずほ、若林美香、山下聡、渡邊直子、牛島俊和 網羅的 DNA メチル化解析および遺伝子発現解析を用いたラット乳がんでの異常 DNA メチル化の同定 第4回日本エピジェネティクス研究会年会 2010年5月(鳥取)
2. 大河内(高田)江里子、塚本徹哉、若林美香、山村義孝、立松正衛、牛島俊和 *ANGPTL4* はヒト胃がんにおいてプロモーター CpG アイランドのメチル化により不活化を受けるがん抑制遺伝子である 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月(大阪)

3. 服部奈緒子、大河内(高田)江里子、竹島秀幸、若林美香、山下聡、牛島俊和 ヒト正常乳腺上皮細胞でのメチル化 CpG アイランドによる発現抑制遺伝子の探索 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月(大阪)
4. 大河内(高田)江里子、若林美香、牛島俊和 *ANGPTL4*は血管新生抑制を介してヒト胃がんの進展抑制遺伝子として機能する 第33回日本分子生物学会 2010年12月(兵庫)
5. 服部奈緒子、大河内(高田)江里子、竹島秀幸、若林美香、山下聡、牛島俊和 ヒト正常乳腺上皮細胞でメチル化されたプロモーター領域 CpG アイランドの同定 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月(兵庫)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究分担課題 ゲノム、タンパク解析。薬剤感受性試験

研究分担者 小泉 史明 国立がん研究センター研究所

研究要旨 トリプルネガティブ乳がん細胞株を用い、新規未承認薬であるeverolimusの感受性規定因子の探索を行った。トリプルネガティブ乳がん細胞株9株の内、IC₅₀が100nM以下の感受性良好株が5株あり、内3株はIC₅₀が1nM以下であった。感受性良好株5株はEGFRもしくはCK5/6陽性のbasal-likeサブタイプであった。一方、感受性不良株4株中3株でsnail, twist高発現、E-cadherin低発現であり、stem cellの特徴を有していた。以上の結果により、everolimusはトリプルネガティブ乳がんに有効であり、特にbasal-likeサブタイプに効果があることが示唆された。また、basal-likeサブタイプのマーカーであるEGFRやCK5/6はeverolimusの効果規定のバイオマーカーになる可能性がある。

A. 研究目的

研究目的は、トリプルネガティブ乳がん細胞株を用い、新規未承認薬であるeverolimusの感受性規定因子を明らかにすることである。具体的には①トリプルネガティブ乳がん細胞株9株を用いeverolimusの感受性を確認する。②everolimusのターゲットであるmTORの上下流の蛋白質発現をWestern blotting法で確認する。③トリプルネガティブ乳がんをさらに分類するため、basal-markerであるEGFR, CK5/6, stem cell markerであるsnail, twist, E-cadherinの蛋白質発現レベルをWestern blotting法、免疫染色で確認する。④以上の結果からトリプルネガティブ乳がんに対するeverolimusの効果と相関する因子を検討する。

B. 研究方法

(1) トリプルネガティブ乳がんに対するeverolimusの感受性の確認

トリプルネガティブ乳がん9細胞株に対するeverolimusの感受性をcell counting Kit-8を用い確認した。

(2) mTORの上下流の蛋白質発現の確認

EverolimusのターゲットはmTORである。mTORの上下流でカスケードに関係すると考えられるPTEN, Akt, S6, 4EBP1の蛋白質発現、それぞれのリン酸化蛋白質の発現をWestern blotting法により確認した。

また、ターゲットモディフィケーションを確認するため、everolimusを暴露し(0-50nM)、上下流の蛋白質発現の変化を確認した。

(3) トリプルネガティブ乳がんの分子学的分類

トリプルネガティブ乳がんはヘテロな集団であり、それぞれに分子学的な特徴を持つことが想

定される。まず、basal-likeサブタイプの確認のため、basal-markerであるEGFR, CK5/6の蛋白質発現をそれぞれWestern blotting法、免疫染色で確認した。EGFRについては遺伝子の増幅をFISH法で遺伝子変異をdirect sequenceで確認した。

次にstem cell markerであるsnail, twist, E-cadherinの蛋白質発現をWestern blotting法で確認した。

C. 研究結果

(1) トリプルネガティブ乳がんに対するeverolimusの感受性

トリプルネガティブ乳がん9細胞株の内、IC₅₀が100nM以下であったのは、5細胞株であった。その内、3細胞株はIC₅₀が1nM前後であった(図1)。

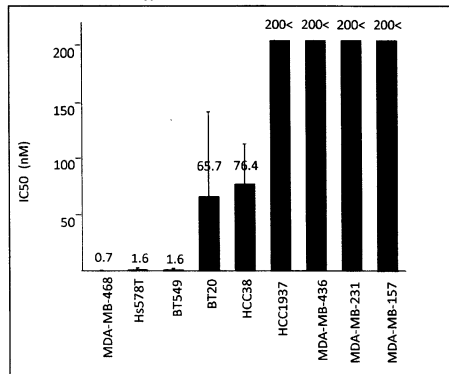


図1 トリプルネガティブ乳がんに対するeverolimusの感受性

(2) mTORの上下流の蛋白質発現

図2Aはeverolimusの感受性順に細胞株を並べてある。everolimusの直接のターゲットであるmTOR, phospho-mTORの蛋白質発現には差がなかった。次にPTEN欠質がある場合、mTOR阻害薬の感受性が良好である、との報告がいくつかある。しかし、本検討では4細胞株でPTEN発現を認めたが、内2株(Hs578T, BT20)は感受性良好であった。以上より、PTEN欠質の有無のみで感受性を規定することはできなかった。

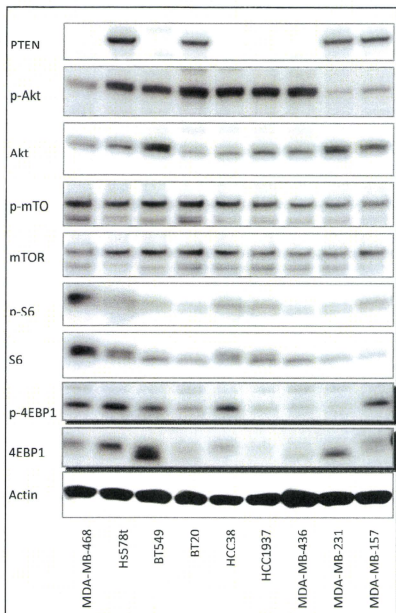


図2A mTORの上下流の蛋白質発現

Everolimusの標的たんぱく質の修飾を確認するために、感受性良好株としてMDA-MB-468, BT549, 感受性不良株としてMDA-MB-231, MDA-MB-157を用い、everolimusを0, 0.5, 5, 50nMを暴露した。いずれの株も0.5nMという低濃度から下流蛋白質であるphospho-S6 (p-S6)の発現低下を認めた(図2B)。以上の結果から、p-S6の低下はeverolimusの感受性規定因子になりえないことが確認された。

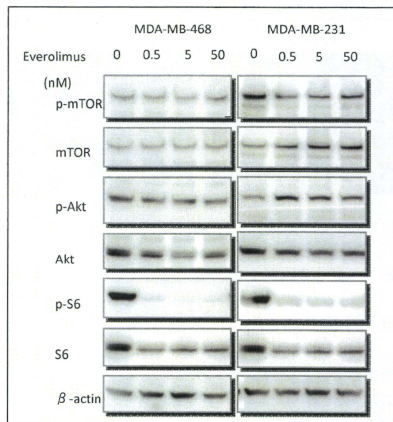


図2B everolimusによる標的たんぱく質の修飾(MDA-MB-468, MDA-MB-231)

(3) トリプルネガティブ乳がんの分類

Basal-likeサブタイプを確認するために、EGFR, CK5/6蛋白質の発現を確認した。感受性良好株5株はEGFRまたはCK5/6蛋白質の発現が高く、basal-likeサブタイプに分類された(図3A)。また、MDA-MB-468, BT20はEGFRの遺伝子増幅を認めた(図3B)。すべての株でEGFRの遺伝子変異(del E746- A750, L858R)は認めなかった。次にstem cellマーカーである, snail, twist, E-cadherinの蛋白質発現を確認したところ、感受性不良株4株中3細胞株でsnail, twistの蛋白質発現が高く、逆にE-cadherinの発現が低かった(図3A)。

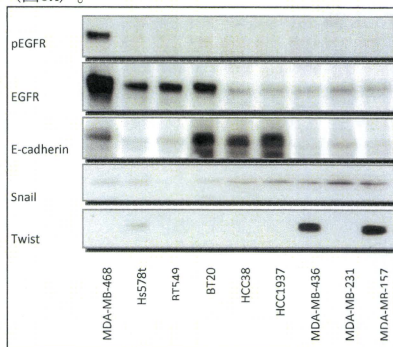


図3A トリプルネガティブ乳がんの分類

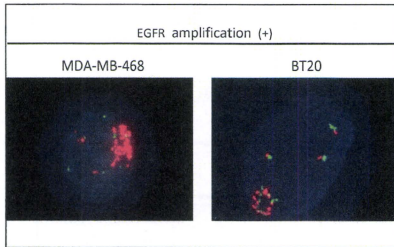


図3B EGFRの遺伝子増幅

D. 考察

トリプルネガティブ乳がんに対しては有効な治療がなく、予後不良のサブタイプであることが知られている。特にHER2に対するTrastuzumab、ホルモン受容体に対するTamoxifen, aromatase阻害薬のように、分子標的薬がないのが現状である。本検討ではトリプルネガティブ乳がんの細胞株に対するeverolimusの感受性を確認したが、InM前後というかなり低い濃度で効果を示し、everolimusが有効な分子標的薬であることが示唆された。その中でも特にbasal-likeサブタイプに対しては高い感受性を示した。

また、トリプルネガティブ乳がんはヘテロな集団であることが知られているが、basalマーカー(EGFR, CK5/6)やstem cellマーカーにより、分子学的特徴による分類が可能であった。

過去にはmTOR阻害薬の感受性規定因子としてPTEN, Akt, S6発現などが報告されているが、本検討ではそれらの分子の蛋白質発現とeverolimusとの感受性は関係なかった。

E. 結論

トリプルネガティブ乳がんに対してはeverolimusが有効であり、特にbasal-likeサブタイプに対し効果があることが示唆された。EGFR, CK5/6はeverolimusの効果予測のバイオマーカーとなりうるということが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, Kouno T, Katsumata N, Ando M, Aogi K, Koizumi F, Nishio K, Fujiwara Y. Fc(gamma)R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
2. Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, Naitou H, Maeda N, Koizumi F, Miyagawa S, Ohashi N, Oku N. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer*. 127(11):2685-98, 2010.
3. 温泉川真由・小泉史明: ADCC活性と抗体医薬の臨床効果、腫瘍内科 6巻、45-52、2010.

2. 学会発表

1. Sakai K, Arai T, Furuta K, Nagai T, Kudo K, Kaneda H, Tamura D, Aomatsu K, Fujita Y, Matsumoto K, Koizumi F, Nishio K. Expression levels of EGFR-ligands are up-regulated in EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant cell line. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept 22-24, Osaka
2. Yunokawa M, Katanasaka Y, Kitamura Y, Otuka A, Fujiwara Y, Koizumi F, Tamura K. Sensitivity of everolimus in triple negative breast cancer (TNBC). The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept 22-24, Osaka
3. Katanasaka Y, Yunokawa M, Kitamura Y, Morimoto T, Koizumi F. Combination therapy of BGT226, a novel PI3K/mTOR inhibitor and gefitinib in non small cell lung cancer. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept 22-24, Osaka
4. Iwasa S, Kanda S, Suzuki G, Ohide A, Nakayama M, Otsuka A, Aita Y, Goto K, Kunitoh H, Sekijima M, Nishio K, Tamura T, Koizumi F. Association of single

nucleotide polymorphism with EGFR-TKI-induced severe interstitial lung disease in NSCLC patients. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept 22-24, Osaka

5. ○Nakadate Y, Yunokawa M, Aita Y, Kitamura Y, Tamura K, Koizumi F. Inter-individual difference in trastuzumab-mediated ADCC activity of PBMC. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept 22-24, Osaka
6. 岩佐 悟、神田慎太郎、鈴木玄樹、大出明、中山麻里、大塚綾香、會田雪絵、後藤功一、國頭英夫、関島勝、西尾和人、田村友秀、小泉史明. EGFR-TKIにおける急性肺障害への遺伝子多型の関与の検討. 第51回日本肺癌学会総会、広島、11月3-4日、2010年

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

研究分担課題 病理解析、免疫組織染色、組織アレイを用いた解析

研究分担者 津田 均 国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科

研究要旨 トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) の病理解析の研究基盤を整備するため、過去の手術例におけるTNBCと非TNBCのリスト作成を行い、1995年～2000年に外科切除を受けた腋窩リンパ節転移陰性乳癌530例につき、組織アレイを構築するとともに、ホルモン受容体とHER2の免疫染色を標準的方法で再度行い、サブタイプ分類を確実に行った。1999年～2005年に術前化学療法が行われた92例のTNBCと86例の非TNBCを対象に化学療法の効果予測因子を調べたところ、腫瘍浸潤リンパ球とアポトーシスが組織学的完全奏効 (pCR) 率と有意に関連した。TNBCとHER2型はluminal型に比べ有意にpCR率が高かったが、TNBCの中でp53, basal-like phenotypeは効果予測因子とはならなかった。術前化学療法が病状進行 (PD) となったTN乳癌20例とコントロール例を選び、PDと関連する因子検討に着手した。

A. 研究目的

本年度における研究目的は、トリプルネガティブ (TN) 乳癌の予後予測や化学療法反応性予測のマーカーを見出すことと、新しい治療標的となり得る分子を見出すことにある。これらの検討を病理組織学的アプローチによって行い、組織所見の観察、免疫組織化学、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) などの方法を用いて行う。さらに組織アレイを製し、数多くの分子変化のスクリーニングに役立てることも目的とする。

B. 研究方法

(1) 組織アレイ構築による研究基盤の整備と腋窩リンパ節転移陰性乳癌における予後因子の後ろ向き解析

1996年から2000年の間に、当院で手術を受けた組織学的リンパ節転移陰性 (pN0) 乳癌患者530名を対象に、病理ブロックから組織アレイを構築した。また、免疫組織化学的にエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、HER2、ならびにKi67の検索を行い、intrinsic subtype分類を行って、本邦でのpN0乳癌患者における現在の標準検査によるTN乳癌の頻度と患者予後を明らかにすることを目的とした。ER、PgRはAllredスコア3以上を陽性、3未満を陰性、HER2は2007年ASCO/CAPガイドライン基準によるスコア3+と2+かつFISH陽性の例を陽性とした。Ki67は20%以上を陽性とした。追跡期間中央値は118か月 (0.6～160か月)、パラメータ毎の例数と免疫染色結果の一部を表1、図1に示す。

Parameter	No. of patients (%) (n = 530)
Age	≤50 196 (37)
	>50 334 (63)
Pathological T	T1 380 (72)
	T2 146 (27)
	T3 4 (1)
	Nuclear grade
Hormone receptor	1 169 (32)
	2 114 (22)
	3 240 (46)
HER2	+ 409 (78)
	- 116 (22)
Ki67 (≥20%)	+ 106 (20)
	- 424 (80)
NSAS criteria	+ 243 (46)
	- 286 (54)
NSAS criteria	eligible 351 (66)
	ineligible 177 (34)

表1. 検討例の内訳

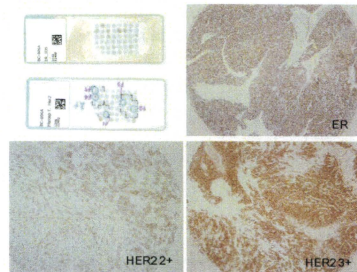


図1. 組織アレイの作製と免疫染色

(2) 術前化学療法予測因子の検討

1999年～2007年の間に術前全身療法を受けた病期II～IIIの乳がん患者から得られたコア針生検標本を対象に、免疫組織化学的検討とPCR LOH検

討を行い、治療効果予測のマーカー検索を行った。対象は、TN乳癌92例、luminal A or B 46例とHER2-enriched型42例である。標準的な染色法にてER, PgR, HER2, p53, basal-like marker (CK5/6, CK14, EGFR) の染色を施行した。ER, PgRはAllredスコア3以上を陽性とした。HER2はscore 3+のみを陽性例とし、2+の例は検討から除外した。またHEレベルで組織型、Grade、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、アポトーシスの程度などを検討した。さらにPCR-LOH法により17qのLOHの有無を検討した。治療効果の判定は、浸潤癌成分の完全な消失をpCRと定義し、原発巣のみで浸潤癌成分消失 (NSABP NB-18基準)、JBCRG基準、原発巣・転移巣双方とも浸潤癌成分消失、の3通りで判定した。

(3) 術前化学療法に対し病状進行となった例の解析

TN乳癌の中で術前化学療法が病状進行 (PD) となった例20例とコントロール例を選び、PDと関連する因子検討に着手した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者のプライバシー保護と個人に不利益が生じないことに最大限に注意を払い、「疫学研究に関する倫理指針」に準拠して行った。本研究は国立がん研究センター倫理委員会により承認を得た上で行われた。

C. 研究結果

(1) 組織アレイ構築による研究基盤の整備と腋窩リンパ節転移陰性乳癌における予後因子の後ろ向き解析

intrinsic subtype分類による内訳はluminal A (HR+/HER2-/Ki67-) 242 (46%)、luminal B (HR+/HER2-/Ki67-またはHR+/HER2+) 111 (21%)、HER2-enriched (HE-/HER2+) 101 (19%)、TN乳癌 73 (14%)、未定3であった。10年無再発生存率 (DFS)・全生存率 (OS) は87.8、89.6%であった。予後因子としてER, NSAS分類、nuclear grade, Ki67が単変量解析で有意であった ($P < 0.05$)。多変量解析では、Ki67陽性のみが有意な因子として残った ($P = 0.02$)。

10年無病生存率はTN, HER2-enriched, luminal Bの3群がluminal Aに比べ不良であった (図2)。10年全生存率はluminal A群が94.6%と高く他の群80~90%に比べて有意に予後良好であった ($P = 0.007$) (図3)。術後補助化学療法はCMF 149, UFT 79, 未施行282で、LUA, LUBとも術後化学療法の有無は予後と有意な相関を示さなかった。

subtype分類はpN0乳癌患者のリスク評価に有用

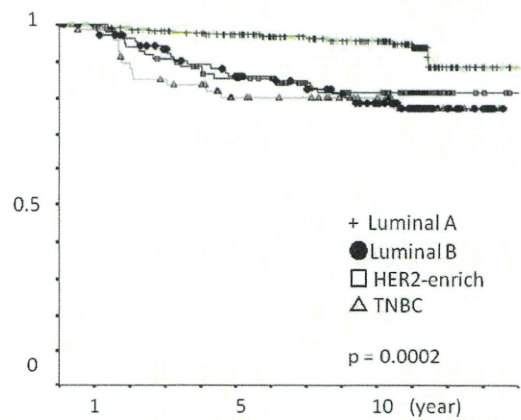


図2. サブタイプ毎の無病生存曲線

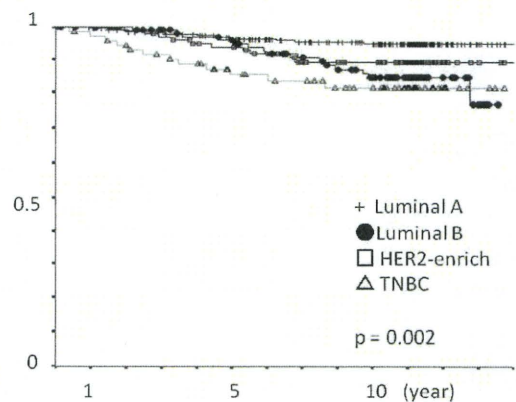


図3. サブタイプ毎の生存曲線

であったが、今回検討したレジメンでは効果予測因子の証拠は得られなかった。

(2) 術前化学療法予測因子の検討

原発巣でのpCR割合は、TN群32%、HER2群21%、luminal群7%で、統計学的に有意にTN群、HER2-enriched群でより高頻度であった ($P = 0.006$)。basal marker, p53, 17q LOHはいずれもTN群、HER2-enriched群でより高頻度であったが、治療効果との有意な相関は見られなかった。TILを高スコアと低スコアに分けると、TN乳癌におけるpCR率は、TIL高スコア群37%、低スコア群16%と、前者にてより高頻度であった。またアポトーシス高スコア群でのpCR率は47%で、低スコア群27%に比べてより高頻度であった。このような傾向はTN, HER2-enriched, luminalを合わせた180例での解析でも同様で、高TILスコア群でのpCR率34%は、低TILスコア群の10%に比べ有意に高かった ($P = 0.0001$)。また、高アポトーシス群のpCR率35%は低アポトーシス群での19%に比べて有意に高かった ($P = 0.04$) (表2)。組織学的異型度やp53, basal marker, 17q LOH

はいずれもTN乳癌における術前化学療法の効果と有意な相関を示さなかった。

Subtype of breast cancer and response to NAC	No. of patients (%)			p
	Total	TIL score		
		0-2	3-5	
TNBC				
pCR (NSABP B-18) Yes	29 (32)	4 (16)	25 (37)	0.05
	No	63 (68)	21 (84)	
QpCR (JBCRG) Yes	35 (38)	4 (16)	31 (46)	0.008
	No	57 (62)	21 (84)	
pCR (primary + lymph nodes) Yes	26 (28)	4 (16)	22 (33)	0.11
	No	66 (72)	21 (84)	

表2. 乳癌組織におけるリンパ球浸潤の程度と術前化学療法に対する効果との相関

D. 考察

pN0乳癌においてはTN乳癌が最も予後が不良で再発例では再発までの期間も短い傾向にあったが、HER2-enrich型よりもむしろluminal B型の方が長期予後が不良であったという結果は注目された。特にluminal Aについては予後佳良であったこともあり、pN0のluminal型であってもHER2発現の程度、Ki67 labeling indexの度合いによって生物学的意義が大きく異なることが確認された。今後は、本シリーズを対象として、TN乳癌における新しいバイオマーカーの検討を進めていく予定である。今回作製したTMAセットはわが国のpN0乳癌の一般的なふるまいを表していると思われる、今後の研究において有用と考えられた。

TN乳癌における術前化学療法予測因子の検討はいくつか既に行われているがわが国でまとまった検討はほとんどなかった。今回、再度標準化された方法でER, PgR, HER2染色を行い、HER2はスコア3+の例のみを対象とし、各サブタイプ群を出来るだけ正確に抽出して行った。この結果、予後不良因子とされていたbasal-like markerの発現や治療効果と関連があるとされていたp53はいずれもpCR率との関連を示さなかった。一方、TILの程度とアポトーシスの程度が有意にpCRと相関することが分かった。今後さらに浸潤炎症細胞のサブセットやアポトーシスに関わる分子の発現の解析を行いたい。TILの程度やアポトーシスの程度は宿主の腫瘍に対する免疫反応を表している可能性があり、このような免疫反応が化学療法に対するTN乳癌の反応性を部分的に規定している可能性が示唆された。

E. 結論

TN乳癌につき、pN0乳癌での生物学的特徴を明らかにするとともに、術前化学療法効果予測因子の検討を行った。更に組織アレイを構築したので、今後の研究基盤としたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ota T, Kurosumi M, Miyamoto K, Yamamoto Y, Iwase T. Clinicopathological analyses of triple-negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer*. 2010; 17(2): 118-24.

Yoshida M, Mouri Y, Yamamoto S, Yorozuya K, Fujii K, Nakano S, Fukutomi T, Hara K, Tsuda H. Intracystic invasive papillary carcinoma of the male breast with analyses of loss of heterozygosity on chromosome 16q. *Breast Cancer*. 2010; 17(2): 146-50.

Tanioka M, Shimizu C, Yonemori K, Yoshimura K, Tamura K, Kouno T, Ando M, Katsumata N, Tsuda H, Kinoshita T, Fujiwara Y. Predictors of recurrence in breast cancer patients with a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer*. 2010; 103(3): 297-302.

Kobayashi T, Tsuda H, Moriya T, Yamasaki T, Kikuchi R, Ueda S, Yamamoto J, Matsubara O. Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 123(3): 733-45.

Tsuda H, Kurosumi M, Uemura S, Yamamoto S, Kobayashi T, Osamura RY. Validation of HER2 tests in core needle biopsy specimens from primary breast cancers in terms of interobserver reproducibility and concordance with surgically resected specimens. *BMC Cancer*. 2010; 10(1): 534.

Ueda S, Tsuda H, Saeki T, Fukatsu K, Osaki

A, Shigekawa T, Ishida J, Tamura K, Abe Y, Omata J, Moriya T, Yamamoto J. Early reduction in standardized uptake value after one cycle of neoadjuvant chemotherapy measured by sequential FDG PET/CT is an independent predictor of pathological response of primary breast cancer. *Breast J.* 2010; 16(6): 660-2.

Seki K, Tsuda H, Iwamoto E, Kinoshita T. Histopathological therapeutic effect of radiofrequency ablation to primary breast cancer: with special reference to changes in cancer cells and stromal structure and comparison with enzyme histochemistry. *Breast Cancer.* 2011; 18(1): 20-3.

Tsuda H, Seki K, Hasebe T, Sasajima Y, Shibata T, Iwamoto E, Kinoshita T. A histopathological study of radiofrequency ablation to breast cancer. *Breast Cancer.* 2011; 18(1): 24-32.

Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Estrogen-related receptor γ modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 123(1-2): 1-7.

Yoshida M, Shimizu C, Fukutomi T, Tsuda H, Kinoshita T, Akashi-Tanaka S, Ando M, Nakano S, Hojo T, Fujiwara Y. Prognostic factors in young Japanese women with breast cancer: Prognostic value of age at diagnosis. *Jpn J Clin Oncol.* 2011; 41(2): 180-9.

Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, Hirata T, Yonemori K, Kouno T, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor cell apoptosis as predictive markers for response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* In press

2. 学会報告

Mukai H, Watanabe T, Mitsumori M, Tsuda H, Nakamura S, Masuda N, Yamamoto N, Shibata T, Sato A, Aogi K. Final analysis of a safety and efficacy trial of preoperative sequential chemo-radiation therapy for the nonsurgical treatment (NST) in early breast cancer (EBC): Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG0306). 2010ASCO Annual Meeting, *J Clin Oncol* 28:7s, 2010 (suppl; abstr 552)

小野麻紀子、津田 均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、平田泰三、米盛勸、河野勤、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘。トリプルネガティブ乳癌(TNBC)における病理学的治療効果予測因子：組織亜型と腫瘍浸潤リンパ球(TIL)。第18回日本乳癌学会学術総会、2010.6.24-25. 札幌市

津田 均、上田重人、小林隆之、小野麻紀子、清水千佳子、山本順司、木下貴之、藤原康弘。乳がん個別化治療のための病理診断および分子病理診断。第69回日本癌学会学術総会 2010.9.22-24. 大阪市

小野麻紀子、津田均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、米盛勸、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘。トリプルネガティブ乳癌(TNBC)における病理学的治療効果予測因子。第69回日本癌学会学術総会 2010.9.22-24. 大阪市

棟近永子、澁木康雄、津田均。乳癌の液状細胞診におけるDual color In situ hybridization法の検討。第49回日本臨床細胞学会秋期大会 2010.11.21-22. 神戸市

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

研究要旨

TNB患者から得られた腫瘍検体（乳がん組織検体）を用いた、大規模な後ろ向き（レトロスペクティブ）解析を行った。1999-2007年に国立がん研究センター中央病院で前化学療法を施行したII, III期、原発性乳がん530例の患者より得られた腫瘍検体を用い、免疫組織染色法を用いた病理学的解析を行う。TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)の発現量、Apoptosis Index, Basal marker (EGFR, cytokeratin 5/6)の発現量を免疫組織染色により確定しpCRとの相関について検討した。TNBは他のサブタイプと比較して、無増悪生存期間、全生存期間ともに有意に短い傾向にあった。II, III期、原発性乳がん474例（術前化学療法症例）の解析においては、TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)の発現量 (score) とJBCRGの判定基準におけるpCRとの間には強い相関を認めた (P=0.008)。又、特に、TNBにおいては、他の亜型と比較して、TIL scoreとapoptosis indexとpCRとの間には強い相関を認める傾向があった。TILは、TNBに対する抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの候補である。

A. 研究目的

本研究班の目的の一つに、TNBを対象として、抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの同定がある。目的を達成するために、TNB患者から得られた腫瘍検体（乳がん組織検体）を用いた、大規模な後ろ向き（レトロスペクティブ）解析を行う。

B. 研究方法

乳がん組織検体での特異的なタンパク質の発現量と術前化学療法のpCRとの相関について検討する。

1999-2007年に国立がん研究センター中央病院で前化学療法を施行したII, III期、原発性乳がん530例の患者より得られた腫瘍検体を用い、免疫組織染色法を用いた病理学的解析を行う。TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)の発現量、Apoptosis Index, Basal marker (EGFR, cytokeratin 5/6)の発現量を免疫組織染色により確定しpCRとの相関について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センターの理審査委員会の承認を得て実施した。臨床材料に関しては、臨床試験、疫学研究に関する倫理指針に従った。患者から文書による同意を得た臨床材料を使用し、手術材料等の残余材料の研究利用については、診断等は一切の不都合を来さないこと、連結可能匿名化を行った後に解析を行うこと等を実施した。

C. 研究結果

病期II, III期、原発性乳がん530例（術後）の患者を対象とした。背景は、50歳以上が63%、閉経後が58%、組織学的G3以上が46%（図5A）、Luminal A (HR+/HER2-/Ki67-)が46%、Luminal B (HR+/HER2-/Ki67+, or HR+/HER+)が21%、HER2-enriched (HR-/HER2+)19%、TNBC (HR-/HER2-)が14%であった。術後の化学療法はCMF, UFT, なしであった。（表1、表2）

表1：患者背景-1

		No. of patients (%) (n = 530)
Age	≤ 50	196 (37)
	> 50	334 (63)
Menopausal	pre	200 (42)
	post	330 (58)
Pathological T stage	T1	380 (72)
	T2	146 (27)
	T3	4 (1)
Nuclear grade	1	169 (32)
	2	114 (22)
	3	240 (46)
NSAS criteria	eligible	351 (66)
	ineligible	177 (34)
chemotherapy	CMF	154 (29)
	UFT	82 (15)
	none	293 (56)

表2：患者背景-2

		No. patients (%)
Hormone receptor (HR)	+	409 (78)
	-	116 (22)
HER2	+	106 (20)
	-	424 (80)
Ki-67 (≥20%)	+	243 (46)
	-	286 (54)
Subtype	Luminal A	242 (46)
	Luminal B	111 (21)
	HER2-enriched	101 (19)
	TNBC	73 (14)
lymph node invasion	+	163 (31)
	-	366 (69)

無増悪生存期間 (Disease-free survival) の解析では、Luminal Aが統計学的有意に延長し (図1)、Overall Survival では、TNBが有意に短い結果となった (図2)。

図1 無増悪生存期間

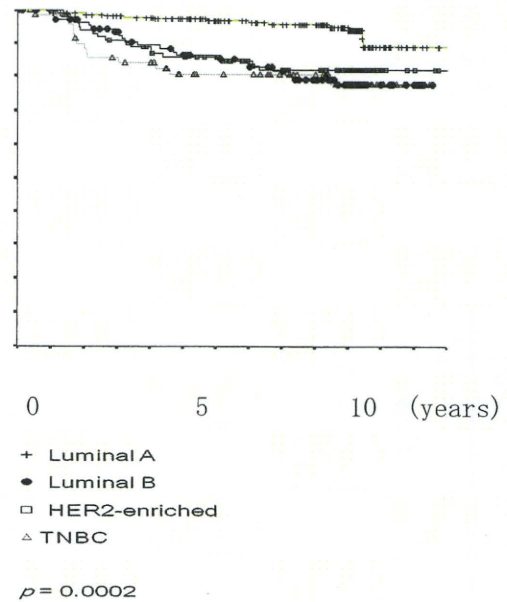
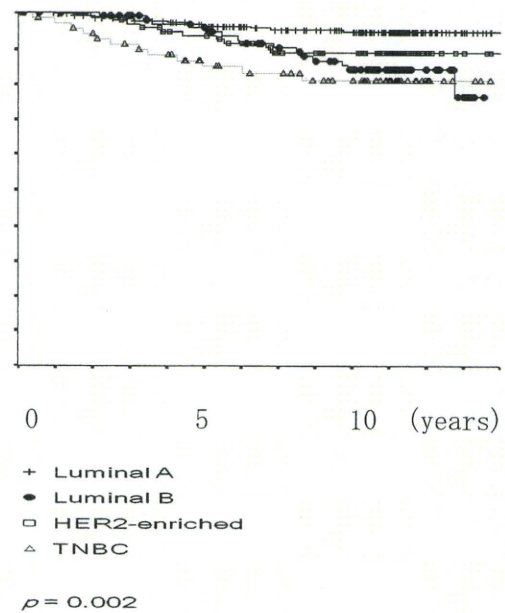


図2 全生存期間



Cox 単変量解析によると、Disease-free survival の延長に相関する因子として、エストロゲン受容体陽性、Ki67低値、組織グレードの低いもの、NSAS criteriaが eligible のものが挙げられ、Cox 多変量解析では、Ki67低値、NSAS criteriaが残った (表3)。

II, III期、原発性乳がん474例 (術前化学療法症例) の解析においては、TIL (Tumor-infiltrating lymph

ocytes)の発現量 (score) とJBCRGの判定基準におけるpCRとの間には強い相関を認めた (P=0.008) (表4)。又、特に、TNBにおいては、他の亜型と比較して、TIL scoreとapoptosis indexとpCRとの間には強い相関を認める傾向があった。

表3 Cox 単変量解析

Univariate analysis	Hazard ratio	95% CI	p value
ER - vs. +	1.88	1.12 - 3.17	0.02
Ki 67 <20 vs. ≥20%	0.36	0.21 - 0.61	0.0001
nuclear grade (1 vs. 2, 3)	0.42	0.22 - 0.81	0.009
NSAS criteria	0.27	0.13 - 0.57	0.0006
Multivariate analysis			
Ki 67 <20 vs. ≥20%	0.45	0.24 - 0.84	0.01
NSAS criteria	0.22	0.07 - 0.67	0.008

表4 TIL発現量 (score) とpCR

Subtype of breast cancer and response to NAC		No. of patients (%)			p
		Total	TIL score		
			0-2	3-5	
TNBC					
pCR (NSABP B-18)	Yes	29 (32)	4 (16)	25 (37)	0.05
	No	63 (68)	21 (84)	42 (63)	
QpCR (JBCRG)	Yes	35 (38)	4 (16)	31 (46)	0.008
	No	57	21	36	

		(62)	(84)	(54)	
pCR (primary + lymph nodes)	Yes	26 (28)	4 (16)	22 (33)	0.11
	No	66 (72)	21 (84)	45 (67)	

D. 考察

10年前の手術症例を対象とした、大規模レトロスペクティブ解析により、5-10年の無増悪生存期間全生存期間を指標として、TNBが他のサブタイプと比較して予後不良であることを改めて示した。HER2陽性乳がんは、新規のHER2阻害剤の開発により、予後の改善がみられ、TNBCに対する治療戦略の改良が急務である。

E. 結論

TILは、TNBに対する抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの候補である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

国際学会

1. Kinoshita T. A multicenter study of image-guided radiofrequency ablation of small breast carcinomas. 35th ESMO Congress. Poster Presentation, Milan, Italy, 2010.
2. Kinoshita T. Feasibility and accuracy of sentinel lymph node biopsy after preoperative chemotherapy in breast cancer patients. 7th European Breast Cancer Conference. Poster Session, Barcelona, Spain, 2010.

国内学会

1. Kinoshita T. New UICC staging system for cancer (TNM-7) : problems and future perspectives in breast cancer. 69th Annual

- Meeting of the Japanese Cancer Association. International Sessions, Osaka, Japan, 2010.
- Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, et al. Optimal selection of neoadjuvant therapy using multigene expression profile and Ki67 for hormone sensitive breast cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oral Sessions, Osaka, Japan, 2010.
 - Ono M, Kinoshita T, et al. Predictive markers for response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oral Sessions, Osaka, Japan, 2010.
 - Kikuyama M, Kinoshita T, et al. Search for novel tumor-suppressor genes in human breast cancers. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Poster Sessions, Osaka, Japan, 2010.
 - Tsuda H, Kinoshita T, et al. Molecular pathological diagnosis for personalized medicine for patients with breast cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Symposia on Specific Tumors, Osaka, Japan, 2010.
 - Hasebe T, Kinoshita T, et al. p53 expression in tumor-stromal fibroblasts forming fibrotic foci in invasive ductal carcinoma of the breast. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Poster, Osaka, Japan, 2010.
 - 垂野 香苗, 木下 貴之, 他. 10cm 大に広がった非浸潤性小葉癌の 1 例. 第 7 回日本乳癌学会関東地方会, 一般演題, 大宮市, 2010 年 12 月
 - 堀 周太郎, 木下 貴之, 他. 乳がんセンチネルリンパ節における微小転移、isolated tumor cells の臨床的意義—腋窩リンパ節郭清は省略可能か?—. 第 1 2 回 SNNS 研究会学術集会, 一般演題, 横浜市, 2010 年 11 月
 - 北條 隆, 木下 貴之, 他. 乳がんに対する蛍光法によるセンチネルリンパ節生検における輝度値の検討. 第 12 回 SNNS 研究会学術集会, 一般演題, 横浜市, 2010 年 11 月
 - 長尾 知哉, 木下 貴之, 他. OSNA (One-step Nucleic acid Amplification) 法での乳癌センチネルリンパ節至適摘出個数の検討. 第 1 2 回 SNNS 研究会学術集会, 一般演題, 横浜市, 2010 年 11 月
 - 木下 貴之, 他. 乳癌に対する術前化学療法と低侵襲化治療の最前線. 第 48 回日本癌治療学会学術集会, 口演, 京都市, 2010 年 10 月
 - 北條 隆, 木下 貴之, 他. 乳癌術前アロマターゼ阻害剤の投与期間に関する新しい知見. 第 48 回日本癌治療学会学術集会, 口演, 京都市, 2010 年 10 月
 - 長尾 知哉, 木下 貴之, 他. センチネルリンパ生検で腋窩郭清範囲を規定できるか. 第 48 回日本癌治療学会学術集会, 口演, 京都市, 2010 年 10 月
 - 津田 均, 木下 貴之, 他. 乳房温存療法とセンチネルリンパ節生検における病理診断. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, シンポジウム, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 加賀美 芳和, 木下 貴之, 他. 治療期間が短縮される乳房温存療法での 3D-CRT による加速乳房部分放射線治療 (APBI). 第 18 回日本乳癌学会学術総会, シンポジウム, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 長尾 知哉, 木下 貴之, 他. 局所再発因子からみた乳房切除後放射線治療の検討. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, パネルディスカッション, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 木下 貴之, 他. 術前化学療法後乳癌症例に対するセンチネルリンパ節生検の長期成績に基づく諸問題. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, パネルディスカッション, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 枝園 忠彦, 木下 貴之, 他. 転移性乳癌の治療戦略としての原発巣切除の意義. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, ワークショップ, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 菅野 康吉, 木下 貴之, 他. 遺伝相談外来を受診した BRCA1/2 遺伝子変異を有する遺伝性乳がん卵巣がん家系の臨床遺伝学的特徴. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, ワークショップ, 札幌市, 2010 年 6 月
 - 北條 隆, 木下 貴之, 他. 術前術後内分泌療法からみたサブタイプ別の治療効果の検討と展望. 第 18 回日本乳癌学会学術総会, 口演,