

201118038A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次がん総合戦略研究事業

トリプルネガティブ乳がんに対する  
創薬と治療の最適化

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田村 研治

平成 24 (2012) 年 4 月

<目 次>

I.	総括・分担研究報告書	
	トリプルネガティブ乳がんに対する創薬と治療の最適化	
	田村 研治 . . . . .	1
II.	研究分担報告書 . . . . .	15
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	41
IV.	研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	43

# I. 総括研究報告書

## トリプルネガティブ乳がんに対する創薬と治療の最適化

研究代表者 田村 研治  
国立がん研究センター中央病院 乳腺科・腫瘍内科 通院治療室医長

### 研究要旨

トリプルネガティブ乳がん(TNB)を対象とし、1) エピゲノム解析、2) がん幹細胞解析、3) ゲノム・タンパク質異常と薬剤感受性解析、4) 病理学的解析などを用いて、創薬に直結する機能的な分類、及び、抗悪性腫瘍薬に対する「効果予測バイオマーカー」の同定を試みた。今年度の成果として、1) 昨年度同定した、hTERT、nucleostemin (NS) BRG1 が、M期進行に寄与することを明らかにしたこと、2) NS過剰発現人工がん幹細胞モデルを用いた抗がん剤感受性のアッセイ系を確立したこと、3) BRCA1 遺伝子のメチル化が乳がんのTNBサブタイプに限定された変化であること、4) 120例のTNB組織マイクロアレイ(TMA)を構築したこと、5) 昨年度同定したTNBC細胞株に対するmTOR阻害剤の感受性を規定する因子を、in vivo実験で再現したこと、6) TNBの患者の予後を規定する分子異常として、HER4、pAKT、pERKを同定したこと、7) マイクロアレイを用いた解析によりpCRを予測する遺伝子群候補として、特にSTAT3が重要であることを同定したことである。TNBに対する白金製剤の効果を検証する医師主導治験(N=190)の登録を終了した。現在、本試験の臨床検体を回収しており、バイオマーカーにむけて解析を進めている。

### 分担研究者

藤原 康弘 国立がん研究センター中央病院  
乳腺科・腫瘍内科 科長  
大岡 静衣 国立がん研究センター研究所  
がん幹細胞研究分野 研究員  
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  
小泉 史明 国立がん研究センター研究所  
遺伝医学研究分野 ユニット長  
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 科長  
木下 貴之 国立がん研究センター中央病院  
乳腺科・腫瘍内科 副科長

### A. 研究目的

日本人女性において乳がん罹患率は、現在1位(年齢調整罹患率52.2人/10万)、死亡率は3位であり(年齢調整死亡率11.6人/10万)今後も急速に増加すると考えられる。ホルモン非依存性HER2陰性乳がんは、「トリプルネガティブ(以下TNB)」と呼ばれ、乳がん全体の20%を占めるが、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に対し、1) 標的分子の解明、2) 分子標的薬の開発、3) 効果の指標となるバイオマーカーを同定することが急務である。以上の目的を達成するために、1) エピゲノム、2) 癌幹細胞、3) ゲノム・タンパク異常と薬剤感受性、4) 病理学的差異などの解析を集学して、ヘテロな集合体であるTNBを分子生物学的に特徴づけ、創薬に直結する機能的な分類を試みる。

テロメラーゼは細胞の不死化に重要な役割を担うことで発がんの分子機序に深く関わると同時に幹細胞の機能維持にも重要な役割を果たすことが知られている。テロメラーゼががん幹細胞の機能維持にどのように関わっているかに関しては十分な検討がなされていない。昨年度までに、テロメラーゼ触媒活性領域であるTERTが幹細胞因子であるNucleostemin(NS)およびクロマチンリモデリング因子であるBRG1と複合体を形成しがん幹細胞の機能維持に関わることを見出した。また、これらの因子を過剰発現して作製した人工細胞は、造腫瘍能の亢進を示すこと、転移能の亢進およびES細胞様の遺伝子発現様式、および抗がん剤や放射線への抵

抗性を確認し、人工がん幹細胞モデルはがん幹細胞としての特徴を有することが確認された。NSはがん幹細胞機能維持分子群の一つであり、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) の予後不良形質にがん幹細胞の関与が考えられることから、臨床検体のNS/GNL3Lの発現様式が治療効果判定や予後予測因子として有用である可能性が考えられる。

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。TNBは、*BRCA1* の不活化が関与している basal-like 乳がん、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。

TNBの中には術前全身化学療法に対して抵抗性であるだけでなく治療中に腫瘍が逆に増大する病状進行 (PD) 例が5%程度の頻度で存在する。このような例に共通してみられる分子変化と、対照の化学療法に反応性を示す例の分子変化を比較することで、化学療法に抵抗性に関わる分子を明らかにできる可能性がある。

昨年度までの研究成果として、トリプルネガティブ (TN) 乳がんは、他のがん種の細胞株に比較してmTOR阻害剤であるeverolimusの感受性が高く、特にEGFR、CK5/6の蛋白質発現を有する、Basal-like subtypeに属する株に対して強い感受性を発揮することを証明した。本年度は、TN乳がんにおけるeverolimusの効果を、①マウス移植モデルで検証する、②Basal-likeサブタイプが感受性を示す機序として、EGFR、PTENの役割を検討する、③薬剤暴露によるmTORの上流分子であるAKT、および細胞の生存にかかわるMAPKの変化を検討し、感受性との関連解析を行う。

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に対する前向き (プロスペクティブ)、又は、後ろ向き (レトロスペクティブ) 臨床試験より得られた腫瘍検体 (乳がん組織検体) を用いた解析を行う。

## B. 研究方法

トリプルネガティブ乳がん (TNB) は、遺伝子学的にも、病理学的にもヘテロな集合体であることが予想される。今後のTNBに対する創薬と治療の最適化を考えた場合、創薬に直結する機能的な分類と、それぞれの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不可欠である。研究方法は大きく以下の3つに分類される。

- 1) TNB細胞株を用いた、未承認新規薬剤の感受性試験と効果を規定する遺伝子・タンパクの同定
- 2) TNB患者から得られた腫瘍検体を用いた、大規模な後ろ向き (レトロスペクティブ) 解析。
- 3) TNB患者を対象とした前向き (プロスペクティブ) 臨床試験で得られる腫瘍組織、末梢血液検体を用いた解析

### 1) hTERT、NS、BRG1の細胞内局在と薬剤感受性

hTERT、NS、BRG1の細胞内局在については蛍光免疫染色したものを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。恒常的に細胞内でshRNAを発現させるために、hTERT、NS、BRG1に対するshRNAはレトロウイルスを用いて感染させ発現させた。乳がんおよびTNBCの各種抗がん剤に対する感受性を3D培養系であるCD-DST法の変法、生存性の変化をニュートラルレッドの取り込みによる吸光度の変化によって測定した。

### 2) 乳がん組織、細胞を用いたメチル化解析

乳腺上皮細胞、乳がん細胞株、及び、乳がん患者のAFPE検体42例を用いた。*BRCA1/2*及び*PTEN*遺伝子、*CLDN1*及び*CLDN2*遺伝子を解析した。乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株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、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。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real-time PCRにより増幅させた。

### 3) 乳がん組織アレイを用いた解析

1998年～2012年3月までの間に国立がん研究センタ

一中央病院にて術前化学療法に対しPDとなり外科切除が行われた20名のTNB検体を用いた。また、1990年1月から2000年3月までに国立がん研究センター中央病院において手術を実施された原発性乳がんの中から、TNB検体を対照として抽出した。PD群20例と対照群101例を選択し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックを用いて、2mm径のコアを腫瘍あたり2個ずつ打ち抜き、TMAブロックを作製した。

#### 4) TNBCにおけるmTOR阻害剤の感受性を規定する分子の同定

高感受性株であるMDA-MB-468株、および非感受性株であるMDA-MB-231株をマウスに移植し、腫瘍生着確認後、everolimusを10 mg/kg/dayの量で、週3回、3週間経口摂取させ抗腫瘍効果を検討した。EGFRの影響は、非感受性株であるMDA-MB-231株、およびMDA-MB-436株に、pVSV-G vectorを用いてwild type EGFRを強制発現させ、またPTENの影響は、PTEN発現を認める、BT-20、およびMDA-MB-231株に、siRNAを用いてPTEN発現をノックダウンし、それぞれの株で、everolimusの感受性を親株と比較した。感受性株であるMDA-MB-468株、BT549株、非感受性株であるMDA-MB-231株、MDA-MB-157株を用いて、everolimusを0.5、5、50 nMの濃度で1hr暴露させ、細胞回収後western blottingでAKT、Erkの蛋白発現量とリン酸化を検討した。

#### 5) TNBの患者の予後を規定する分子異常の同定

2002年—2008年に、国立がん研究センター中央病院にてトリプルネガティブ乳がん (TNB) と診断され、根治的な手術を施行された患者の内、術後の病理診断にて、少なくとも一つ以上の腋窩リンパ節転移を有する75例を対象とした。PTEN, HER1, HER3, HER4 (細胞膜), HER4 (細胞質), IGF1R, pAKT, pERK, CK5/6, Basal, ALDH1の11種類のタンパク発現量を、特異的な抗体による免疫組織染色により測定した。PI3CA変異、および、AKT1変異を、それぞれ、ARMS/Scorpion法、Taq Gold polymerase assayを用いて検出した。各々のタンパク発現量や遺伝子変異割合と、無イベント生存期間

(Event Free Survival: EFS)、全生存期間 (Over All Survival: OS) との相関を解析した。EFS, OS曲線は

Kaplan-Meier法を用いて描き、log-rank法で検定した。多因子解析は両側t検定を用いて、SPSS, ver. 19ソフトウェアを用いて解析した。

#### 6) TNBを対象としたプロスペクティブ臨床試験

原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織 (180症例) よりmRNAを抽出し、Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0を用いたマイクロアレイ解析を施行した。ホルモン感受性、HER2発現量の有無によるサブセットによるクラスター解析を行った。又、トレーニングデータ120例に対し、8700 probeを用い、Wilcoxonのp値で順位付けを行う。その後、上位のprobe を使いテストデータ60例で判別の精度を評価した。評価法はSVM (線形判別式) を用い、判別式に使う遺伝子の個数は5-fold CVで決定した。原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織 (65症例) を対象に、新規がん幹細胞マーカーであるNSのRNAの発現をreal time RT-PCR法を用いて測定し、pCRとの相関を検討した。HER2過剰発現のない乳がんを対象に、標準的治療レジメンにCarboplatinの上乗せ効果を検証する比較試験 (200例) の登録を終了した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター中央病院、若しくは、多施設共同研究に関しては、四国がんセンター、大阪医療センター、東京都立駒込病院、愛知がんセンター、神奈川県立がんセンターの各々の倫理委員会の承認を得て実施する。また測定施設・解析施設にあっても、施設内の倫理委員会の承認を得た後、測定を実施する。研究代表者らの研究グループは、既に乳がん患者を対象としたファルマコゲノミクス研究を経験しており、検体の匿名化や管理法などの具体的方法は熟知している。臨床検体の処理・管理は国立がん研究センター中央病院支援施設内で行う。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) hTERT、NS、BRG1の細胞内局在と薬剤感受性

HeLa細胞のM期におけるGFP-hTERT、NS、BRG1の局在を確認したところ、いずれも紡錘糸上で共局在していた。また、新規抗hTERTモノクローナル抗体でもHeLa細胞でM期に紡錘糸が染色された。乳がん組織を新規抗hTERTモノクローナル抗体で染色したところ、HeLa細胞と同様に、M期に紡錘糸様の構造体が染色されることを確認した。

hTERT、NS、BRG1をノックダウンしたHeLa細胞では、コントロール細胞に比較してM期細胞数が有意に増加していた。NS、GNL3Lを強制発現させたHeLa細胞とさせていないHeLa細胞を3次元培養であるCD-DST法の変法により培養し、5-FUに対する抵抗性を比較したところ、NS、GNL3Lを強制発現させたHeLa細胞で5-FUに対する抵抗性が見られた。

対照区として乳がん由来の細胞株MCF7を用い、試験区として、エベロリムス高感受性を示すMDA-MB-468細胞とエベロリムス低感受性を示すMDA-MB-231細胞を用い、それぞれにNSおよびGNL3Lを強制発現させた細胞株を用いて、基礎データを集積することにより未承認新規薬剤に対するがん幹細胞への感受性を評価した。

アドリアシンに対しては、MCF7細胞では、ネガティブコントロールとして発現ベクターのカセットのみを導入した細胞株に比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた(図1a)。一方、エベロリムス低感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-231細胞では、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤の抵抗性に差はみられなかった(図1b)。また、エベロリムス高感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-468細胞においてもNSおよびGNL3Lを導入しても薬剤の抵抗性に差はみられなかったが、アドリアシンに対する感受性が低く、生存性の低下が観察できなかった(図1c)。

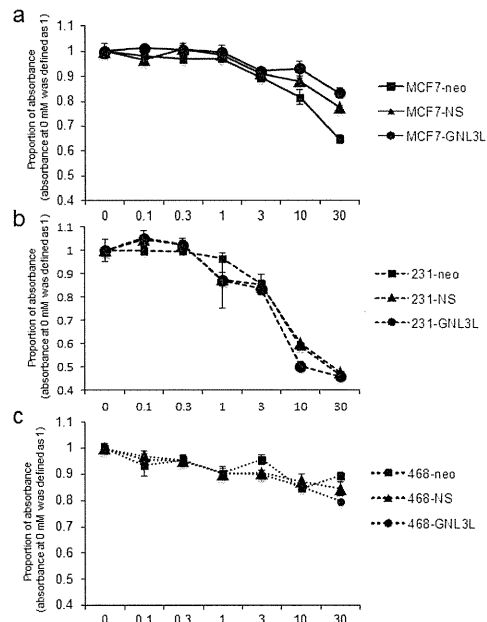


図1 アドリアシンに対する感受性

シクロホスファミドは、MCF7細胞では、ネガティブコントロールに比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた(図2a)。一方、エベロリムス低感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-231細胞では、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤の抵抗性に差はみられなかった。加えて、他の細胞株と比べ、MDA-MB-231細胞の3株はシクロホスファミドに対する感受性が高く、低濃度曝露条件で生存性が低下した(図2b)。エベロリムス高感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-468細胞ではシクロホスファミドに対する感受性が低く、生存性の低下があまり観察できなかったが、NSおよびGNL3Lを導入することにより若干の薬剤抵抗性を示した(図2c)。

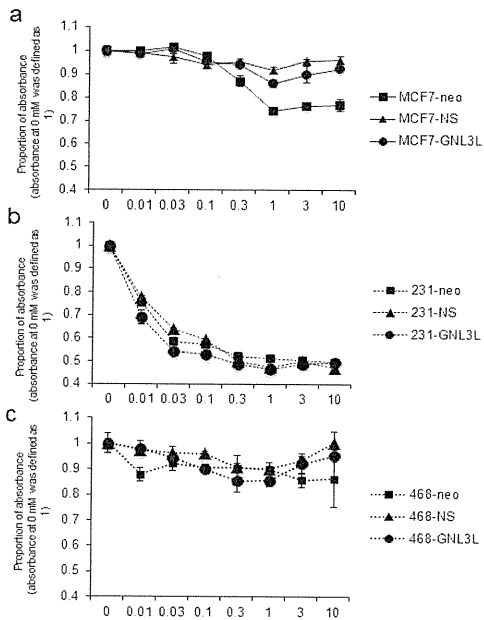


図2 シクロホスファミドに対する感受性

次に、乳がん細胞における乳がん第1選択薬の一つであるパクリタキセルの単独暴露条件での感受性評価を行った。MCF7細胞の3細胞株では、ネガティブコントロールとNSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性に差はなく、がん幹細胞形質を付与してもパクリタキセルに対する抵抗性は変わらなかった (図3)。

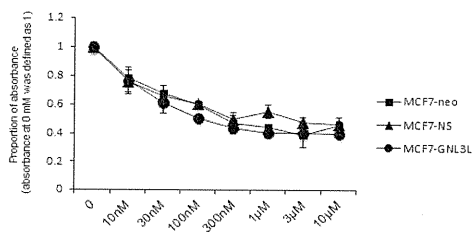


図3 パクリタキセルに対する感受性

乳がんおよびTNBC細胞におけるチロシンキナーゼ阻害剤 (sorafenib) の感受性評価を行った。MCF7細胞およびエベロリムス高感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-468細胞では、ネガティブコントロールに比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた (図4a, c)。一方、エベロリムス低感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-231細胞では、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤抵抗性に差はみられなかった (図4b)。

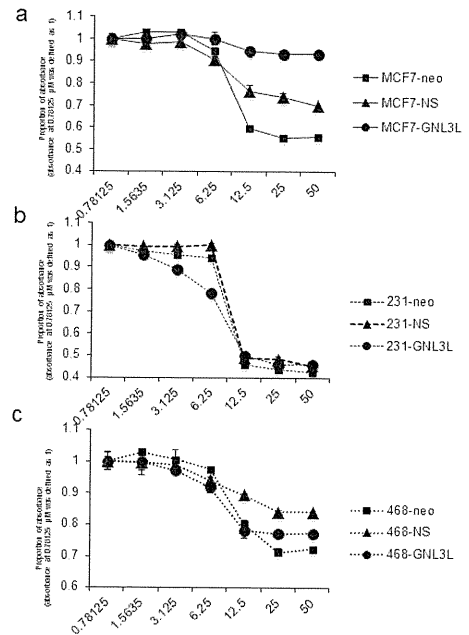


図4 ソラフェニブに対する感受性

## 2) 乳がん組織、細胞を用いたメチル化解析

TNB細胞株10系統を含む乳がん細胞株18系統におけるBRCA1/2、及びPTEN遺伝子のDNAメチル化レベルをqMSP法にて測定した (図2)。しかし、用いた乳がん細胞株ではいずれの遺伝子とも高メチル化を示さなかった。

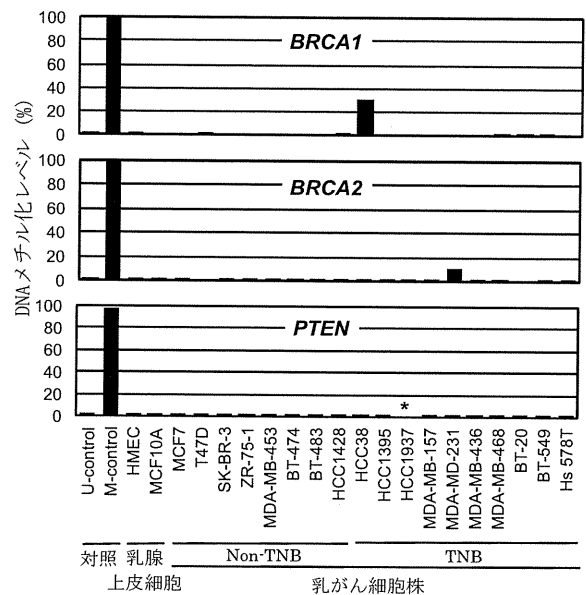


図2 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株におけるDNAメチル化レベル

\* コピー数が増幅せず、相同欠失が示唆される

今回、claudinファミリーの遺伝子のうち、プロモーター領域にCpGアイランドが存在するCLDN1及び



CLDN3 遺伝子について、乳がん細胞株におけるメチル化レベルを測定した(図3)。BRCA1/2、PTEN 遺伝子とは異なり、CLDN1、CLDN3 遺伝子では、それぞれ高メチル化を示す細胞株が数系統存在した。

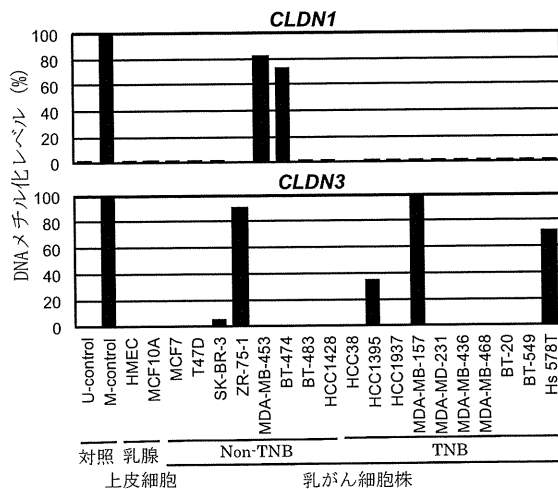


図3 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株におけるDNAメチル化レベル

42例の乳がん検体を用いて、BRCA1 遺伝子のメチル化レベルを測定した(図4)。その結果、高メチル化を示した乳がん検体は2例存在し、いずれもTNBであった(2/12, 17%)。BRCA2及びPTEN 遺伝子についてもメチル化レベルを測定したが、いずれの遺伝子とも、メチル化レベル上昇を示す検体は一例も存在しなかった(data not shown)。

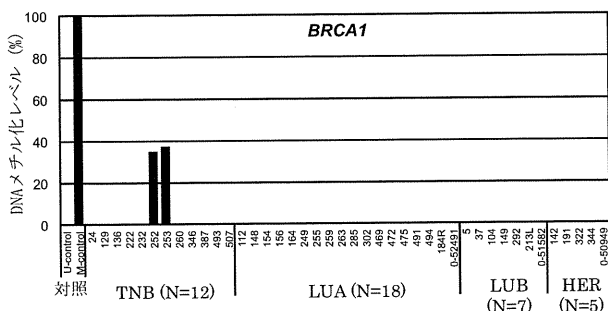


図4 乳がん検体におけるBRCA1遺伝子のDNAメチル化レベル

### 3) 乳がん組織アレイを用いた解析

術前化学療法にてPDであった20例と、術前化学療法がおこなわれず外科摘出された101例のTN乳がん組織からTMAブロックを作製した。臨床病理学的事項についての情報を集めるとともに凍結検体やメタノール固定組織ブロックなど、他の試料の有無についてもリストを作成した。組織学的観察ではPDとなったTN乳がんには形態学的に一定の傾向がみられ、基質産生癌、骨・

軟骨化生を伴う癌を含む化生癌と、広範な壊死を伴う充実腺管癌が大多数を占めた。

### 4) TNBCにおけるmTOR阻害剤の感受性を規定する分子の同定

MDA-MB-231細胞とMDA-MB-468細胞をマウスの背部に移植し、推定腫瘍体積が、120 mm<sup>3</sup>に到達した時点で治療を開始した。感受性株であるMDA-MB-468移植腫瘍は、everolimusの投与により有意に腫瘍増殖が抑制されたが、MDA-MB-231移植腫瘍は、有意な増殖抑制を示さなかった(図5)。vitroでの感受性の差は、マウス移植モデルにおいても再現された。

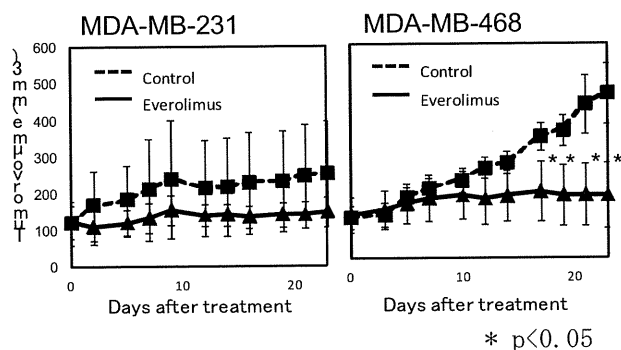


図5. マウス移植モデルにおけるeverolimusの抗腫瘍効果

PTEN蛋白の欠失、または機能低下はAKT-mTOR経路の活性化を引き起こし、everolimusに感受性となる事が報告されている。検討した9つのTN乳がん細胞株は5つの株で、PTEN蛋白の欠失が確認されているが、明らかな感受性との相関は認められなかった。今回、PTENを標的としたsiRNAを用いてPTENをノックダウン後に、everolimusの感受性が変化するか検討した。Wild typeのPTEN蛋白の発現が認められるBT20およびMDA-MB-231を用いて、検討を行った。PTENのノックダウン効果は、80%以上の抑制効率が、薬剤暴露の72時間持続することを確認した。両細胞ともPTENのノックダウンによるeverolimusの感受性変化は認められなかった(図6A, MDA-MB-231)。昨年度までの検討で、TN乳がんの中でEGFRの発現が高いBasal-typeにおいて感受性が高い事が明らかとなっている。EGFRの発現が直接感受性に関わっているか検討するため、非感受性株で、EGFR発現レベルの低いMDA-MB-231とMDA-MB-436細胞株にwild typ

e EGFRを強制発現させ、感受性の変化を検討した。両細胞ともEGFRの強制発現により、everolimusの感受性に変化は認められなかった(図6B, MDA-MB-231)。以上の結果から、TN乳がん株において、PTEN、EGFR蛋白は、everolimusの感受性に直接かかわらないことが示された。

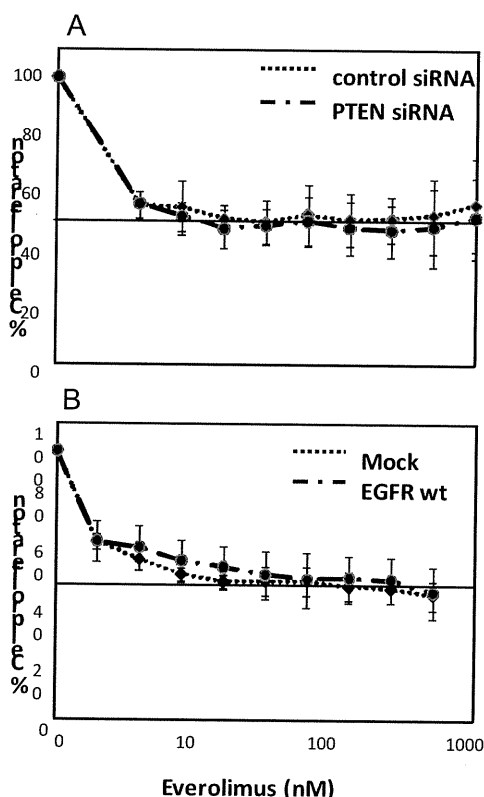


図6. PTEN、EGFRのeverolimusの感受性に与える影響

これまでの検討では、mTORおよび、その下流分子であるpS6、4EBP1の抑制の程度は、感受性株と非感受性株において差が認められなかった。そこで、今回我々は、mTORの上流に位置するAKT、および生存シグナルであるMAPKの変化を、everolimus暴露後に検討した。感受性株は、MDA-MB-468、BT549を、非感受性株としてMDA-MB-231、MDA-MB-157を用いた。pErkは、感受性株、非感受性株ともに、everolimus暴露後に変化は認められなかった。AKTは、感受性株においては、薬剤暴露後にリン酸化は変化しなかったが、非感受性株において、薬剤暴露後にAKTのリン酸化が上昇する傾向が認められた(図7. A. MDA-MB-468, B. MDA-MB-157)。以上の結果は、感受性株、非感受性株ともに、everolimusの標的であるmTORの抑制の程度に差はないものの、AKTに関連する生存シグナルが、非感受性株において薬剤

暴露後に活性化し、体制を示す可能性が考えられた。

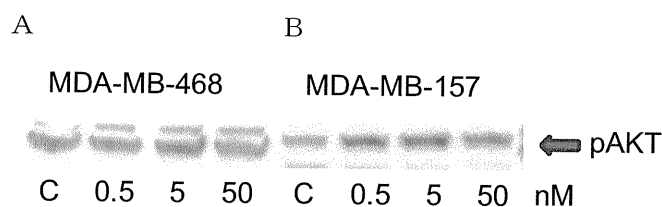


図7. everolimus暴露後のpAktの変化

### 5) TNBの患者の予後を規定する分子異常の同定

表1 患者背景

	すべて女性	n = 75
年齢	中央値	56 (28-82)
組織型	浸潤性乳管癌	62
	浸潤性小葉癌	3
	アポクリン癌	8
	その他	2
T因子	T1	22
	T2	37
	T3	15
	T4	1
腋窩リンパ節 転移数	1 個	45
	1-3個	30
	≥4個	49
術式	全摘術	26
	部分切除術	45
組織学的グレード	Grade 1-2	17
	Grade 3	58

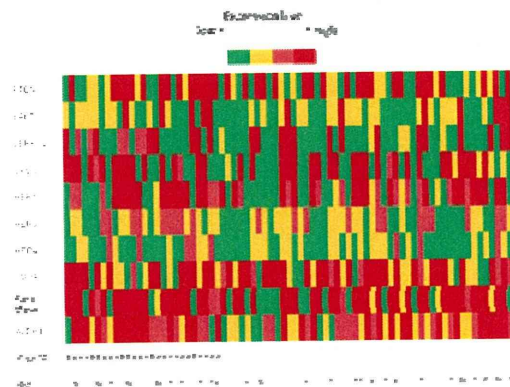
図8 たんぱく質発現及び遺伝子変異

Markers		number	%
<i>PIK3CA</i> 変異		26	35
	H1047R	15	
	E545K	11	
	none	49	
<i>Akt1</i> 変異	E17K	0	0
	none	45	
	not applicable	30	
PTEN	loss	40	53
	expression	35	
HER1	over-expression	44	59
	low/null	31	
HER3	expression	47	63
	low/null	28	
HER4 (細胞膜)	expression	31	41
	low/null	44	
HER4 (細胞質)	expression	46	61
	low/null	29	
IGF1R	over-expression	45	60
	low/null	30	
pAKT	expression	40	53
	null	35	
pERK	expression	29	39
	null	46	
CK5/6	expression	39	52
	low/null	36	
Subtypes	Basal	53	71
	Non-basal	22	
ALDH1	expression	49	65
	low/null	26	

図9 pAKT及びpERK1/2に相関する因子

		<i>p</i> -value
pAKT	<i>PIK3CA</i> mutation	0.63
	HER1	0.64
	HER3	0.23
	HER4 (membrane)	0.004
	HER4 (cytoplasmic)	0.001
	IGF1R	0.17
pERK1/2	PTEN	0.64
	ALDH1	0.23
	pERK	0.62
	<i>PIK3CA</i> mutation	0.10
	HER1	0.21
	HER3	0.64
	HER4 (membrane)	0.09
	HER4 (cytoplasmic)	0.35
	IGF1R	0.28
	PTEN	0.17
	ALDH1	0.25
	Basal subtype	1.00
	Basal subtype	0.44

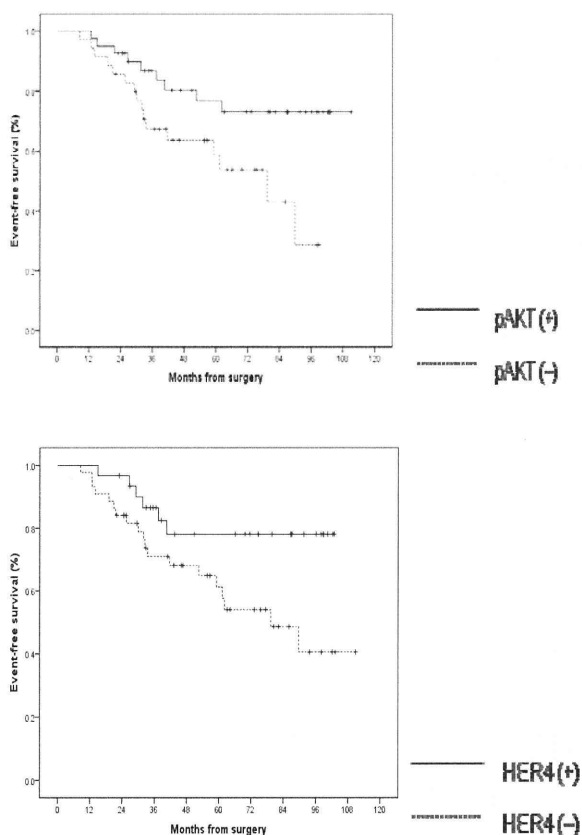
がん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無の結果をマップにしたものを示す。



対象症例のTNB組織を用いたがん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無と、リン酸化AKT (pAKT) 及びリン酸化ERK1/2 (ERK1/2) との相関について検討した結果を図9に示す。

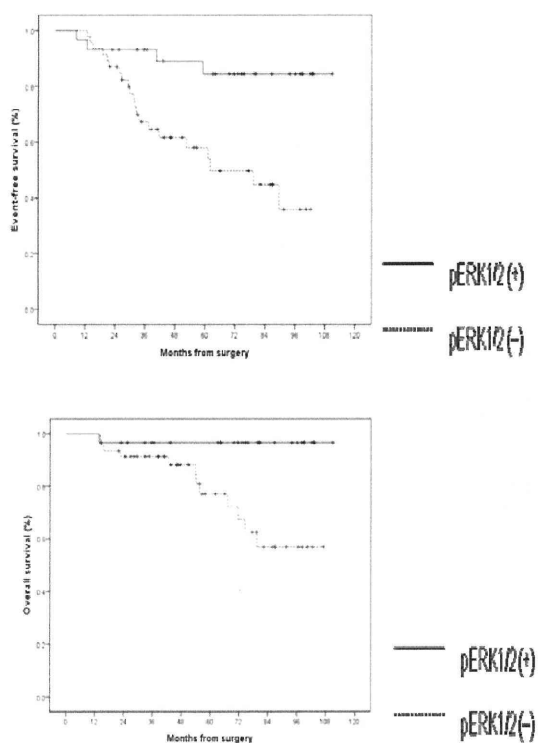
pAKT及びHER4の発現量の有無別のEFSを図10に示す。

図10



pERK1/2の発現量の有無別のEFSとOSを図11に示す。

図11

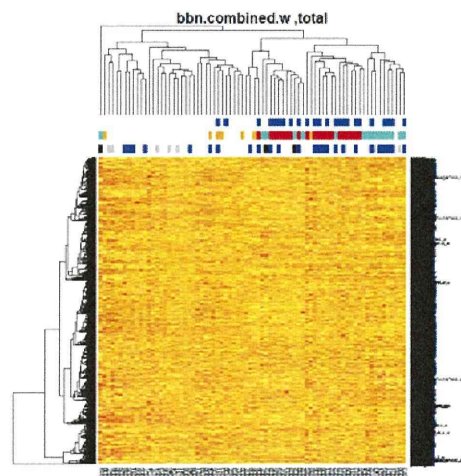


## 6) TNB を対象としたプロスペクティブ臨床試験

トレーニングデータ120例、テストデータ60例の計180例の術前化学療法症例を用いた。腫瘍検体にクラスタリングでは、比較的きれいにsubtype (enrich, HER2/Luminal B, Luminal A, TNB)に分かれることが確認できた (図12)。

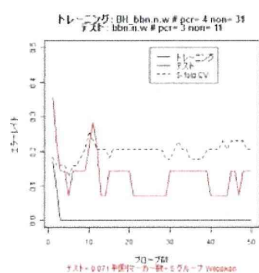
HER2陰性乳がんを対象とした判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、subtype (Luminal A に対しTNBであること)に加え、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された (テストエラー7%:図13)。Gene Ontology解析、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) のデータベース解析を行った。このことにより、HER2陰性乳がんに関しては、関連する遺伝子のパスウェイマップを作成することが可能であった (図14)。クラスタリング解析の精度を検証するため、トレーニングデータ (N=120) とテストデータ (N=60) を比較した。HER2陰性乳がんに関しては、トレーニングデータの発現パターンは、テストデータにて極めて忠実に再現された。

図12 腫瘍検体を用いたクラスタリング



pcr: 青, non-pcr: 白 enrich: 赤, her2LB: 橙, LA: 白, TN: 水色 cr: 青, pr: 白, sd: 灰, pd: 黒

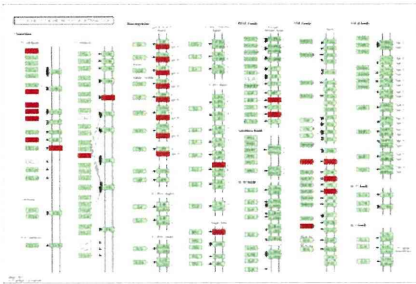
図13 HER2陰性乳がんを対象とした判別解析



判別に用いるマーカー

1. Subtype (TN=1, LA=0) 2. STAT 3. PML 4. WARS  
5. CHKA

図14パスウェイマップ (KEGGを用いた解析)



術前化学療法の前向き臨床試験より得られた乳がん組織45例を用いた。9例のpCRを得た。臨床背景との解析では、ホルモン陰性乳がんにおいて、陽性乳がんと比較してpCRが得られやすい結果となった。NSのmRNA発現量が低いこととpCRとは相関があった(図15)。多変量解析の結果、NSのmRNA発現量が低いことは、ホルモン受容体の有無、HER2受容体の有無、組織学的グレード、病期、腫瘍径から独立するpCRを予測する分子マーカーであった(表2)。NSに対する特異抗体を用いてNSの乳がんでの発現量を免疫組織染色法により測定した。NSの免疫組織染色法によるタンパク発現量はHER2陰性乳がんが多く見られ、特に、TNBCにおいてはそれが顕著であった。又、同一サンプルにおける、NSのmRNA発現量とタンパク発現量はよく相関した。

図15 NSのmRNA発現量とpCRの相関

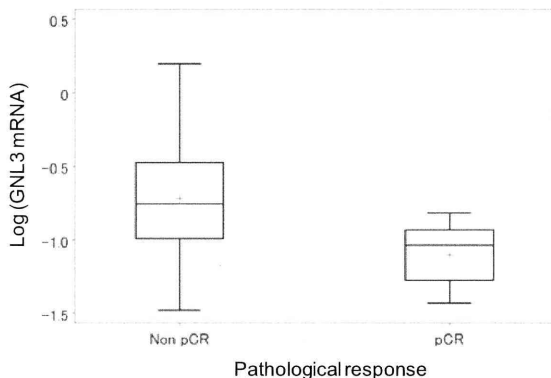


表2 pCRと相関する因子 (多変量解析)

Variables	OR	95%CI	P
Log(GNL3)	1 unit gain	0.040.000.98	0.049
HR	negative	1	
	positive	0.120.012.48	0.171
HER2	negative	1	
	positive	0.380.053.10	0.366
Histological grade	1 or 2	1	
	3	1.730.0744.180.742	
Stage	I/IIA/IIB/IIIA1	1	
	IIIB/IIIC/IV	2.170.1432.840.576	
Tumor size	<5	1	
	>5	0.190.012.74	0.220

HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験(医師主導治験)の登録を終了した。登録190例の内、バイオマーカー研究解析可能症例は約100例である。

#### D. 考察

がん幹細胞機能維持分子群であるhTERT、NS、BRG1は、M期に紡錘糸に局在し、M期の正常な進行に寄与していることを示唆した。また、NS・TWISTの発現量の上昇は食道癌術前化学療法後の再発と相関することから、NS・TWISTの発現量の上昇が臨床検体におけるがん幹細胞形質と相関することを示唆することができた。TNBCの予後不良形質はがん幹細胞形質と関連する可能性も考えられ、TNBCにおいてもNS・TWISTの発現量の上昇が予後不良形質と相関する可能性がある。NSはがん幹細胞機能維持分子群の一つであることから、TNBCにおいてもがん幹細胞機能維持分子群がM期の進行に寄与することが予後不良形質に関連している可能性が考えられる。したがって、M期をターゲットとした薬剤が、TNBC選択的な効果をもつ可能性がある。また、NS/GNL3Lを過剰発現させたTNBCの人工がん幹細胞モデルを用いた、抗がん剤感受性のアッセイ結果は、NS/GNL3L発現細胞でより薬剤耐性の傾向が高まり、アッセイ系としての

妥当性を確認することができた。

*BRCA1* 遺伝子では、解析した TNB 検体 12 例中 2 例 (17%) と高率にメチル化を認めた。TNB では *BRCA1* 遺伝子のメチル化が高頻度であることは既に幾つか報告されており、本実験でも同様の結果であることが示唆された。しかし、先行論文ではいずれも、TNB における *BRCA1* 遺伝子のメチル化の頻度が 32-78% と、本実験結果よりもかなり高値であった。その理由は、これらの解析手法が定性的 MSP 法であることが大きい。定性的 MSP 法は PCR での増幅断片の有無で判定するが、サイクル数を増加させることにより、ごく僅かに存在するメチル化 DNA も容易に増幅させることが可能となる。従って、偽陽性を検出する可能性が高いと考えられる。一方、本研究で行なっている qMSP 法は定量性に富むため、解析サンプル中のメチル化 DNA の割合を高精度に測定でき、腫瘍の性質を反映したメチル化異常を判定することが可能である。

TNB は単一の種類のがん種からなるのではなく、数種類の生物学的特性が異なった乳がんが含まれていることが示唆されている。組織形態学的に、TN 乳がんは通常非定型髄様癌、中心部に広範な無細胞領域を有する癌、アポクリン癌などの割合が高く、化生癌の比率は 5~10% 程度にとどまるが、PD 例での比率は非常に高くなっている。分子レベルでも他施設の研究で TN 乳がんが 5 型ほどに亜分類可能というデータがあるが、この中のある特定の亜型が化学療法に抵抗性を獲得しやすいあるいは元来抵抗性である可能性があり、化生癌と広範な壊死を示す充実腺管癌に特徴的な分子変化を見出せる可能性がある。

トリプルネガティブ乳がんに対しては現在のところ有効な治療がなく、予後不良のサブタイプであることが知られている。これまでに我々は、TN 乳がん細胞株は、他のがん種と比較して、everolimus に高い感受性を示し、特に basal-like サブタイプにおいてその効果が顕著であることを報告した。本年度は、その効果を腫瘍移植モデルで検証し、また投与後の AKT 分子の反応性により感受性が変化する可能性を見出した。

HER4 の発現量、及び、AKT のリン酸化 (pAKT) ERK のリン酸化 (pERK) は、日本人のトリプルネガティブ乳がん (TNB) において、強い予後良好因子であることが明らかとなった。PI3CA 変異は 35% と高頻度であるのに比較して、AKT1 変異を 1 例もみとめなかった。このことは、

西洋人種とアジア人種とでは、主となる遺伝子異常が異なる可能性が示唆された。

プロスペクティブ研究により、NS の mRNA・タンパク発現量が、TNB の pCR と強い相関があることがわかった。又、マイクロアレイ解析においても、HER2 陰性乳がんの pCR を予測する遺伝子として、STAT, PML, WARS, CHKA などが同定された。又、HER2 過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法における Carboplatin/Weekly Paclitaxel→CEF と Weekly Paclitaxel→CEF のランダム化第 II 相試験 (医師主導治験) の登録が計画通り終了した。

## E. 結論

臨床検体を用いて NS・TWIST の発現量の上昇が臨床検体におけるがん幹細胞形質と相関することを示唆した。TNBC の予後不良形質も NS・TWIST の発現量と相関する可能性がある。NS はがん幹細胞機能維持分子群のひとつであり、がん幹細胞機能維持分子群は M 期の正常な進行に寄与していることから、TNBC の予後不良形質にもがん幹細胞機能維持分子群が M 期に重要な機能を果たしている可能性がある。NS/GNL3L を過剰発現させた人工がん幹細胞モデルを用いた、抗がん剤感受性のアッセイ系を確立したので、今後は、このアッセイ系等により M 期をターゲットとした薬剤を中心にスクリーニングを行う。

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。これらの everolimus に感受性を示すサブタイプは、薬剤暴露後に AKT のリン酸化反応が認められず、この差が、感受性に関わっている可能性が示唆された。

日本人の TNB で同一の治療法を受けた均質な集団における遺伝子解析の報告は少なく、今後の TNB の治療戦略の上で重要な基礎データとなる。PI3CA 変異は、PI3K 阻害剤、AKT 阻害剤の薬剤感受性の予測マーカーとして既に報告されており、今回の結果は、これら分子標的薬剤の日本での開発において、貴重なデータとなる。HER2 過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法における Carboplatin/Weekly Paclitaxel→CEF と Weekly Paclitaxel→CEF のランダム化第 II 相試験のサブセット解析、TR 解析により、TNB の抗腫瘍効果を規定するタ

ンパク質、又は、白金製剤の有用性を予測するバイオマーカーを同定できる可能性がある。本研究班、最終年度中に解析を終了予定である。又、TNBを対象としたPARP阻害剤を用いた前向き研究（未承認薬PARP阻害剤：Olaparib（アストラゼネカ社）とエリブリン（エーザイ：2011年月上旬、乳がん領域にて承認予定）の併用試験：医師主導治験）を計画している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]
2. Iwata H, Sato N, Masuda N, Nakamura S, Yamamoto N, Kuroi K, Kurozumi M, Tsuda H, Akiyama F, Ohashi Y, Toi M. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/ cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. Jpn J Clin Oncol. 2011; 41(7): 867-75.
3. 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. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2012; 132(3): 793-805.
4. Yunokawa M, Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Efficacy of everolims, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple negative breast cancer cells. Cancer Science, IN Press.

### 2. 学会発表

## 国際学会

1. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pathological complete response to standard neoadjuvant fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide and paclitaxel with or without trastuzumab in early breast cancer. Poster session #5176, 16<sup>th</sup> The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm 23 - 27 September 2011

## 国内学会

1. 大岡静衣、岡本奈緒子、木下圭太、安川麻実、増富健吉 4T9pI-8 Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase. 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日～16日 神奈川（口頭発表、ポスター発表）
2. 大岡静衣 がん幹細胞機能維持に関わる分子群のイメージング解析 第4回 NanoBio若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2011年6月3日～4日 札幌（口頭発表）
3. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yunokawa M, Yonemori K, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Long-term prognostic factors of node-negative invasive breast cancer of luminal subtype: A comparison between histological grades and molecular markers including Ki67 and HER2 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011.7.21～23、横浜
4. 小野麻紀子、津田均、竹下文隆、高橋陵宇、田村研治、明石-田中定子、木下貴之、藤原康弘、落谷孝弘. Expression of ribophorin II (RPN2) in human breast cancer (乳がんにおけるRPN2の発現の検討). 第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3～5、名古屋
5. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early br

- east cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.
6. Yunokawa M, Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Efficacy of everolims, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple negative breast cancer cells. 第9回日本臨床腫瘍学会, WS-1-8, Yokohama 21-23 July 2011.
  7. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early breast cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.
  8. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early breast cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

抗がん剤に対する感受性診断法（平成23年10月18日）国立がん研究センター整理番号：2011-9, 大阪大学との共同出願

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## II. 研究分担報告書

### 研究要旨

TNBに対する前向き臨床試験（プロスペクティブ試験）より得られた乳がん組織、及び、末梢血液検体を用い、抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの同定を試みた。

原発性乳がん180症例を対象とし、術前化学療法の前向き試験を施行した。術前針生検で得られた乳がん組織よりRNAを抽出し、Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0を用いた30000 probeマイクロアレイ解析を施行した。判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された。術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（65症例）を対象に、新規がん幹細胞マーカーであるNSのRNAの発現をreal time RT-PCR法を用いて測定し、pCRとの相関を検討した。NSのmRNA発現量が低いこととpCRとには、相関があり、多変量解析の結果でも臨床因子と独立した予測マーカーであった。HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験（医師主導治験）の登録を終了し、免疫組織染色法を中心にバイオマーカー研究を開始した。

### 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に対する前向き臨床試験（プロスペクティブ試験）より得られた腫瘍検体（乳がん組織検体）、末梢血液検体を用いた、解析を行う。

### B. 研究方法

1) TNBの術前化学療法のpCRを予測する遺伝子群の探索（RNAを用いた30000 probeマイクロアレイ解析）

原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（180症例）よりmRNAを抽出し、Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0を用いたマイクロアレイ解析を施行した。ホルモン感受性、HER2発現量の有無によるサブセットによるクラスター解析を行った。又、トレーニングデータ120例に対し、8700 probeを用い、Wilcoxonのp値で順位付

けを行う。その後、上位のprobe を使いテストデータ60例で判別の精度を評価した。評価法はSVM（線形判別式）を用い、判別式に使う遺伝子の個数は5-fold CVで決定した。

2) 乳がん組織検体でのNS発現量の測定（RT-PCR，免疫組織染色）

原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（65症例）を対象に、新規がん幹細胞マーカーであるNSのRNAの発現をreal time RT-PCR法を用いて測定し、pCRとの相関を検討した。

3) HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEF Weekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験（医師主導治験）

HER2過剰発現のない乳がんを対象に、標準的治療

レジメンにCarboplatinの上乗せ効果を検証する比較試験（200例）の登録を終了した。付随研究の中で、乳がん検体の、BRCA1, PARP1, CHECK1, GNL3L, STAT3の発現量とPI3K変異を測定する。現在、登録施設より未染の切片を回収するとともに、各タンパク質の免疫組織染色に関してプロトコルを作成している。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター中央病院、若しくは、多施設共同研究に関しては、四国がんセンター、大阪医療センター、東京都立駒込病院、愛知がんセンター、神奈川県立がんセンターの各々の倫理委員会の承認を得て実施する。また測定施設・解析施設にあっても、施設内の倫理委員会の承認を得た後、測定を実施する。研究代表者らの研究グループは、既に乳がん患者を対象としたファルマコゲノミクス研究を経験しており、検体の匿名化や管理法などの具体的方法は熟知している。臨床検体の処理・管理は国立がん研究センター中央病院支援施設内で行う。

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

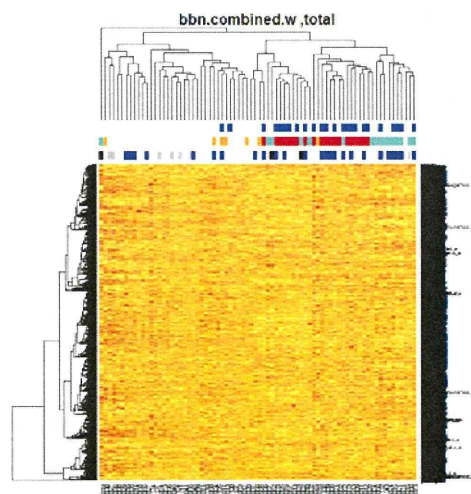
#### 1) TNBの術前化学療法のpCRを予測する遺伝子群の探索（マイクロアレイ解析）

トレーニングデータ120例、テストデータ60例の計180例の術前化学療法の症例を用いた。腫瘍検体にクラスタリングでは、比較的きれいにsubtype (enrich, HER2/Luminal B, Luminal A, TNB)に分かれることが確認できた（図1）。

HER2陰性乳がんを対象とした判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、subtype (Luminal A に対しTNBであること)に加え、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された（テストエラー7%:図2）。Gene Ontology解析、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)のデータベース解析を行った。このことにより、HER2陰性乳がんに関しては、関連する遺

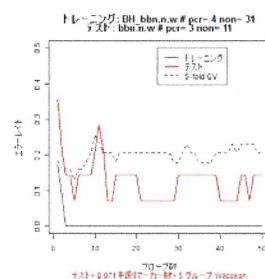
伝子のパスウェイマップを作成することが可能であった（図3）。クラスタリング解析の精度を検証するため、トレーニングデータ（N=120）とテストデータ（N=60）を比較した。HER2陰性乳がんに関しては、トレーニングデータの発現パターンは、テストデータにて極めて忠実に再現された（図4）。

図1 腫瘍検体を用いたクラスタリング



per: 青, non-per: 白 enrich: 赤, her2LB: 橙,  
LA: 白, TN: 水色 cr: 青, pr: 白, sd: 灰, pd: 黒

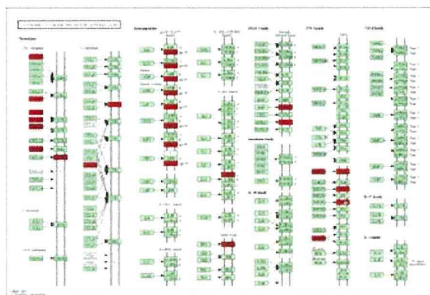
図2 HER2陰性乳がんを対象とした判別解析



判別に用いるマーカー

1. Subtype (TN=1, LA=0)
2. STAT
3. PML
4. WARS
5. CHKA

図3 パスウェイマップ（KEGGを用いた解析）



## 2) 乳がん組織検体でのNS発現量の測定

術前化学療法の前向き臨床試験より得られた乳がん組織45例を用いた。9例のpCRを得た。臨床背景との解析では、ホルモン陰性乳がんにおいて、陽性乳がんと比較してpCRが得られやすい結果となった。NSのmRNA発現量が低いこととpCRとは相関があった

(図4)。多変量解析の結果、NSのmRNA発現量が低いことは、ホルモン受容体の有無、HER2受容体の有無、組織学的グレード、病期、腫瘍径から独立するpCRを予測する分子マーカーであった(表1)。NSに対する特異抗体を用いてNSの乳がんでの発現量を免疫組織染色法により測定した。NSの免疫組織染色法によるタンパク発現量はHER2陰性乳がんが多く見られ、特に、TNBCにおいてはそれが顕著であった。又、同一サンプルにおける、NSのmRNA発現量とタンパク発現量とはよく相関した。

図4 NSのmRNA発現量とpCRの相関

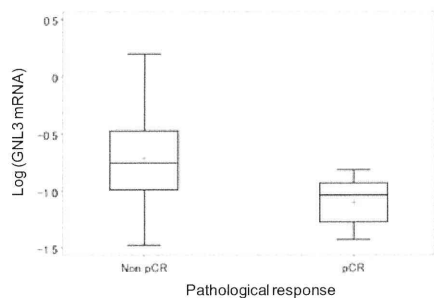


表1 pCRと相関する因子(多変量解析)

Variables	OR	95%CI	P
Log(GNL3) 1 unit gain	0.04	0.00 0.98	0.049
HR			
negative	1		
positive	0.12	0.01 2.48	0.171
HER2			
negative	1		
positive	0.38	0.05 3.10	0.366

Histological grade	1 or 2	1			
	3	1.73	0.07	44.18	0.742
Stage	I/IIA/IIB/IIIA	1			
	IIIB/IIIC/IV	2.17	0.14	32.84	0.576
Tumor size	<5	1			
	>5	0.19	0.01	2.74	0.220

## 3) TNBにおける白金製剤の有用性を検証と感受性を規定する分子マーカーの同定

HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験(医師主導治験)の登録を終了した。登録190例の内、バイオマーカー研究解析可能症例は約100例である。

## D. 考察

プロスペクティブ研究により、NSのmRNA・タンパク発現量が、TNBのpCRと強い相関があることがわかった。又、マイクロアレイ解析においても、HER2陰性乳がんのpCRを予測する遺伝子として、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された。又、HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験(医師主導治験)の登録が計画通り終了した。

## E. 結論

HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験のサブセット解析、TR解析により、TNBの抗腫瘍効果を規定するタンパク質、又は、白金製剤の有用性を予測するバイオマーカーを同定できる可能性がある。本研究班、最終年度(24年度)中に解析を終了予定である。又、TNBを対象としたPARP阻害剤を用いた前向き研究(未承認薬PARP阻害剤:Olaparib(アストラゼネカ社)とエリブリン(エーザイ:2011年上旬、乳がん領域にて承認予定)の併用試験:医師主導治験)を計画している。