

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. 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, 16th The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm 23 – 27 September 2011

国内学会

1. 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.
2. 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
研究分担報告書

研究分担課題 癌幹細胞の側面からの基礎研究とトランスレーショナル研究

研究分担者 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

研究要旨 がん幹細胞機能維持に必須の分子基盤を解明し、これらの因子群が臨床検体でいかなる挙動を示し治療効果判定や予後予測因子として利用できるかを解析することでがん幹細胞を標的とした診断治療法の開発を目指す。本年度は、昨年度同定した、がん幹細胞機能維持分子群（テロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）、nucleostemin（NS）、BRG1）が、M期進行に寄与することを明らかにした。また、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）を選択的ターゲットとする薬剤のスクリーニングや、臨床検体のNSの発現様式が治療効果判定や予後予測因子として有用かどうかを解析するために必須である、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。

A. 研究目的

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。しかしながら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ていた。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ていた。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。人工がん幹細胞モデルは、がん幹細胞を標的とした治療薬のスクリーニングには必須のツールであることから、今年度は、TNBCを標的とした薬剤スクリーニングを行うための人工がん幹細胞を用いたスクリーニング系を確立する。また、がん幹細胞機能維持機構を解明し、がん幹細胞およびTNBCを選択的にターゲットとする薬剤の選抜に役立てる。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮) 特記事項なし。

C. 研究結果

がん幹細胞機能維持分子群 (hTERT、NS、BRG1) はM期に紡錘糸上で共局在し、M期の正常な進行に寄与している

がん幹細胞機能維持分子群の時空間的制御機構を明らかにするため、免疫染色法にて細胞の各細胞周期のステージにおけるhTERT、NS、BRG1の局在を観察した。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、我々が作製した新規抗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。hTERT、NS、BRG1の減少によりM期で停止する細胞が増加することから、hTERT、NS、BRG1はM期の正常な進行に寄与していることが示唆された。hTERT、NS、BRG1はM期を制御することが、がん幹細胞機能維持に重要と考えられる。

NS、GNL3L 強制発現細胞 3次元培養で、薬剤抵抗性アッセイ系を確立した

がん幹細胞機能維持分子群の一つであるNS/GNL3LとTWISTの発現量は、食道癌術前化学療法後の再発と相関していること、および、食道癌細胞株でもNS・TWISTの発現量が相関していることから、NS・TWISTの発現量の上昇はがん幹細胞形質と相関して

いる可能性を示唆した (Nakajima E.T., et al., Cancer Sci., 2011)。したがって、TNBCの予後不良形質についてもNS/GNL3Lが関与する可能性が考えられる。そこで、TNBCに対する抗悪性腫瘍薬スクリーニング系を確立するため、NS/GNL3Lを強制発現させた細胞株をがん幹細胞モデルとして用い、抗がん剤感受性のアッセイ系の確立を試みた。

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。したがって、この3次元培養系を用いて、以降の抗がん剤感受性のアッセイを行った。

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。

まず、乳がんおよびTNBC細胞における再発乳がん第1選択薬であるアドリアシン、乳がんの中心的抗がん剤であるシクロホスファミドそれぞれの単独暴露条件での感受性評価を行った。

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)。これらの結果から、今回の条件では、エベロリムスへの感受性に関わりなく、TNBC細胞株にがん幹細胞形質を付与してもアドリアシンに対する抵抗性は変わらないことがわかった (図1)。

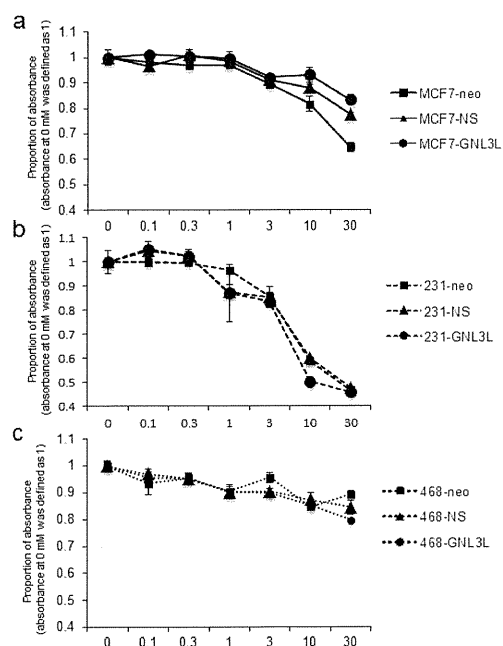


図1 アドリアシンに対する感受性

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)。これらの結果から、エベロリムス低感受性TNBC細胞にがん幹細胞形質を付与するとシクロホスファミドに対する抵抗性がわずかながら上昇することがわかった (図2)。

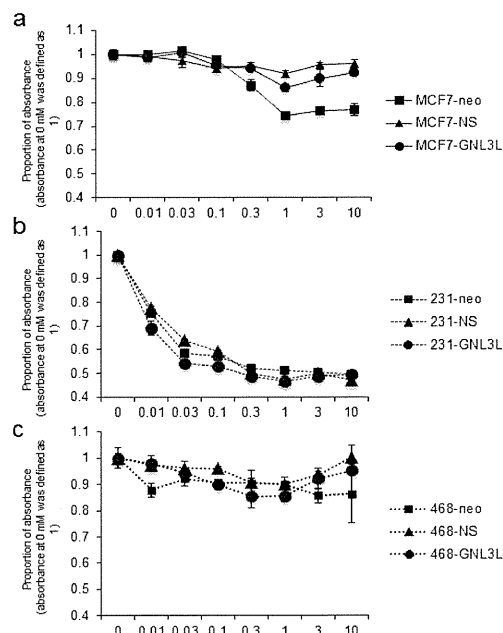


図2 シクロホスファミドに対する感受性

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曝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)。

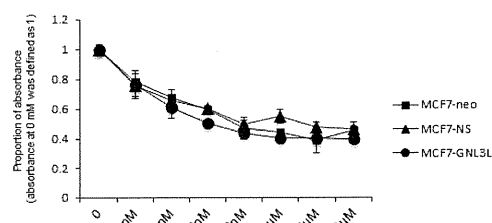


図3 パクリタキセルに対する感受性

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)。これらの結果から、エベロリムス低感受性TNBC細胞にがん幹細胞形質を付与しても、ソラフェニブに対する抵抗性は変わらないことがわかった (図4)。

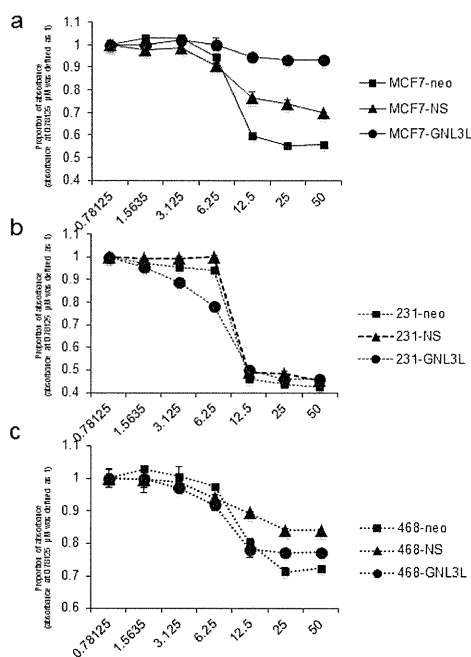


図4 ソラフェニブに対する感受性

D. 考察

がん幹細胞機能維持分子群であるhTERT、NS、BRG1は、M期に紡錘系に局在し、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関連することから、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関連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関連する可能性がある。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。今後は、TNBCにおけるNS/GNL発現量と薬剤耐性の度合いとの相関関係を解析し、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かを明らかにする。また、M期をターゲットとした薬剤(エリブリン等)を中心に、TNBC人工がん幹細胞モデル等を用いてスクリーニングを行っていく。

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関連することを示唆した。TNBCの予後不良形質もNS・TWISTの発現量と関連する可能性がある。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。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

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]

学会発表

国際学会

該当なし

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)

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 23 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：エピゲノムの側面からの基礎研究とトランスレーショナル研究

分担研究者：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を目的とする。今年度は、乳がんのがん抑制遺伝子である *BRCA1/2*、及び、*PTEN* 遺伝子について、高精度メチル化解析法である定量的 methylation-specific PCR (qMSP) 法を用いて、乳がん細胞株及び乳がん検体の DNA メチル化解析を行なった。その結果、*BRCA1* 遺伝子のメチル化は TNB で高頻度に存在すると考えられた。一方、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子については、乳がんでは全くメチル化されていなかった。

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(サイレンシング)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。DNA メチル化異常をがんの存在診断、性質診断、及び、リスク診断に利用する試みがなされている。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 10-20% 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、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。昨年度は、乳がんのがん抑制遺伝子として知られる *BRCA1/2*、及び *PTEN* 遺伝子について、高精度定量法であるメチル化解析技術、定量的 methylation-specific PCR (qMSP)法の測定条件を決定し、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(AFPE)検体で qMSP 法が実施可能であることを確認した。本年度は、実際に乳がん細胞株及び乳がん検体を用いて qMSP 法を実施し、*BRCA1/2*、及び、*PTEN* 遺伝子のメチル化異常がどの程度存在し、TNB とどのような関連があるのか検討した。

B. 研究方法

1) 材料

乳腺上皮細胞(2系統)、乳がん細胞株 (18系統)、及び、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 AFPE 検体 42 例を用いた。

2) 解析対象とした遺伝子

BRCA1/2 及び *PTEN* 遺伝子に加え、*CLDN1* 及び *CLDN2* 遺伝子についても同様に測定条件を決定し、本実験で解析する対象遺伝子とした。

3) ゲノム DNA の抽出

乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株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/エオジン染色の観察により、腫瘍存在率が多い検体は直接、また、間質の混入が多い検体はマクロダイセクションを施行した後、Gentra® Puregene Tissue Kit (QIAGEN)により抽出した。

4) ゲノム DNA の bisulfite 処理

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、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。

5) 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 real-time 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。

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倫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確認し、実施した。

C. 研究結果

1) 乳がん細胞株におけるメチル化レベル測定

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。*BRCA1* 及び *BRCA2* 遺伝子ではメチル化レベルがやや高い細胞株が存在したが、これは遺伝子発現抑制をもたらすプロモーター全体の高密度なメチル化ではなく、発現抑制とは無関係の散在性のメチル化であると予想された。

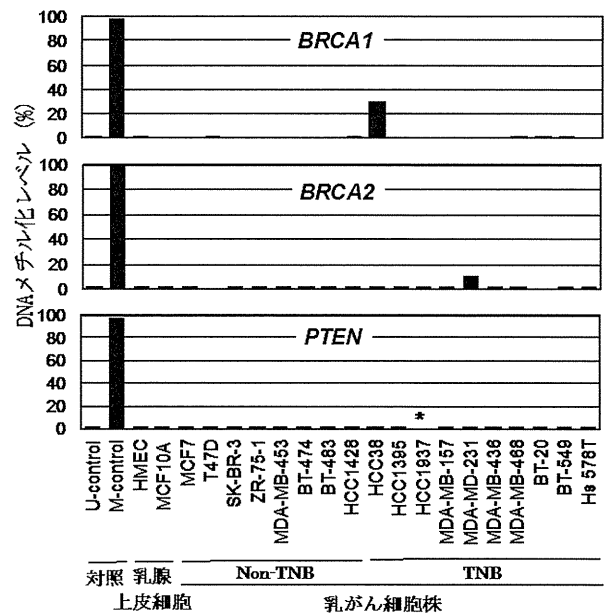


図2 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株における DNAメチル化レベル

* コピー数が増幅せず、相同欠失が示唆される

TNB は一部、claudin-low 乳がんが含まれていることが報告されている。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。しかし、これらの高メチル化は TNB とは関係なかった。従って、以後の解析は行なわなかった。

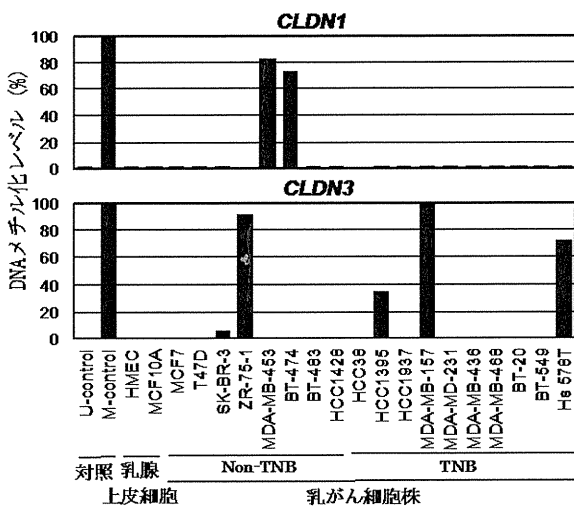


図 3 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株における DNAメチル化レベル

2) 乳がん検体でのメチル化レベル測定

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)。

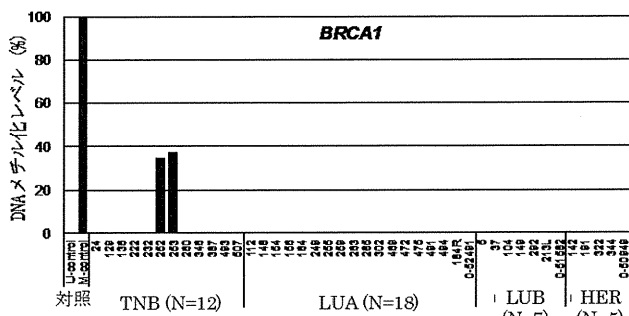


図 4 乳がん検体における *BRCA1* 遺伝子の DNAメチル化レベル

D. 考察

乳がん細胞株 18 系統、及び、乳がん検体 42 例を用いて、 *BRCA1/2*、 及び、 *PTEN* 遺伝子のメチル化レベルを測定した。 *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(Veeck, *J. Clin. Oncol.* 2010, Stefansson, *Epigenetics*, 2011, Gacem, *Cancer Epidemiology*, 2012)、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。

今回、乳がん検体 42 例を用いて、 *BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子のメチル化レベルも測定したが、いずれも高メチル化を示す検体は一例も存在しなかった。 *BRCA2* 遺伝子のメチル化に関してはこれまでにほとんど報告がないが、 *PTEN* 遺伝子に関しては、乳がんにおいて高メチル化の頻度が高いことが数多く報告されており、本実験結果と異なる。これは、上述の定量性の問題に加え、解析領域の違いによるものと考えられる。DNA メチル化によるサイレンシングには、転写開始点から約 200bp 上流に渡るヌクレオソーム非存在領域でのメチル化が関係していることが知られており、この領域にプライマーを設計することが重要である。報告されている論文では、転写開始点より 1Kb 以上 5'上流、または、エクソン 1 内部(転写開始点より約 50-180bp 下流)に設計されたプライマーを用いて解析しており、 *PTEN* 遺伝子のサイレンシングに関わるメチル化を観察していない可能性がある。

TNB は他の群と比較して、 *BRCA1* 遺伝子のメチル化の頻度が高いことが示唆されたので、今後は解

析サンプル数を増やし、TNBにおける正確なメチル化頻度の算出を目指す。また、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

TNBでは、*BRCA1*のメチル化が高頻度に存在すると考えられた。一方、*BRCA2*及び*PTEN*遺伝子については、乳がんでは全くメチル化されていなかった。

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

なし

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 これまでの研究で、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、特に強い感受性を発揮することを証明した。今年度は、感受性株と非感受性株の差を、vivoの実験にて検証するとともに、そのメカニズムを明らかにする目的で、EGFR蛋白の強制発現、PTEN蛋白のノックダウンによる感受性の変化、everolimus暴露によるmTORの上流蛋白質の変化を検討した。vivo実験においては、vitroでの感受性の差と同様に、効果の違いが認められた。EGFR、PTENの修飾による感受性の変化は認められなかったが、everolimus暴露によるAKTの変化として、非感受性株は、薬剤暴露後にリン酸化が増加する傾向が認められたのに対して、感受性株はAKTのリン酸化の増加は明らかでなかった。感受性株と非感受性株では、everolimusの標的であるmTORの抑制レベルに差を認めないことから、mTORの感受性は、薬剤暴露後のAKTのリン酸化修飾の差に依存する可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究目的は、TN乳がんにおけるeverolimusの感受性規定因子を明らかにすることである。

本年度は、昨年度までに見出した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。

以上の結果と前年度までの結果をもとに、TN乳がんの感受性因子を明確にする。

B. 研究方法

(1) マウス移植モデルを用いた抗腫瘍効果の確認

感受性株であるMDA-MB-468、および非感受性株であるMDA-MB-231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週間経口摂取して、抗腫瘍効果を検討した。

(2) EGFR、PTENが、everolimusの感受性に及ぼす影響の検討

EGFRの影響は、非感受性株であるMDA-MB-231、および-436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。

(3) 薬剤暴露によるAKT、MAPKカスケードへの影響

感受性株であるMDA-MB-468、BT549、非感

受性株であるMDA-MB-231、MDA-MB-157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、リン酸化を検討した。

C. 研究結果

(1) マウス移植モデルを用いた抗腫瘍効果の確認

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 mm³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1）。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。

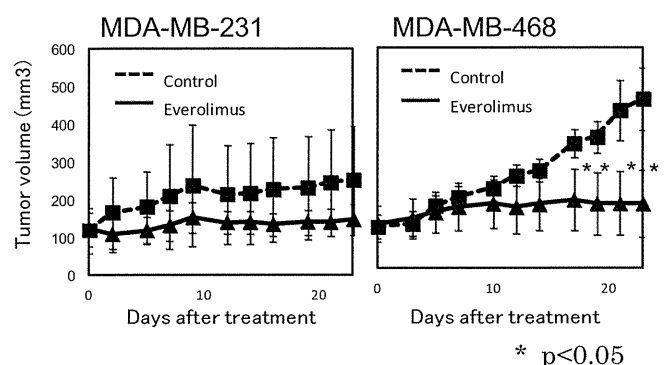


図1. マウス移植モデルにおけるeverolimusの抗腫瘍効果

(2) EGFR、PTENが、everolimusの感受性に及ぼす影響の検討

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（前回報告）、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2A. 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 type 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2B. 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。

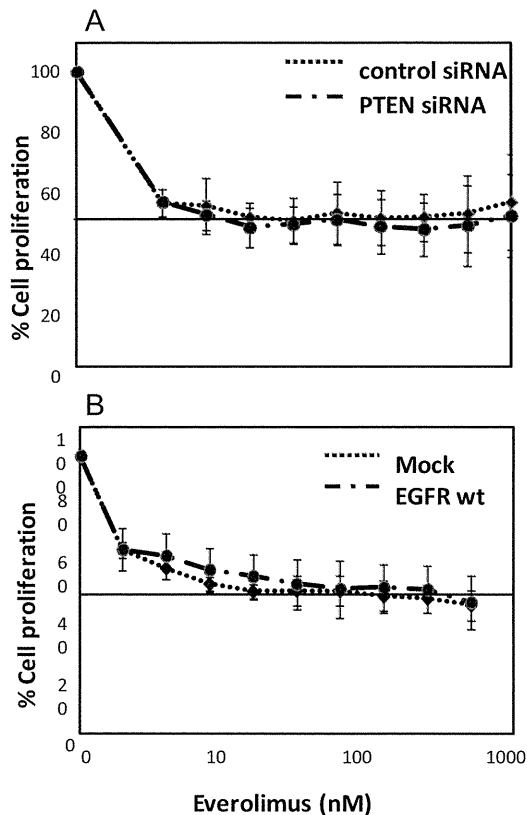


図2. PTEN、EGFRのeverolimusの感受性に与える影響

(3) 薬剤暴露によるAKT、MAPKカスケードへの影響

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。phospho-Erk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3. 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。

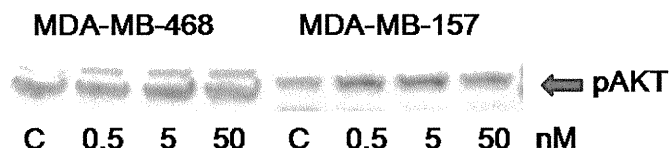


図3. everolimus暴露後のpAKTの変化

D. 考察

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。ヘテロな集団である、TN乳がんをEGFR、CK5/6、stem cellマーカーを用いて、basal-likeサブタイプに分類することが可能であるが、今後は、薬剤暴露後のAKTの反応に関わる分子を見出すことにより、さらに正確な分類が可能になると考えられた。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. 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.
3. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

（知的財産権）

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

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（TN）乳がんの30%以上は術前化学療法が有効であるが、5%程度の例で術前化学療法の途中で病状進行（PD）となることが知られている。PDとなるTN乳がんの分子学的特徴を明らかにする目的で、過去20年近くに摘出された乳がんの病理部門データベース、カルテの閲覧によってTN乳がんを選び出し、20例の術前化学療法PD例と、対照の100例の術前化学療法未施行例（95%はPDにならない群）を選択して、パラフィン包埋病理ブロックから組織マイクロアレイ（TMA）を構築した。PD群は組織学的に化生癌や広範な壊死を伴う充実腺管癌が大多数を占め、特定の形態的特徴を示していた。今後、作製したTMAブロックを用いた抗体スクリーニングやDNA、mRNAレベルの解析によって化学療法に対しPDとなるTN乳がんの分子レベルでの特徴を証明していきたいと考えている。

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）乳がんの中で化学療法抵抗性に関わる分子マーカーを見出すための研究系を確立することにある。TN乳がん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。この研究の目的のために当院過去の手術例の調査によりTN乳がんを有した患者を選び、切除腫瘍標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いてPD群と対照群の組織マイクロアレイ（TMA）を作製する。また切除腫瘍の凍結検体、メタノール/アセトン固定組織ブロックの保存状況を確認しリストを作成して、TN乳がんの診療に役立つような分子レベルの研究につなげる基盤を作る。

また、TN乳がん細胞におけるBRCA1遺伝子のDNAメチル化研究などの個別研究の支援も継続する。

B. 研究方法

(1) 研究デザイン

TN乳がんの約5%が術前化学療法の途中で全く治療に反応性を示さない臨床的PDとなることが知られている。術前化学療法中にPDとなり外科的摘出が行われた原発性乳がんを検討症例群とし、術前化学療法施行せずに外科的に摘出されたTN乳がんを対照群とする。対照群は95%の例が化学療法に対する何らかの反応性を有すると想定されることから、おおむね化学療法に対す

る感受性群とみなすことができる。

これらの2群においては腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を対象にTMAを構築し、免疫染色による分子発現の検討を試みることにした。

新たな免疫染色方法（X）を用いて分子の発現を検討することを踏まえ、下記の通りサンプルサイズを算出した。PD群と対照群におけるXの陽性率の差を、両側検定で、下記の表の α 、検出力（ $1-\beta$ ）とした場合に必要となるPD群の人数は表1のようになる。

表1. サンプルサイズの算出

免染陽 性率差 (%)	PD 群 免染陽 性率(%)	対照群 免染陽 性率(%)	α	$1-\beta$	PD 群 の人数
25	35	10	0.1	0.8	21
30	40	10	0.05	0.9	22
30	50	20	0.05	0.8	21
35	65	30	0.1	0.9	19

また、PD群：対照群＝1：5で疫学統計学的にプラトーに達すると考えて対照群を設定した。この算出に基づき、PD群20例、対照群100例を選ぶこととし、過去のデータベースとカルテ閲覧作業を進めた。

本研究は、原発性乳癌の切除検体を用いて、薬物療法に対する乳癌細胞の耐性獲得に関わる

分子変化を検討する、後ろ向き研究 (retrospective study) である。すでに治療おこなわれている症例の病理部門データベース閲覧、カルテ閲覧により、治療内容および治療前の患者背景について調査し、すでに得られた手術検体を用いて分子学的な検討を行うものであり、疫学研究に関する倫理指針の対象となる。

(2) 研究対象の選択

1998年～2012年3月までの間に国立がん研究センター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名の患者につき腫瘍がTN乳がんであることを中央病院病理科の部門システムデータベースにより確認した。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、部門データベースとカルテの閲覧により、ホルモン陰性、HER2陰性を抽出した。これらの患者から得られた組織ブロック、凍結組織など他の試料残存状況も調査した。

(3) 組織アレイ (TMA) ブロック構築

PD群20例と対照群101例を選択した。これらの例のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックが十分残っていることを確認したうえで、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) 個別研究支援

主研究とは別に、TN乳がんにおけるDNAメチル化を調べるための、過去に作製された腫瘍のアセトン固定組織ブロックについてホルモン受容体 (HR) (エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体) ならびにHER2の状態を今日の標準的手技による免疫染色で検索し、TN乳がん36例を選び出した。

(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) TMAブロック構築

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。

現時点ではまだデータを出すに至っていないが、転写因子、チロシンキナーゼ、がん幹細胞、上皮間葉移行 (EMT) などのマーカーを免疫染色にて検討していく予定である。

(2) 個別研究支援

TN乳がん36例と対照のluminal型 (HR陽性) 及びHER2-enriched型 (HR陰性、HER2陽性) 例を選び出し、薄切による組織切片を作製、laser-captured microdissectionを行ってDNA抽出用に適した組織サンプルを研究所に提供した。

D. 考察

TN乳がん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。今後、作製したTMAブロックを用いた抗体スクリーニングやDNA、mRNAレベルの解析によって化学療法に対しPDとなるTN乳がんの分子レベルでの特徴を証明していきたいと考えている。

E. 結論

TN乳癌において化学療法抵抗性の指標となるバイオマーカーの探索の基盤が整った。抗体スクリーニング等の検討を開始したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

2. 学会報告

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

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

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

トリプルネガティブ乳がん（TNB）に対する後向き臨床試験（レトロスペクティブ試験）より得られた乳がん組織を用い、TNBの患者の予後を規定する分子異常を同定することを試みた。手術可能、腋窩リンパ節転移陽性TNBで、標準的な術後補助化学療法を施行された75症例を対象とした。手術によって得られた乳がん組織を用い、免疫組織染色法（IHC）を用いて11種類のがん関連タンパク質の発現量を測定した。又、同組織を用い、PI3CA変異、および、AKT1変異を同定した。結果、HER4の発現はAKTのリン酸化（pAKT）と有意に相関し（ $P=0.004$ ）、HER4とpAKTはそれぞれ、統計学的に有意な予後良好因子（Event Free Survival: EFSの延長）であった（ $P=0.024$, $P=0.03$ ）。又、ERKのリン酸化（pERK）も独立した予後良好因子であり、有意に、EFS（ $P=0.002$ ）と全生存期間（OS）（ $P=0.006$ ）の延長と相関した。又、EGFRの発現量とIGFR-1の発現量との間には有意な相関をみとめた（ $P=0.001$ ）。PI3CA変異を35%にみとめた。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。

A. 研究目的

本研究班の目的の一つに、日本人におけるTNBを、その生物学的特徴より分類をし、予後や化学療法の奏効に関連する遺伝子変異、タンパク質を同定することがある。目的を達成するために、TNBに対する後向き臨床試験（レトロスペクティブ試験）を計画し実施した。手術によって得られた乳がん組織を用い、遺伝子変異及びタンパク質の発現量を測定した。

B. 研究方法

1) 対象

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。TNBの確定診断は、ER陰性（Allred score < 3 、又は陽性細胞1%以下）、PGR陰性（Allred score < 3 、又は陽性細胞1%以下）、

HER2陰性（ $HER2 \leq 2+$ 又は、FISHによる染色体17番における増幅が2.2以下）と定義した。

2) 免疫組織染色法

パラフィン固定、又は、メタノール固定されたTNB手術検体を用いた。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。

3) 遺伝子変異検出

パラフィン固定、又は、メタノール固定された手術検体より、マイクロダイセクション法を用いて、腫瘍部位のみ切り出し、一般的な方法を用いてDNAを抽出した。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。

4) 統計学的解析

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。

(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の倫理委員会の承認を得て実施した。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った。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) 患者背景

本試験の対象症例の背景を図1に示す。

図1 患者背景

図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
術後補助化学療法の種類	アンスラサイクリン系薬剤、又はタキサン系薬剤	45
	アンスラサイクリン系薬剤のみ	20
	タキサン系薬剤のみ	7
	フッ化ピリミジン系薬剤	3

2) たんぱく質発現及び遺伝子変異結果

対象症例のTNB組織を用いた、11種類のがん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の結果を図2に示す。

図2 たんぱく質発現及び遺伝子変異

Markers	number	%
<i>PIK3CA</i> 変異	H1047R	15
	E545K	11
	none	49
<i>Akt1</i> 変異	E17K	0
	none	45
PTEN	not applicable	30
	loss	40
HER1	expression	35
	over-expression	44
HER3	low/null	31
	expression	47
HER4 (細胞膜)	low/null	28
	expression	31
HER4 (細胞質)	low/null	44
	expression	46
	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	

3) pAKT及びpERK1/2に相関する因子

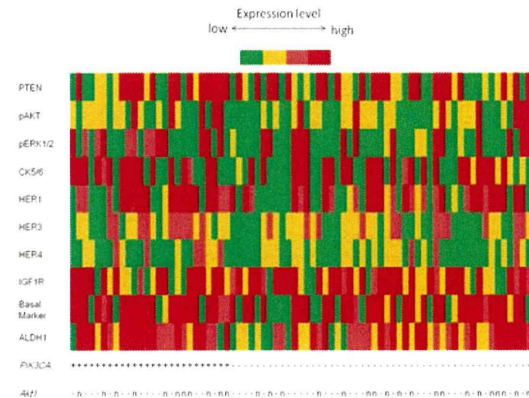
対象症例のTNB組織を用いたがん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無と、リン酸化AKT (pAKT) 及びリン酸化ERK1/2 (ERK1/2) との相関について検討した結果を図3に示す。

図3 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
		0.62
	pERK	0.10
	<i>PIK3CA</i> mutation	0.21
	HER1	0.64
	HER3	0.09
	HER4 (membrane)	0.35
	HER4 (cytoplasmic)	0.28
	IGF1R	0.17
PTEN	0.25	
ALDH1	1.00	
Basal subtype	0.44	

4) たんぱく質発現及び遺伝子変異マップ

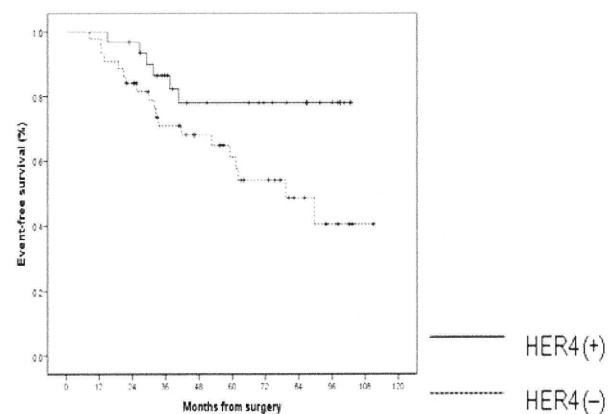
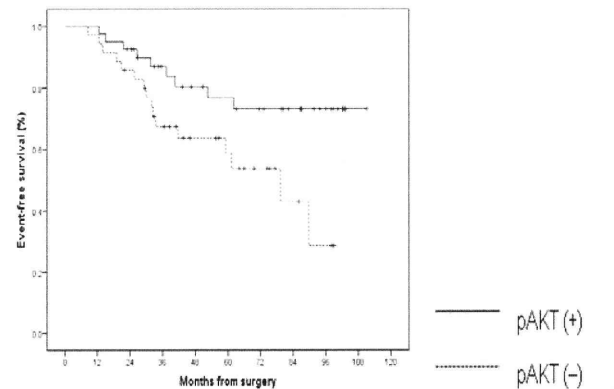
がん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無の結果をマップにしたものを図4に示す。



5) pAKT及びHER4の発現量とTNBCの予後との関係

pAKT及びHER4の発現量の有無別のEFSを図5に示す。

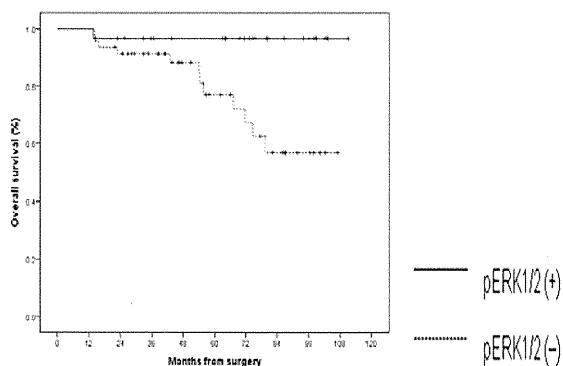
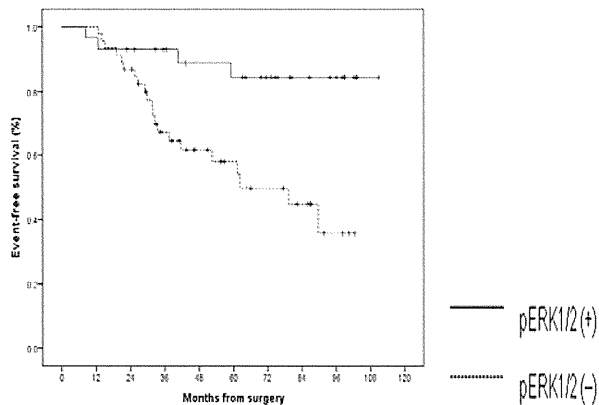
図5



pERK1/2とTNBCの予後との関係

pERK1/2の発現量の有無別のEFSとOSを図6に示す。

図6



該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報