

2010 26086A

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と
毒性軽減および医療経済負担低減に関する検証的研究

平成22年度 研究報告書

研究代表者 戸井 雅和

平成23(2011)年 5月31日

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と
毒性軽減および医療経済負担低減に関する検証的研究

平成22年度 研究報告書

研究代表者

戸井 雅和

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 教授

研究分担者

笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻病理病態学講座・病理診断学 教授

山城 大泰

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 非常勤講師

石黒 洋

京都大学医学部附属病院 探索医療センター検証部・外来科学療法部 改革推進講師

稲本 俊

天理よろず相談所病院 乳腺外科 嘱託部長

内藤 泰宏

慶応義塾大学 環境情報学部 准教授

杉本 昌弘

慶応義塾大学 環境情報学部 特別研究講師

近藤 正英

筑波大学人間総合科学研究科 准教授

黒井 克昌

東京都立駒込病院 外科(乳腺)・臨床試験科 部長

平成23(2011)年 5月31日

目 次

I. 総括研究報告	
抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と 毒性軽減および医療経済負担軽減に関する検証的研究 戸井雅和	----- 1
II. 分担研究報告	
1. ヒト乳癌におけるエストロゲン誘導性 microRNA-7 の EGFR 発現制御 笹野 公伸	----- 7
2. バイオマーカーや遺伝子解析を用いたホルモン 受容体陽性乳がんに対する化学療法の実施決定の妥当性の検証 山城 大泰 石黒 洋 稲本 俊	----- 18
3. 乳癌の治療効果予測のための数理アルゴリズム開発法の検討 内藤 泰宏 杉本 昌弘 高田 正泰	----- 26
4. PARP 阻害剤、and/or, lapatinib + trastuzumab の 術後補助療法導入時の経済効果評価 近藤 正英	----- 35
5. 術前化学療法における治療効果と予後に関する CD24 と CD44 の意義に関する研究 黒井 克昌 堀口 和美	----- 37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 巻末

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と 毒性軽減および医療経済負担低減に関する検証的研究

研究代表者

戸井雅和 京都大学大学院医学研究科 外科学講座乳腺外科学 戸井雅和

研究要旨

原発性乳がんの治療における最適化、個別化においては細胞障害性化学療法をいかに用いるかが極めて重要である。化学療法の最適化は再発リスクの抑制と同時に毒性軽減に直結し、quality of life (QOL)の向上の点でも意義が大きい。また、医療経済負担の軽減に寄与する。今年度は、サブタイプ別に化学療法の適応、効果予測、標的療法との併用に関する検討を行うとともに、費用対効果に関する検討を行った。ホルモン受容体陽性乳がんを対象に増殖指標 Ki67/ MIB1 labeling index (Ki67LI)、多遺伝子検査等を含む診療アルゴリズムを構築、日本の診療プラットフォームに適した化学療法の適応について最適化を行った。また、数理モデルを用いた従前化学療法の効果予測を目的とする alternating decision tree の開発研究を行い、従来よりも高精度の数理モデル系を作成した。術前化学療法の系で、乳がん細胞における cancer initiating cell 関連マーカーCD44/CD24 の発現と病理組織学的抗腫瘍効果、及び予後との関連性を検討し、CD44/CD24 発現の抗がん薬感受性に与える影響を分析した。ホルモン療法耐性の観点からは、miR-7 に着目し、ホルモン依存性、非依存性増殖機構に関する基礎的検討を行った。抗HER2療法と化学療法の併用療法に関して、効果予測因子の解析、術前治療例を対象にした病理組織学的抗腫瘍効果別の予後調査、費用対効果分析を国内の多施設共同試験として開始、施行した。これらの研究成果は、原発性乳がん患者における治療成績向上、QOLの改善、医療経済学的効率性の改善に寄与すると考えられる。

A.

研究目的

原発性乳がんの予後、治療効果予測因子を導入した診療アルゴリズムを構築し、再発リスクの抑制、患者負担の低減とQOLの改善ならびに医療経済負担の軽減を図ることを主目的とする。特に、抗がん薬感受性予測因子の導入を検討する。再発リスクの評価は乳がんの subtype 別に行う

こととし、luminal-type 乳がんでは細胞増殖指標、多遺伝子検査を導入し、複数の評価系を組み合わせる予後、治療効果予測システムの構築を目的とする。また、alternating decision tree (ADTree) 数理モデル系を用いた化学療法の効果予測アルゴリズムを開発する。術前化学療法の系において、乳がん細胞における

CD44/CD24 の発現を検索、治療効果、予後との関連性を検討し、cancer initiating cell の抗がん薬抵抗性に関する役割を分析する。ホルモン療法についてはmicroRNA分析からmiR-7に着目し、ホルモン非依存性増殖を主題に検討を行う。HER2陽性乳がんでは、術前に抗HER2療法+化学療法を施行した症例を対象に、組織学的抗腫瘍効果の予後に及ぼす影響、新規効果予測因子の探索と臨床応用の可能性を検討する。Basal型乳がんについては、poly-ADP ribose polymerase (PARP)-1など遺伝子修復関連酵素発現調節と抗がん薬抵抗性獲得との関連性を解析することとした。費用対効果分析は、化学療法、抗HER2標的薬の最適化を主題に検討を行う。

B. 研究方法

乳がんの subtype 別に検討を行うが、luminal-type では細胞増殖指標 Ki67/ MIB1 labeling index (Ki67LI)、多遺伝子検査 21 遺伝子シグナチャーについて、過去の測定症例を対象に、組み合わせ分析と術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果との関連性の検討を行った。

数理モデル研究では、alternating decision tree (ADTree) モデルを用いて、乳がんの強力な予後因子で全身療法の適応決定にも深く関連する腋窩リンパ節転移の有無の予測、術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果予測に関するモデルの開発を行った。既存の nomogram との比較、国内施設ならびに海外施設における性能評価検証試験を行った。

新規バイオマーカーの検討では、術前化学療法施行した原発性乳がん患者を対象にして、乳がん細胞における CD44/CD24 などの発現、免疫系分子の予後予測、効果予測因子としての意義を検討した。ホルモン療法については培養細胞株を用いて、microRNA 分析を行い、ホルモン依存性、非依存性増殖に関する分析を行った。

HER2 陽性乳がんでは、術前に抗HER2療法+化学療法を施行した症例を対象にして、組織学的抗腫瘍効果の予後に及ぼす影響を検討することとした。国内多施設共同研究で行うこととし、アンケート調査を行った。新規バイオマーカーに関する探索的検討では HER family の下流の細胞内情報伝達系分子に関する研究を行った。

Basal型乳がんについては、poly-ADP ribose polymerase (PARP)-1など遺伝子修復関連酵素発現調節と抗がん薬抵抗性獲得との関連性を解析することとした。

化学療法の適応に関する診療システム、術前抗

HER2 標的療法+化学療法の効果予測、予後予測の医療経済学的効率性を主検討課題として、費用対効果分析を行うこととした。

C. 研究結果

Luminal-type 乳がんの検討では、最近の京都大学医学部附属病院症例 362 例を主対象に、病理組織学的細胞増殖指標 Ki67/ MIB1 labeling index (Ki67LI)、多遺伝子検査 21 遺伝子シグナチャーについて検討した。Ki67LI は組織グレードに相関して増加する傾向にあり、21 遺伝子シグナチャー測定例における Ki67LI、recurrence score (RS)、組織グレードの関連性をみると、組織グレード1で Ki67LI が 15%未満の症例には High RS は認められなかった。組織グレード2の症例においては Ki67LI、RS の分布に一定の傾向はなかった。術前化学療法施行例で、組織学的治療効果との関係性をみると、組織グレード1症例における術前化学療法の抗腫瘍効果は 1/2a に限られており、著効例は認められなかった。2b 以上の組織学的奏効例は、組織グレード2、3かつ Ki67LI が 15%以上の症例においてのみ認められた。一連の結果は、組織グレード1かつ Ki67LI 15%未満の症例は局所療法とホルモン療法のみで化学療法非存在下に良好な予後が期待できる症例と考えられた。組織グレード2、3かつ Ki67LI が 15%以上の症例では、症例に応じて、複数のアッセイ方法を組み合わせ、予後ならびに治療効果の予測性を高めることが重要と考えられる。特に、組織グレード2で Ki67LI が 15%-30%程度の症例では腫瘍組織多遺伝子発現検査を組み合わせる意義があると考えられた。

Alternating decision tree (ADTree) 数理モデル系を用いた定式化に関しては、強力な予後因子で全身療法の適応決定にも密接に関連する腋窩リンパ節転移の有無の予測モデル、術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果予測モデルに関する検討を行った。前者に関しては検証試験を行い、良好な成績 (AUC 0.77) がえられた。後者に関してもアンストラサイクリン系抗がん薬およびタキサン系抗がん薬の逐次型の併用レジメンを用いた術前療法の病理学的完全奏効 (pCR) を予測するモデルを作成、初期的には高性能を示す結果が出ており、現在検証中である。既存の、nomogram と比較しても十分な性能を有すると判断された。

アンストラサイクリン、タキサンによる術前化学療法施行症例を対象にして、乳がん細胞における CD44/CD24 等の発現を検索し、治療効果、予後との関連性を検討した。CD44 の発現が予後と密接に相関することが明らかになった。CD44/CD24

status についてはさらに詳しい検討を行っている。

ホルモン療法に関してはER陽性乳癌培養細胞株 MCF-7 において RT² Profiler PCR Array System を用いて E2 によって誘導される miRNA 群を網羅的に検索し、さらに ER のアンタゴニストである ICI コンパウンドによる検討で ER を介して E2 によって誘導される miRNA の解析から miR-7 に注目することとした。今回の検討では、MCF-7 乳癌細胞において miR-7 発現の減少が認められる培地の E2 枯渇により EGFR の発現増加が観察され、一方 miR-7 のトランスフェクションにより EGFR の発現減少が観察された。ER、EGFR、miR-7 の密接な関係を示唆する結果である。原発性乳がん組織を用いた 3 者の相関関係に関する検討も行った。

HER2 陽性乳がんでは、術前に抗 HER2 療法＋化学療法を施行した症例を対象にして、組織学的抗腫瘍効果の予後に及ぼす影響を多施設共同研究で検討するため、アンケート調査を行った。その結果、千例規模での研究調査が施行可能であることが判明したので、現在 CRF 等の準備を行っている。バイオマーカーに関しては、p95、PI3k/PTEN、erk に関する効果予測因子の検討を行うべく、多施設共同研究プロトコルの作成を行った。

Basal-type 乳がんに関しては、poly-ADP ribose polymerase (PARP)-1 など遺伝子修復関連酵素発現調節と抗がん薬抵抗性獲得との関連性を in vitro の系で解析、現在、データを分析するとともに、ヒト乳がん組織での検討を行うための手法に関する基礎的検討を行っている。

費用対効果分析については、21 遺伝子シグナチャーと化学療法の適応に関して分析を行った。その結果、21 遺伝子シグナチャー測定は、化学療法の適応を含めて、優れた医療経済効率をもたらすことが明らかになった。抗 HER2 療法＋化学療法に関しては、臨床調査を開始、データの収集を行った。

D. 考察

Luminal-type 乳がんを対象に、Ki67LI、多遺伝子検査 21 遺伝子シグナチャーの特性分析を臨床病理組織学的データとあわせて行った。Ki67LI と組織グレードの情報から、局所療法とホルモン療法（化学療法非存在下）で良好な予後が期待できる症例の亜群を選別できるかもしれない。例えば、組織グレード 1 かつ Ki67LI15%未満の症例である。これらの症例では術前化学療法の効果も低いことが示唆された。一方、グレードが高く

Ki67LI30%以上の症例では、再発リスクが高く、何らかの抗がん薬感受性を有すると判断されるので、多剤化学療法＋ホルモン療法が標準的治療として適当と考えられた。

しかしながら、それら以外の症例、グレード 2、Ki67LI15%-30%のような症例では、化学療法の効果、予後予測をより正確に行うためには新しい手法の導入が必要である。具体的には、21 遺伝子シグナチャーを例にとったが、組織グレード 2 の症例において Ki67LI、RS の分布に一定の傾向はなかった。また、組織グレード 2、3 かつ Ki67LI が 15%以上の症例では術前化学療法による病理組織学的奏効もしばしば認められた。

従って、これらの症例に対しては、新規手法を含む複数のアッセイ方法を組み合わせ、予後ならびに治療効果の予測性を高めることが重要と考えられた。

Alternating decision tree (ADTree) 数理モデル系を用いた腋窩リンパ節転移の有無の予測モデルに関しては、検証試験を行い、良好な成績 (AUC 0.77) がえられた。今後、臨床応用が可能と考えており、web 上での支援プログラムの作成を現在行っている。アンストラサイクリン系抗がん薬、タキサン系抗がん薬の逐次型の併用レジメンを用いた術前療法の病理学的完全奏効 (pCR) を予測するモデルについては、初期的には高性能を示す結果が出ており、さらに検討を重ねている。有望なモデルであり、検証中である。

乳がん細胞における CD44/CD24 等の発現は cancer initiating cell に密接に関連することが指摘されている。今回の検討では、CD44 の発現が予後と有意に相関していた。今後、さらに症例を積み重ね、CD44/CD24 status の臨床的意義を明らかにする予定である。術前化学療法施行時の予後予測性についてもさらに詳しい検討を行っている。

ホルモン療法に関しては、miRNA の解析から miR-7 が注目された。臨床的意義の検討が必要であるが、基礎的に極めて興味深い結果であり、今後、術前ホルモン療法の効果等との関連性を検討する予定である。ホルモン感受性の低下やホルモン非感受性の獲得にどのような役割を演じているか、興味深いところである。ホルモン療法感受性の評価は、化学療法不要症例の選別にも有用で、ホルモン療法の至適投与期間を考慮する際にも有用と考えられる。

HER2 陽性乳がんでは、術前に抗 HER2 療法＋化学療法を施行した症例を対象にして、組織学的抗腫瘍効果の予後に及ぼす影響を検討することとした。アンストラサイクリン系抗がん薬とタキサン系

抗がん薬の逐次型併用レジメンを用いた術前化学療法の効果と予後との関連に関する結果はあるが、抗 HER2 療法を加えた際の病理組織学的効果と予後の関連性をみたデータは極めて少ない。わが国でこれまで蓄積されたデータを集積、組織学的効果の予後に及ぼす影響を千例規模で検討する予定である。化学療法単独等と同様の傾向、すなわち pCR 例における良好な予後、が確認されれば、抗 HER2 療法の術後の投与期間を考慮する上で重要であるし、non-pCR 症例群の中にも良好な予後を示す症例があれば、効果予測因子の検討に関して、効果の定義を変更する必要を生じる。

従って、本検討は極めて重要である。抗 HER2 療法効果予測因子に関する検討は術前治療の効果予測を主題に進めている。これまでの検討で、PI3K/PTEN 系の異常、p95 異常 HER2 蛋白の発現、antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) の関与、などが抗 HER2 療法の効果、耐性に関連する分子機構としてあげられているが、erk 関連の機構の異常についても検討を加える予定である。現在、臨床研究を予定している。Basal-type 乳がんに関しては、遺伝子修復関連酵素発現調節と抗がん薬抵抗性獲得に着目した検討を行っている。in vitro の系における検討段階であるが、遺伝子の損傷と修復を視覚化する試みを行っている。初期的には、ヒト乳がん細胞における検討が可能であることが確認されたが、今後、臨床材料を用いた検討に展開するためには、新しいアッセイ系の開発が必要である。

費用対効果分析は、21 遺伝子シグナチャーと化学療法の適応に関して分析を行った。興味深い成績がえられており、わが国の診療基盤においても、優れた医療経済効率性をもたらす可能性が明らかになった。適切な化学療法の選択により、治療成績を向上し、同時に医療経済効率性を高めることが可能と思われる。

E. 結論

原発性乳がんに対する細胞障害性化学療法の治療最適化、個別化研究を行った。

- 1) ホルモン受容体陽性 luminal-type 乳がんを対象にした検討で、増殖指標 Ki67/ MIB1 labeling index、組織グレード、多遺伝子検査の 21 遺伝子シグナチャーを症例に応じて、組み合わせることにより、よりの確な予後予測と治療効果の予測が可能になると考えられた。
- 2) 腋窩リンパ節転移の有無を予測する数理モデル、術前化学療法の病理組織学的効果を

予測する数理モデルを作成、評価研究を行った。前者は検証試験においても高い性能を示すことが明らかになった。後者も高い性能を示唆する結果で、さらに改良を加えている。

- 3) 術前化学療法の効果予測に関して、cancer initiating cell 関連するマーカー CD44/CD24 等の発現と病理組織学的抗腫瘍効果、及び予後との関連性を検討し、予後との関係を示す結果がえられた。さらに検討を重ねている。
- 4) ホルモン療法の効果、耐性の観点から、miR-7 に着目し、ホルモン受容体、miR-7, HER family の相関関係を検討、3 者の発現が密接に関連することを示唆する結果がえられた。
- 5) 術前抗 HER2 療法と化学療法の併用療法に関して、病理組織学的抗腫瘍効果別の予後を検討するための予備調査を行った。臨床研究を行う必要があると判断した。
- 6) 術前抗 HER2 療法+化学療法の効果予測因子に関する臨床研究をデザインし、試験プロトコール作成を進めた。
- 7) Basal-type 乳がんの遺伝子損傷修復に関するアッセイ系開発を基礎的に行った。
- 8) 費用対効果分析を多遺伝子検査について行い、有用な結果と思われた。

健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toi M, Winer EP, Inamoto T, Benson JR, Forbes JF, Mitsumori M, Robertson JF, Sasano H, von Minckwitz G, Yamauchi A, Klimberg VS. Identifying gaps in the locoregional management of early breast cancer: Highlights from the Kyoto Consensus Conference. *Ann Surg Oncol* 2011 [Epub ahead of print]
2. Toi M, Saji S, Masuda N, Kuroi K, Sato N, Takei H, Yamamoto Y, Ohno S, Yamashita H, Hisamatsu K, Aogi K, Iwata H, Takada M, Ueno T, Saji S, Chanplakorn N, Suzuki T, Sasano H. Ki67 index changes, pathological response and clinical benefits in primary breast cancer patients treated with 24 weeks of aromatase inhibition. *Cancer Sci* 102:858-865, 2011.
3. Tang Y, Xu F, Tao K, Qian N, Toi M. Clinical Applications of Sentinel Lymph Node Biopsy in Ductal Carcinoma in situ of the Breast: A Dilemma. *Tohoku J Exp Med* 224:1-5, 2011.

4. Chow LW, Yip AY, Chu WP, Loo WT, Toi M. Bone metabolism and quality-of-life of postmenopausal women with invasive breast cancer receiving neoadjuvant hormonal therapy: Sub-analyses from celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011 [Epub ahead of print]
5. Honda M, Saji S, Horiguchi S, Suzuki E, Aruga T, Horiguchi K, Kitagawa D, Sekine S, Funata N, Toi M, Kuroi K. Clinicopathological analysis of ten patients with metaplastic squamous cell carcinoma of the breast. *Surg Today* 41:328-32, 2011.
6. Kondo M, Hoshi SL, Yamanaka T, Ishiguro H, Toi M. Economic evaluation of the 21-gene signature (Oncotype DX®) in lymph node-negative/positive, hormone receptor-positive early-stage breast cancer based on Japanese validation study (JBCRG-TR03). *Breast Cancer Res Treat*. 2010 [Epub ahead of print]
7. Procter M, Suter TM, de Azambuja E, Dafni U, Van Dooren V, Muehlbauer S, Climent MA, Rechberger E, Liu WTW, Toi M, Coombes CR, Dodwell D, Pagani O, Madrid J, Hall M, Chen SC, Focan C, Muschol M, van Veldhuisen DJ, Piccart-Gebhart MJ. Longer-term assessment of trastuzumab-related cardiac adverse events in the herceptin adjuvant (HERA) trial. *J Clin Oncol* 28:3422-8, 2010.
8. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Correa C, McGale P, Taylor C, Wang Y, Clarke M, Davies C, Peto R, Bijker N, Solin L, Darby S. Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2010:162-77, 2010. (As one of 610 collaborators)
9. Horiguchi S, Hishima T, Hayashi Y, Shiozawa Y, Horiguchi K, Kuroi K, Toi M, Funata N, Eishi Y. HER-2/neu cytoplasmic staining is correlated with neuroendocrine differentiation in breast carcinoma. *J Med Dent Sci* 57:155-63, 2010.
10. Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, Sugimoto M, Naito Y, Hayashi Y, Ueno T, Ohno S, Funata N, Kuroi K, Tomita M, Eishi Y. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. *J Med Dent Sci* 57:165-75, 2010.
11. Kitagawa D, Saji S, Horiguchi S, Satoh Y, Horiguchi K, Toi M, Funata N, Kuroi K. Alternation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in primary breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast J* 16:435-6, 2010.
12. Toi M, Iwata H, Yamanaka T, Masuda N, Ohno S, Nakamura S, Nakayama T, Kashiwaba M, Kamigaki S, Kuroi K; Japan Breast Cancer Research Group-Translational Research Group. Clinical significance of the 21-gene signature (Oncotype DX) in hormone receptor-positive early stage primary breast cancer in the Japanese population. *Cancer* 116:3112-8, 2010.
13. Yiu CC, Chanplakorn N, Chan MS, Loo WT, Chow LW, Toi M, Sasano H. Down-regulation of heat shock protein 70 (HSP-70) correlated with responsiveness to neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Anticancer Res* 30:3465-72, 2010.
14. Ishiguro H, Kondo M, Hoshi SL, Takada M, Nakamura S, Teramukai S, Yanagihara K, Toi M. Economic evaluation of intensive chemotherapy with prophylactic granulocyte colony-stimulating factor for patients with high-risk early breast cancer in Japan. *Clin Ther* 32:311-326, 2010.
15. Toi M, Sperinde J, Huang W, Saji S, Winslow J, Jin X, Tan Y, Ohno S, Nakamura S, Iwata H, Masuda N, Aogi K, Morita S, Petropoulos C, Bates M. Differential survival following trastuzumab treatment based on quantitative HER2 expression and HER2 homodimers in a clinic-based cohort of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 23:10:56, 2010.
16. Chanplakorn N, Chanplakorn P, Suzuki T, Ono K, Chan MS, Miki Y, Saji S, Ueno T, Toi M, Sasano H. Increased estrogen sulfatase (STS) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1(17beta-HSD1) following neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010 [Epub ahead of print]
17. Chow LW, Toi M. Combat against cancer with science and medicine. *Expert Opin Investig Drugs. Suppl* 1:S3-4, 2010.
18. Yamashiro H, Takada M, Toi M. Local management after pre-operative chemotherapy. Local and systemic management of primary breast cancers. Edited by Toi M and Winer EP. Kyoto University Press, 2010.
19. Inamoto T, Takada M, Toi M. Results of questionnaire survey of breast cancer specialists about optimal surgery for patients with breast cancer. Local and systemic management of primary breast

cancers. Edited by Toi M and Winer EP.
Kyoto University Press, 2010.

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

ヒト乳癌におけるエストロゲン誘導性 microRNA-7 の EGFR 発現制御

分担研究者 笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野

研究要旨

microRNA (miRNA) は 22 塩基程度のタンパクをコードしない RNA であり、様々な遺伝子の発現を制御することで多彩な生物学的プロセスに関与し、癌を含む多くの疾患の発生や進行に関与していることが分かってきている。罹患率が上昇し続け、女性の健康を脅かしている乳癌においても miRNA の及ぼす影響が研究されており、サブタイプによる miRNA 発現の違いや薬剤耐性に関わる miRNA などが報告されている。さらにエストロゲンによって抑制される miRNA も乳癌で報告されているが、エストロゲンによって誘導される miRNA とその機能については明らかではない。そこで今回我々は Estradiol (E2) によってエストロゲン受容体 (ER) を介して誘導される miRNA を決定し、その標的遺伝子から乳癌における miRNA の機能について検討することを目的とした。最初に ER 陽性乳癌培養細胞株 MCF-7 において RT² Profiler PCR Array System を用いて E2 によって誘導される miRNA 群を網羅的に検索した。さらに ER のアンタゴニストである ICI による検討で ER を介して E2 によって誘導される miRNA の解析で miR-7 に注目した。miR-7 は乳癌では ER 発現と逆相関している事が知られている上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的遺伝子としていることがこれまでに報告されており、今回の検討では miR-7 の発現が減少する培地の E2 枯渇により EGFR の発現増加が MCF-7 において観察され、また miR-7 のトランスフェクションにより EGFR の発現減少が観察された。

実際の乳癌組織から Laser Capture Microdissection / PCR 法にて癌細胞における ER、miR-7、EGFR の関係を検討した。また、免疫組織化学にて ER、EGFR の発現とその局在を比較した。これらの検討では、乳癌細胞においては ER、miR-7、EGFR の関係が明らかではなかった。このことは免疫組織化学の結果から ER と EGFR の発現パターンが同一組織の癌細胞においても大きく異なることが原因であると考えられた。

本検討により乳癌において内分泌療法によるエストロゲンシグナルの遮断で、miR-7 の発現が減少し、その標的遺伝子である EGFR の発現が亢進することで増殖因子シグナルが活性化し内分泌療法の抵抗性につながる可能性が考えられた。

A.

研究目的

miRNA は 20~25 塩基程度の non-coding RNA で、mRNA の切断や翻訳阻害をすることにより遺伝子の発現を制御をしている。miRNA の標的遺伝子の mRNA との結合の特異性は、主として miRNA の 5' 側に存在する 6~8 塩基ほどの長さの seed-sequence によって規定されており、mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することによってそれぞれの miRNA が多数の標的遺伝子の発現制御に関わっている。このように miRNA は多くの遺伝子の発現制御を行なうことで細

胞の分化、増殖、アポトーシスからストレス応答など様々な生物学的プロセスにとって重要な機能を果たしている²⁻⁷⁾ことが明らかとなり、miRNA が異常に発現することで様々な疾患に関連していることが報告されてきた。特に癌においては癌関連遺伝子の異常制御などにより発生や進展への関与が研究されている。例えば、腫瘍抑制的に働く miRNA として let-7 は *H-RAS*、*HMG2* などを標的とすることで増殖や分化に関与し、miR-206 は *ESR1* (ERα) を標的とすることで ER シグナルに関与し

ていることなどが報告され、腫瘍促進的に働く miRNA として miR-21 は *BCL-2*, *PTEN* などを標的とすることでアポトーシスや増殖に関与し、miR-10b は *HOXD10* を標的として転移に関与していることなどが報告されている。また癌の治療においては薬剤耐性が問題になることが多いが、耐性に関与している可能性のある miRNA も明らかになってきている。miR-221/222 は *ESR1* や *p27^{ip1}* を標的とすることで乳癌の内分泌療法に対する抵抗性との関与が示唆されている。

乳癌におけるリスクファクターであり、さらには増殖因子となるエストロゲンと miRNA の関係について知ることは乳癌の病態や診断、治療への応用のために重要であると考えられる。これまでもエストロゲンによって miRNA の発現が抑制され、抗エストロゲン療法の耐性への関与が示唆されている。しかし、エストロゲンによって誘導される miRNA が乳癌においてどのような機能を有しているのかはいまだ明らかではない。そこで、本研究では ERα 陽性ヒト乳癌培養細胞株 MCF-7 において Estradiol (E2) によって ER を介して誘導される miRNA を決定し、その miRNA の標的遺伝子から乳癌における機能について検討することを目的とした。

B. 研究方法

細胞培養

本研究では乳癌培養細胞株 MCF-7、MDA-MB-231、T47-D (以上、東北大学医用細胞資源センターより入手)、SKBR-3 (ATCC より購入) を使用した。乳癌培養細胞は FBS を 10% 添加した RPMI-1640 培地で、100 mm dish を用いて 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。E2, ICI による影響を検討する実験に使用した細胞は、約 70% confluent の状態で Charcoal-FBS を 10% 添加した RPMI-1640 (phenol red-free) 培地に交換し、5% CO₂ 存在下、37°C で 48 時間培養後、96 well plate, 6well plate または 100 mm dish に 5,000 cells/well

となるように細胞を播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。

エストロゲンの枯渇実験では、Charcoal 処理 FBS を 10% 添加した RPMI-1640 (phenol red-free) 培地に培地を交換し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。エストロゲン枯渇の影響を検討する実験に使用した細胞は、約 70% confluent まで増殖したらさせた後、6well plate に 5,000 cells/well となるように細胞を播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。E2, ICI, 4-OHT を DMSO に溶解し、96 well plate, 6well plate または 100 mm dish に目的の濃度になるように Charcoal-FBS を 10% 添加した RPMI-1640 (phenol red-free) 培地で希釈した溶液を添加し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

miR-7 の transfection

G-fectin (Genolution Pharmaceutical, Seoul, Korea) 8 μL と miR-7 合成 (Genolution Pharmaceutical) 4 μL に PBS 188 μL を加え、室温で 10 分間インキュベートした後、RPMI-1640 (phenol red-free) 培地が 1800 μL 入った 6well plate の well に 200 μL をマイクロピペットを用いて滴下し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

症例

東北公済病院で外科的切除された乳癌組織 21 例と、東北大学病院で外科的切除された乳癌組織 21 例を解析に用いた。

Laser Capture Microdissection (LCM)

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織をマイクロトームで 8 μm に薄切し、メンブレンスライドに載せて 60°C のインキュベーターで 3 時間進展させた。LCM は MMI Cellcut (Molecular Machines and Industries, Glattbrugg, Switzerland) を用いて行ない、トルイジンブルー染色を行なった標本から顕微鏡下で癌細胞のみを回収した。

total RNA の抽出

1) 培養細胞からの total RNA 抽出

100 mm dish または 6 well plate で培養した細胞に Trizol を 1 mL または 500 μ L 添加し、1.5 mL チューブに移した。そこにクロロホルム 200 μ L または 100 μ L を添加し、15 秒間強く攪拌し室温で 3 分間静置した。4°C、12,000 G で 15 分間遠心後、水層のみを新しい 1.5 mL チューブに移し、イソプロパノールを 500 μ L または 250 μ L 添加し、転倒混和した後に室温で 10 分間静置した。4°C、12,000 G で 5 分間遠心後、上清を廃棄し、75% Ethanol を 1 mL または 500 μ L 添加し、4°C、7,500 G で 5 分間遠心した。上清を廃棄し、室温で RNA ペレットを乾燥後、ddH₂O を 50 μ L または 25 μ L で RNA を溶解し、-80°C で保存した。

2) 凍結組織からの total RNA 抽出

凍結組織からの total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行なった。LCM にて回収した組織に Buffer RLT を加え、Max speed で 3 分間遠心し、上清を取り出しマイクロ遠心チューブに移した。上清と等量の 70% エタノールを加え、ピペティングで混和した。溶液を 2 mL collection tube にセットした RNeasy spin column にアプライし、10,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。700 μ L の Buffer RW1 を RNeasy spin column に添加し、10,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。500 μ L の Buffer RPE を RNeasy spin column に添加し、10,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。500 μ L の Buffer RPE を RNeasy spin column に添加し、10,000 rpm で 2 分間遠心し、ろ液を捨てた。RNeasy spin column を新しい 2 mL collection tube にセットし、Max speed で 1 分間遠心した。RNeasy spin column を新しい 1.5

mL collection tube にセットし、RNase-free water を 30 μ L column の中心に添加し、10,000 rpm で 1 分間遠心し RNA を溶出し、-80°C で保存した。

miRNA 抽出

miRNA の抽出は PureLink miRNA Isolation Kit (K1570-01, Invitrogen) を用いて行なった。LCM により回収した癌細胞に Binding Buffer (L3) を 300 μ L 加え、70% エタノールを 300 μ L 加えた。その溶液を Spin Cartridge にアプライし、12,000 G で 1 分間遠心してろ過し、そのろ液に 100% エタノールを 700 μ L 加え Spin Cartridge にアプライし、12,000 G で 1 分間遠心してろ液を捨てた。その Spin Cartridge に Wash Buffer (W5) を 500 μ L アプライし、12,000 G で 1 分間遠心してろ液を捨てた。Cartridge を新しい 1.5 mL tube に移し、65°C に温めた RNase free water を 50 μ L Cartridge の中心に載せ、1 分間室温でインキュベートした後、Max speed で 1 分間遠心して miRNA を溶出し、-80°C で保存した。

定量的 RT-PCR

1) cDNA の作製

Quantitect Reverse Transcription kit (QIAGEN) を用いて cDNA の作製を行なった。抽出した total RNA 溶液を ND-1000 (Nano Drop Technologies, Inc., DE, USA) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定し、RNA の濃度と純度を算出した。260 nm での濃度より算出した total RNA 溶液から 1 μ g RNA 相当量を PCR 用チューブにとり移し、gDNA wipeout buffer 7x を 2 μ L および ddH₂O を添加し全量 14 μ L とした。サーマルサイクラー (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., MA, USA) を用いて 42°C で 2 分間インキュベートし混入 DNA を除去後に氷冷し、逆転写反応溶液 (表 3A) を 6 μ L 添加した。これを 42°C で 30 分間インキュベートした後、95°C で 3 分間反応させて反応を停止し、作製した cDNA は -80°C で保存

した。

2) Real-time PCR

各 cDNA 1 μ L と定量 PCR 反応液 (表 3B) 19 μ L をキャピラリーに添加後、スピンドウンし、LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて 95°C 10min で熱変性の後、以下の条件で反応させた。各遺伝子の発現量は内部コントロール遺伝子として使用した ribosomal protein L13a (RPL13A) の発現量に対しての比率 (%) として算出し評価に用いた。用いたプライマーと条件は表 4 に示した。

RT² miRNA PCR Array Assay

1) cDNA の作製

RT² miRNA First Strand Kit (MA-03, QIAGEN) を用いて cDNA の作製を行なった。抽出した total RNA 溶液を ND-1000 を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定し、RNA の濃度と純度を算出した。260 nm での濃度より算出した total RNA 溶液から 1 μ g RNA 相当量を PCR 用チューブに移し、miRNA RT Primer & ERC Mix を 1 μ L、5x miRNA RT Buffer 2 を 2 μ L、miRNA RT Enzyme Mix を 1 μ L、Nucleotide Mix を 1 μ L および ddH₂O を添加し全量 10 μ L とした。サーマルサイクラーを用いて 37°C で 2 時間インキュベートした後、95°C で 5 分間反応させて反応を停止し、作製した cDNA に ddH₂O を 90 μ L 加え氷上に置き、12 時間以内に PCR Array または PCR Assay に用いた。

2) PCR Array

PCR Array は Human Cancer RT² qPCR Array (RT² Profiler PCR Array System, QIAGEN) を用いて行なった。Human Cancer RT² qPCR Array は癌に関連のあると報告のある 88 種の miRNA と 4 種の内部コントロール遺伝子、逆転写コントロールと陽性コントロールが 2well ずつ含まれている。RT² SYBR[®] Green/ROX[™] qPCR Master Mix (QIAGEN) を 1275 μ L、ddH₂O を 1175 μ L、cDNA を 100 μ L 混ぜ、Human Cancer RT² qPCR

Array の 96well plate の各 well に 25 μ L ずつ添加後、スピンドウンし、ABI7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて使用説明書に従って解析を行なった。発現量は RT² Profiler PCR Array Data Analysis (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) を用いて解析した。

3) PCR Assay

各 cDNA 1 μ L と RT² SYBR[®] Green/ROX[™] qPCR Master Mix を 12.5 μ L、ddH₂O を 10.5 μ L、目的の miRNA または内部コントロール遺伝子である U6 の RT² miRNA qPCR Assay primer を 1 μ L 96well plate に添加し、スピンドウンして、PCR Array と同様に ABI7500 リアルタイム PCR システムを用いて使用説明書に従って解析を行なった。発現量は目的の miRNA と U6 の Ct 値の差を利用して、 $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて計算した。

免疫組織化学法

1) 薄切

FFPE 組織をマイクロトームで 3 μ m に薄切し、切片をスライドガラスに載せ 50°C の進展器で一晩進展させた。

2) 脱パラフィン

キシレンで 4 回、エタノールで 4 回洗浄して脱パラフィンした後、よく水洗した。

3) ER, Progesterone Receptor (PGR)

ER、PGR の染色は自動染色装置 BENCH MARK を用いた。染色にはベンタナ I-VIEW コンファーム ER (SP1) および PGR (TE2) (Roche Diagnostics) (表 5) をそれぞれ使用し、プロトコールは BENCH MARK のプログラムに従った。染色後の標本は、ヘマトキシリンで核染色後、水洗し、エタノールで脱水し、キシレンで透徹して、カバーガラスで封入した。

4) EGFR

EGFR の染色は EGFR pharmDx kit (Dako, Kyoto, Japan) を用いた。脱パラした標本を蒸留水で洗浄後、タンパク分解酵素

試薬 (Proteinase K) を添加し、室温で 5 分間静置した。蒸留水中で 5 分間洗浄後、ブロッキング試薬 (H_2O_2) を添加し、室温で 5 分間静置した。洗浄液 (トリス塩酸緩衝液) 中で 5 分間洗浄後、一次抗体 (抗ヒト EGFR (2-18C9)・マウスモノクローナル抗体) (表 5) を添加し、室温で 30 分間静置した。洗浄液中で 5 分間洗浄後、ポリマー試薬 (パーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体) を添加し、室温で 30 分間静置した。洗浄液中で 5 分間洗浄後、発色基質 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) を添加し、室温で 10 分間静置した (発色)。発色後、ヘマトキシリンで核染色を行ない、水洗した後、エタノールで脱水し、キシレンで透徹して、カバーガラスで封入した。

5) 評価

ER と PGR の評価は癌細胞を 1000 個観察し核に染色の認められるものを陽性細胞とし、その割合を求め (Labeling index: LI)¹⁸⁾、10%以上を陽性とした。EGFR の評価は、癌細胞の細胞膜に僅かでも染色の認められるものを陽性とした¹⁹⁾。

統計解析

統計解析には Stat View software (Stat View-J 5.0, SAS Institute Inc. NC, USA) を用いた。細胞増殖試験、qRT-PCR、PCR Assay は Bonferroni / Dunn の多重比較検定によって解析した。P 値が 0.05 未満のものを有意差ありと判断した。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得ている (No. 2009-203)。

C. 研究結果

1) ER 陽性乳癌培養細胞株 MCF-7 において E2 が細胞増殖とエストロゲン応答遺伝子に与える影響

E2 添加 24 時間後では、いずれの濃度にお

いても MCF-7 の細胞数に変化は見られなかったが、48 時間後、72 時間後の MCF-7 では検討をした全ての E2 濃度で有意な細胞数の増加が観察された ($p < 0.05$)。しかし、細胞数に変化の見られない 10 pM E2 添加 24 時間後の細胞において、エストロゲン応答遺伝子である pS2 は C-FBS に対して有意に高発現であった ($p < 0.001$)。

2) E2 が miRNA 発現に与える影響

エストロゲン応答遺伝子の発現に変化の観察された 10 pM E2 24 時間添加の条件で miRNA の発現変化を解析したところ、E2 添加によって 17 種の miRNA の発現が有意に 2 倍以上増加した。また、E2 と ICI を同時添加すると E2 単独に比較して 5 種の miRNA の発現が有意に 2 倍以上変化した。これらの miRNA のうち E2 で発現が増加し、ICI でその発現増加が抑制された miRNA は miR-7 のみであった。

3) MCF-7 において E2 が EGFR の発現に与える影響

Charcoal 処理によって E2 を除去した FBS (C-FBS) と通常使用している FBS (FBS) をそれぞれ含む培地で MCF-7 を培養したところ、3 日間では EGFR の発現はほぼ同程度であるが、時間依存的に C-FBS で培養した細胞の EGFR の発現量の増加を確認した。また、charcoal 処理では E2 以外の分子も除去されている可能性があるため、この EGFR の発現増加が E2 枯渇によるものであるかどうかを確認するために、C-FBS + E2 添加、FBS + ICI 添加の条件で検討を行なった。FBS と C-FBS + E2 添加に比較して C-FBS で EGFR が有意に高発現であり ($p < 0.05$)、FBS + ICI 添加でも C-FBS と同程度の EGFR の発現を確認した。さらに E2 の濃度による影響を観察したところ、検討した E2 の濃度に依らず C-FBS に比較して有意な EGFR の低発現を確認した ($p < 0.001$)。

4) 乳癌培養細胞において E2 枯渇が EGFR

の発現に与える影響

MCF-7においてはEGFRがE2の枯渇によって発現亢進することが確認されたが、その他の乳癌培養細胞株に対する影響を確認した。ER陽性のT47DにおいてはFBSと比較してE2の枯渇(C-FBS)によりEGFRの発現が増加する傾向が観察され($p = 0.06$)、ER陰性のMDA-MB-231とSKBR-3ではE2枯渇でEGFRの発現に変化は見られなかった($p = 0.89$, $p = 0.36$)。

5) miR-7によるEGFR発現制御と細胞増殖

miR-7をトランスフェクションしたMCF-7細胞では、miR-NCのトランスフェクション細胞と比較してEGFRの有意な発現減少が観察された($p = 0.048$)。また、miR-7をトランスフェクションして4日目、5日目の細胞でmiR-NCと比較して有意な細胞数の減少が観察された($p = 0.002$, $p < 0.001$)。

6) ER陽性ヒト乳癌組織におけるERとEGFRの関係

ER陽性ヒト乳癌組織においてER mRNAとEGFR mRNAとの間には相関はなかった($p = 0.99$)。しかし、免疫組織化学染色での結果では、ER陽性乳癌組織のER陽性細胞ではEGFRの発現は認められず、逆にEGFR陽性細胞にはERの発現が認められなかった。

7) ヒト乳癌組織におけるmiR-7の発現
ER陽性のヒト乳癌FFPE組織においてERのLIとmiR-7の間に相関はなく($p = 0.39$)、またエストロゲンシグナルの指標として解析したPRのLIとmiR-7の間にも相関はなかった($p = 0.38$)。また、ER mRNAやEGFR mRNAとmiR-7の間にも相関はなかった($p = 0.79$) ($p = 0.91$)。

D. 考察

MCF-7におけるエストロゲンの増殖効果の検討では、E2の添加から48時間後、72時間後で有意な細胞数の増加を確認した。

エストロゲン応答遺伝子であるpS2の発現はエストロゲンの添加から24時間後で有意な発現増加を認めた。このことから、24時間ではエストロゲンに応答する細胞の増殖に影響はなかったが、遺伝子に変化することが分かった。これまではエストロゲン添加から4時間後、6時間後、48時間後でmiRNAの発現変化を見た報告がある。またMaillot Gらは、エストロゲン添加後短時間で誘導されるmiRNAの発現は不安定で、18時間以内のmiRNAの発現誘導については再現性が得られないことが多いことを報告した。さらに18時間以降にエストロゲンによって誘導されるmiRNAは安定的に発現することから、miRNAの転写自体は速い時間に変化してmiRNA前駆体の発現変動を引き起こすが、安定した成熟miRNAの発現に至るまでに時間を要することが示唆されている。これらのことを踏まえ、今回miRNAの発現変化はエストロゲン添加から24時間後に解析した。miR-21の発現はエストロゲンによって抑制されることが報告されているが、今回の検討ではエストロゲンによる誘導が観察された。このような結果の矛盾は、細胞の密度や血清の枯渇条件、またエストロゲンの濃度や反応時間によって引き起こされたと考えられる。本検討においてmiR-7の発現はE2により有意に3倍近く上昇することが確認された。miRNAにはmiRNA前駆体がDNAから転写されるエキソン型miRNAとmRNAのイントロン中にコードされているイントロン型miRNA(mirtron)があり、miR-7はmirtronに属するmiRNAでありhnRNP K(heterogeneous nuclear ribonucleic protein K)のイントロン中にコードされていることが報告されている。このhnRNP KはER陽性、PR陽性の乳癌組織で高発現していることが知られており、EREを持つエストロゲン応答遺伝子の一つであることが報告されている。このことから、miR-7のE2による誘導のメカニズムの仮説として、E2によりhnRNP Kの転写が増加し、そのスプライシングによってイン

トロン部分にある miR-7 の発現が増加すると考えられる。

miR-7 はこれまでに MCF-7 において *MRP1* (multidrug resistance protein 1) を制御しシスプラチン耐性に関与していること、いくつかのヒト乳癌培養細胞株で *Pak1* (p21-activated kinase 1) を制御し浸潤や足場非依存性の増殖を抑制すること、また舌癌培養細胞株において *IGF1R* (insulin-like growth factor 1 receptor) を制御することで細胞増殖を抑制しアポトーシスを亢進することなどが報告されてきた。今回、miRNA target data base の Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) と Microcosm Targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), [microRNA.org](http://www.microrna.org/microrna/home.do) (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) を用いた *in silico* 解析で EGFR と miR-7 の結合性が高いことが明らかとなった。これまでに乳癌を含むいくつかの培養細胞株で実際に miR-7 が *EGFR* を down-regulation し癌細胞の増殖を抑制することが報告されている。本検討では、R^{T2} miRNA PCR Array によって E2-ER-regulated miRNA として miR-7 が同定され、miR-7 の乳癌細胞における機能の一つとして EGFR の制御に関する検討を行なった。E2 によって miR-7 の発現は誘導され、E2 の枯渇により miR-7 の発現は抑制され *EGFR* mRNA の発現は増加した。また miR-7 のトランスフェクションによって *EGFR* mRNA の発現が減少した。これらのことから乳癌において E2 添加によって発現の増加した miR-7 は EGFR の発現を抑制しており、E2 の供給が断たれた場合には miR-7 の発現が抑制され、miR-7 による *EGFR* の制御が解除されるため EGFR の発現が増加することが示唆された。過去には Yarden らが、ER 陽性乳癌培養細胞株 BT474 において E2 添加によって EGFR の発現が抑制されることから、ER 陽性乳癌細胞における EGFR の発現抑制はエストロゲンの存在によって生じることが示唆され、また逆にエストロゲンの枯渇によって EGFR の発現が増

加することが認められている。これらの現象は増殖因子の欠乏によって引き起こされる細胞死を回避するため代替の増殖経路へスイッチングする現象であり、細胞自身に備わっている生存メカニズムであると説明されてきた。本検討により、今まで詳細が明らかではなかった細胞生存メカニズムに miR-7 が関与する可能性が考えられた。

今回は実際の乳癌組織においても検討を行なった。miRNA は FFPE 組織においても保存されていることが報告されており、今回エストロゲンシグナルと miR-7 の乳癌組織における関係をみるために FFPE 標本を用いた検討を行なった。また *EGFR* と miR-7 の関係は乳癌凍結組織を用いて LCM / PCR にて観察した。検討の結果、これらのヒト乳癌組織においてエストロゲンシグナルと miR-7、*EGFR* と miR-7 の間に有意な相関関係は確認されなかった。*EGFR* と ER の免疫染色の結果から、ER 陽性かつ *EGFR* 陽性の症例では、*EGFR* は乳癌組織にび漫性に発現するのではなく、局所的に ER を発現していない癌細胞に局在する傾向が認められた。今回の LCM / PCR の解析では癌細胞全体の解析であったため、癌細胞の情報が平均化されていることから培養細胞での検討と同様の結果が得られなかったと考えられる。今後 ER と *EGFR* の発現を評価し、その評価を基に LCM を行ない、miR-7 との関係を検討することが課題であり、また、*in situ* hybridization による病理組織上での miR-7 の発現局在を明らかにすることも重要であると考えられる。さらに、今回検討に使用した症例の実際のエストロゲンシグナルは明らかではないため、腫瘍局所のエストロゲン濃度と miR-7 との関係、内分泌療法前後での miR-7 の発現と耐性との関係を明らかにすることが重要である。

乳癌はエストロゲンに依存的に増殖することから、内分泌療法が用いられており、その機序には ER のアンタゴニストによる ER の機能阻害とエストロゲンの合成抑制の二つがある。ホルモン依存性の癌にとって内分泌療法の果たす役割は非常に大

きく、QOLのよい患者に負担の少ない薬物療法であるが、他の薬物療法と同様にしばしば薬剤耐性が問題となる。乳癌の内分泌療法の耐性獲得のメカニズムはこれまでも数々の報告があり、そのうちのひとつとしてERが陽性でエストロゲンシグナルへの依存性を残したままであるにもかかわらず、増殖因子シグナルの活性化による抵抗性が報告されている。このメカニズムはEGFRやHER2 (human epidermal growth factor receptor)、IGF-1R (insulin-like growth factor type 1 receptor)の発現亢進によるMAPK (mitogen-activated protein kinase)やPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) / Aktの活性化が関与していると考えられており、その結果としてエストロゲンシグナルの活性化が生じて内分泌療法に対する耐性を獲得する。このことから、増殖因子受容体 (growth factor receptor: GFR)の阻害によって内分泌療法への感受性が回復すると考えられ、GFR阻害剤と抗エストロゲン剤の併用の有効性が期待されている。これまでの報告では、膜型ERのnongenomic作用によってGFRのリン酸化による増殖因子シグナルが活性化することが知られているが、本検討ではmiR-7の発現抑制によるEGFRの発現亢進が確認され、さらに*in silico*解析でmiR-7がIGF-1Rも標的としていると予測されたため、miR-7の発現抑制はさらにIGF-1Rの発現亢進も引き起こす可能性が考えられた。

E. 結論

今回の結果より、内分泌療法でのエストロゲン合成阻害やERのブロックによるエストロゲンシグナルの抑制はmiR-7の発現を抑制し、その標的であるEGFRなどの増殖因子の発現を増加させ、細胞の増殖などに作用し内分泌療法の抵抗性を引き起こすことが示唆された。今後、乳癌内分泌療法への感受性の回復や増殖因子の制御のためにmiR-7の診断への応用、さらには治療への応用の可能性が考えられる。

F. 研究発表

・論文発表 (英文)

1. Sasano H, Miki Y, Shibuya R, Suzuki T. Aromatase and in situ estrogen production in DCIS (ductal carcinoma in situ) of human breast. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 118:242-245, 2010
2. Abe K, Miki Y, Ono K, Mori M, Kakinuma H, Kou Y, Kudo N, Koguchi M, Niikawa H, Suzuki S, Evans DB, Sugawara S, Suzuki T, Sasano H. Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor beta in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*; 41:190-198, 2010
3. Takeyama D, Miki Y, Fujishima F, Suzuki T, Akahira JI, Hata S, Miyata G, Satomi S, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor in human esophageal squamous cell carcinoma: A potent prognostic factor. *Cancer Sci*. 101:543-549, 2010
4. Sasano H, Miki Y, Nagasaki S, Suzuki T. In situ estrogen production and its regulation in human breast carcinoma: from endocrinology to intracrinology. *Pathol Int*; 59:777-789, 2009
5. Geisler J, Suzuki T, Helle H, Miki Y, Nagasaki S, Duong NK, Ekse D, Aas T, Evans DB, Lønning PE, Sasano H. Breast cancer aromatase expression evaluated by the novel antibody 677: Correlations to intra-tumor estrogen levels and hormone receptor status. *J Steroid Biochem Mol Biol*:118:237-241, 2010
6. Hiroki E, Akahira JI, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci*:101:241-249, 2010

7. Hong Y, Li H, Ye J, Miki Y, Yuan YC, Sasano H, Evans DB, Chen S. Epitope characterization of an aromatase monoclonal antibody suitable for the assessment of intratumoral aromatase activity. *PLoS One*;4:e8050, 2009
8. Hata S, Miki Y, Fujishima F, Sato R, Okaue A, Abe K, Ishida K, Akahira J, Unno M, Sasano H. Cytochrome 3A and 2E1 in human liver tissue: Individual variations among normal Japanese subjects. *Life Sci.* 86(11-12):393-401, 2010
9. Sasano H, Miki Y. Bone and Men's Health. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblasts *Clin Calcium.* 20:189-197, 2010
10. Tamaki K, Sasano H, Maruo Y, Takahashi Y, Miyashita M, Moriya T, Sato Y, Hirakawa H, Tamaki N, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Sci*;101:1051-1058, 2010
11. Chanplakorn N, Chanplakorn P, Suzuki T, Ono K, Chan MS, Miki Y, Saji S, Ueno T, Toi M, Sasano H. Increased estrogen sulfatase (STS) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1(17beta-HSD1) following neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*;120:639-648, 2010
12. Fukamachi K, Ishida T, Usami S, Takeda M, Watanabe M, Sasano H, Ohuchi N. Total-Circumference Intraoperative Frozen Section Analysis Reduces Margin-Positive Rate in Breast-Conservation Surgery. *Jpn J Clin Oncol*;40:513-520, 2010
13. Takagi K, Miki Y, Nagasaki S, Hirakawa H, Onodera Y, Akahira J, Ishida T, Watanabe M, Kimijima I, Hayashi S, Sasano H, Suzuki T. Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. *Endocr Relat Cancer*;17:415-430, 2010.
14. Sasano H. Histopathological prognostic factors in early breast carcinoma: an evaluation of cell proliferation in carcinoma cells. *Expert Opin Investig Drugs*;19 :S5-S11, 2010
15. Yiu CC, Sasano H, Ono K, Chow LW. Changes in protein expression after neoadjuvant use of aromatase inhibitors in primary breast cancer: a proteomic approach to search for potential biomarkers to predict response or resistance. *Expert Opin Investig Drugs*;19: S79-S89, 2010
16. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*;28:2784-2795, 2010 Review. Erratum in: *J Clin Oncol*;28:3543, 2010
17. Tamaki K, Sasano H, Ishida T, Ishida K, Miyashita M, Takeda M, Amari M, Harada-Shoji N, Kawai M, Hayase T, Tamaki N, Ohuchi N. The Correlation Between Ultrasonographic Findings

- and Pathologic Features in Breast Disorders. *Jpn J Clin Oncol*;40(10):905-912, 2010
18. Iino K, Oki Y, Yamashita M, Matsushita F, Hayashi C, Yogo K, Nishizawa S, Yamada S, Maekawa M, Sasano H, Nakamura H. Possible Relevance between Prohormone Convertase 2 Expression and Tumor Growth in Human Adrenocorticotropin-Producing Pituitary Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*;95: 4003-4011, 2010
 19. Yue X, Akahira J, Utsunomiya H, Miki Y, Takahashi N, Niikura H, Ito K, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) as a possible prognostic marker in epithelial ovarian cancer. *Pathol Int*: 60:400-406, 2010
 20. Vachon CM, Sasano H, Ghosh K, Brandt KR, Watson DA, Reynolds C, Lingle WL, Goss PE, Li R, Aiyar SE, Scott CG, Pankratz VS, Santen RJ, Ingle JN. Aromatase immunoreactivity is increased in mammographically dense regions of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 [Epub ahead of print]
 21. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*: 134:907-922. 2010
 22. Oka K, Suzuki T, Onodera Y, Miki Y, Takagi K, Nagasaki S, Akahira JI, Ishida T, Watanabe M, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Nudix-type motif 2 (NUDT2) in human breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with cell proliferation. *Int J Cancer*;128(8):1770-1782. doi: 10.1002/ijc.25505. 2010
 23. Tamaki K, Sasano H, Ishida T, Miyashita M, Takeda M, Amari M, Tamaki N, Ohuchi N. Comparison of core needle biopsy (CNB) and surgical specimens for accurate preoperative evaluation of ER, PgR and HER2 status of breast cancer patients. *Cancer Sci* :101,2074-2079 , 2010
 24. Sasaki Y, Miki Y, Hirakawa H, Onodera Y, Takagi K, Akahira JI, Honma S, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. Immunolocalization of estrogen-producing and metabolizing enzymes in benign breast disease: Comparison with normal breast and breast carcinoma. *Cancer Sci*;101,2286-2292, 2010
 25. Iida S, Miki Y, Ono K, Akahira JI, Suzuki T, Ishida K, Watanabe M, Sasano H. Novel classification based on immunohistochemistry combined with hierarchical clustering analysis in non-functioning neuroendocrine tumor patients. *Cancer Sci*;101(10):2278-2285. 2010
 26. Suzuki T, Miki Y, Takagi K, Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H. Androgens in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol*;43:75-81, 2010
 27. Miki Y, Suzuki T, Abe K, Suzuki S, Niikawa H, Iida S, Hata S, Akahira J, Mori K, Evans DB, Kondo T, Yamada-Okabe H, Sasano H. Intratumoral localization of

- aromatase and interaction between stromal and parenchymal cells in the non-small cell lung carcinoma microenvironment. *Cancer Res*;70:6659-6669, 2010
28. Yiu CC, Chanplakorn N, Chan MS, Loo WT, Chow LW, Toi M, Sasano H. Down-regulation of heat-shock protein 70 (HSP-70) correlated with responsiveness to neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 30:3465-3472, 2010
29. Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, Takagi K, Akahira JI, Sakyu T, Watanabe M, Inoue S, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression. *Cancer Sci*. 101:2670-2675, 2010
30. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Ito K, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
31. Ito K, Utsunomiya H, Niikura H, Yaegashi N, Sasano H. Inhibition of estrogen actions in human gynecological malignancies: New aspects of endocrine therapy for endometrial cancer and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 [Epub ahead of print]

G. 知的所有権の出願、取得状況

- 1) 特許取得
特になし
- 2) 実用新案登録
特になし
- 3) その他
特になし