

2011/9062A

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23年度 研究報告書

研究代表者 戸井 雅和

平成24(2012)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23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

京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター
悪性制御研究プロジェクト 特定講師

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24(2012)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. 乳癌におけるアロマターゼ阻害剤投与によるマイクロ RNA の変動および let-7f に よる CYP19A1 遺伝子の制御に関する検討 笹野 公伸	-----	15
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術前内 分泌療法の効果予測因子の検証 山城 大泰 石黒 洋 稲本 俊	-----	24
3. 乳癌のリンパ節転移と術前化学療法の効果予測システムの開発 内藤 泰宏 杉本 昌弘 高田 正泰	-----	31
4. 70 遺伝子シグネチャ (MammaPrint®) の経済評価 近藤 正英	-----	38
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 CD44 の意義に関する研究 黒井 克昌 宮本 博美	-----	40
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	42
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軽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

研究要旨

乳がんの診断治療法は著しい進歩を遂げたが、多くの課題も存在する。例えば、intrinsic subtype を用いた腫瘍特性の亜分類が進展し実地臨床に概念は導入されつつあるが、臨床応用にあたっては何らかの代替指標の開発が必要である。特に、化学療法、ホルモン療法の効果予測マーカー、予後予測マーカーの開発、アルゴリズムの構築が必要である。このような治療法の個別化、最適化、標準化、均てん化に関しては医療経済効率性分析を同時に行うことが望ましい。さらに、将来の発展の方向としては数理モデル等を用いて診療アルゴリズムを数式化し、診療支援ツールとして一般化することがあげられる。これは今後の大きな進展が期待される分野である。

今年度は、subtype 別に化学療法、ホルモン療法、化学ホルモン療法の適応、効果予測、標的療法との併用に関する検討を行い、主要な診療上の意思決定過程、腋窩リンパ節転移予測、術前化学療法の組織学的効果予測、術前治療施行症例の予後予測など、の数理モデル化及びアルゴリズムを用いた診療支援ツールの作成、費用対効果に関する検討、更に新規ホルモン療法のバイオマーカー探索を行った。ホルモン受容体陽性 luminal-type 乳がんでは増殖指標 Ki67/MIB1 labeling index (Ki67LI)、多遺伝子検査等を組み合わせたアルゴリズムを高精度化し、術前ホルモン療法の効果予測、手術療法選択への応用、術前化学ホルモン療法の効果予測における検討した。臨床病期、組織学的グレード等も組み入れた。

局所療法に関しては、腋窩リンパ節転移陽性例における腋窩廓清省略の可能性を都立駒込病院の 1,425 例のデータを用いて解析、センチネルリンパ節切除数と腋窩廓清の必要性に関する知見がえられ、治療の最適化に寄与すると考えられる。

数理モデルを用いた意思決定の可視化、定量的客観的評価基準の作成に関しては、腋窩リンパ節転移の有無を予測するモデルを高精度化して、データを入力すれば予測結果を表示する web システムを構築、前向き臨床的検証的検討を行った。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しても検証的臨床研究を開始した。術前抗 HER2+化学療法施行例における組織学的抗腫瘍効果別術後予後予測モデルに関する検討を行った。新規バイオマーカーの探索的研究では microRNA (miRNA) のアロマトラーゼ阻害薬の作用機序における関与に関する検討を行ったが、第3世代アロマトラーゼ阻害薬による種々の miRNA の発現変動が認められ、がん抑制因子として知られる let-7f は *aromatase* を標的 mRNA とする可能性等新たな知見が見いだされた。

今後、アロマトラーゼ阻害薬の新しい効果予測マーカーになる可能性が示唆された。

多遺伝子検査の医療経済学的効率性の検討では、70 遺伝子シグネチャー (MammaPrint®) の日本の保健システム下における評価を行った。ホルモン受容体陽性の早期乳がん患者を対象に再発リスクの評価と化学療法の効果予測に基づいて、術後化学療法の適応を示し、効果の見込めない化学療法を回避することによって毒性軽減を図るものであり、今回の検討で推定された増分費用効果は腋窩リンパ節転移陰性、Her2 陰性症例で 3, 873, 922/QALY、感度分析では必ずしも頑健な結果でなかったが、費用対効果に優れる可能性があり、公的医療制度で同検査の提供が社会的に受け入れられる可能性もあることが示唆された。

一連の成果は原発性乳がん患者における治療成績の向上と毒性の軽減と QOL の改善に寄与し、また医療経済的負担の軽減にも貢献すると考えられた。

研究目的

予後因子、治療効果予測因子を導入した原発性乳がん診療アルゴリズムを構築し、乳がん患者の再発リスク抑制、毒性の低減と 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。乳がんの subtype 別に検討を進め、luminal-type の乳がんでは臨床病理学的情報、細胞増殖指標、多遺伝子検査を組み合わせたアルゴリズムの構築、HER2 陽性乳がんでは抗 HER 2 療法+化学療法の抗腫瘍効果に基づく予後予測等を主検討課題とする。本研究の背景には、原発性乳がん発生数の増加、intrinsic subtype による腫瘍特性分類の進歩、subtype 分類の病理組織学的代替指標に関する研究の進展、抗 HER 2 療法など種々の新規治療法の導入、治療コストの増大等がある。また、技術的背景として、多遺伝子検査等の新規診断法の普及（特に海外）、効果予測、予後予測マーカー研究の進展、分子標的薬の作用、耐性機構解析に関する研究の進歩、術前治療、コホート研究の進展、数理モデルを用いたアルゴリズム研究の進展などがある。

腫瘍進展、治療反応性に関して高い多様性を示す乳がんに対し、subtype 別に予後因子、効果予測因子を組み合わせ導入し、診療の最適化、個別化、標準化ならびに均てん化を図るものである。新規バイオマーカーを導入し、膨大な臨床病理組織学的情報の解析処理に関しては alternating decision tree (ADTree) を用いた数理モデル系を導入する。また、医療経済効率性の検討を同時に行う。Web 上の診療支援ツールを開発し、研究成果を実地臨床、一般社会に還元する。

研究方法

Luminal-type 乳がんに関する検討は京都大学医学部附属病院の症例、また JFMC34 などの多施設前向き臨床試験からの腫瘍組織試料等を用いて行った。臨床的、病理学的、医療経済学的観点から同時に検討を行った。組織グレード、細胞増殖指標 Ki67LI、多遺伝子検査などを組み合わせた分析を施行、術前化学療法、術前ホルモン療法、術前化学ホルモン療法等の病理組織学的抗腫瘍効果、臨床的な抗腫瘍

効果との相関性、また乳房温存療法施行率との関連性についても検討した。腋窩リンパ節転移状況と腋窩手術の関係に関する分析は都立駒込病院の症例を用いた。

Alternating decision tree (ADTree)を用いた数理モデル研究は、京都大学附属病院、都立駒込病院、大韓民国ソウル国立大学病院に加えて、筑波大学病院、新潟県立がんセンター、愛知がんセンター中央病院、独立行政法人国立病院機構大阪医療センター、同九州がんセンター等の協力をえて行った。既存の nomogram との比較、性能評価試験を行った。腋窩リンパ節転移予測モデルは術前針生検にて浸潤がんと診断された原発性乳がん女性で、センチネルリンパ節生検あるいは腋窩リンパ節郭清を施行された症例、腫瘍径は4cm以下の症例を対象に検討した。予測する項目は、腋窩リンパ節の転移の有無（転移巣の最大径 $\geq 0.2\text{mm}$ ）とした。数理モデル構築には Alternating decision tree (ADTree)を含む手法を採用した。国内2施設から291例の臨床病理学的データを用いてモデルを構築し、ソウル国立大学病院から得られた174例の独立したデータを用いてモデルを評価した。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しては、対象をアンスラサイクリン系タキサン系抗がん薬の逐次併用レジメンによる術前化学療法が施行された浸潤性乳がん患者とし、腫瘍径5.0cm以下の症例とした。国内3施設から収集した150例の学習用データからモデルを構築、ランダム化比較試験から得られた173例の独立データを用いて評価を行った。

術前にトラスツズマブと細胞障害性抗癌薬との併用療法を施行したHER2陽性原発性乳がん患者における病理組織学的抗腫瘍効果と予後との関連を調査する観察研究を計画した。対象は2001年1月1日～2010年12月31日までに診断された原発性HER2陽性乳がんで、トラスツズマブを含む術前化学療法を施行された症例とした。全国規模のアンケート調査を施行した。

10-20項目の臨床病理学的データを入力すれば予測結果を表示するweb上システムを作成した。

ホルモン療法に関するがん関連miRNAの研究は東北大学において行われた。In vitro, in vivoの系を用い、AI薬による発現変動分析等を行った。Let-7f等に関しては、ホルモン療法の効果予測、あるいは耐性に関連するバイオマーカーの検討を行った。

医療経済学的効率性の検討では、国際的に実用化され、日本での臨床的検証研究も報告されている70遺伝子シグネチャー(MammaPrint®)に関して検討した。日本の保健システム下における医療経済学的な評価を筑波大学を中心に行った。

研究結果

Luminal-type乳がんのアルゴリズムに関する検討では、図1のような概略とし、京都大学病院症例の検討、JFMC34試験の腫瘍組織材料を用いた解析結果及び関連論文等を基に(1-5)、図2のようなアルゴリズムを構築した。さらに、術前化学ホルモン療法(経口FU, cyclophosphamide po等)施行例における検

討を行った。JFMC34 試験の検討では、術前ホルモン療法の効果予測に加え、手術療法の結果との相関性を検討した。同臨床試験では、ホルモン療法施行前にその時点での想定術式を予め記載しておき、ホルモン療法施行後の実際の術式を評価するプロトコールデザインになっている。本来乳房全切除が必要な症例の約 3 分の 2 の症例で乳房温存療法が施行されていた (5)。切除範囲の縮小効果の大部分は治療による腫瘍の縮小を反映するものと考えられる。今回の検討では、21 gene signature の recurrence score (RS) と臨床的抗腫瘍効果ならびに施行術式との関係を検討したが、臨床的抗腫瘍効果と RS との関連性に関しては RS low/intermediate risk と RS high-risk の間で抗腫瘍効果に大きな違いが認められた。施行術式との関連性においては、RS low risk 群の乳房温存率が極めて高く、RS intermediate risk, RS high-risk の順に次第に低下していた。一連の結果は RS の cut point は臨床のエンドポイントによって異なることを示唆している (図 3、表 1)。

手術療法の個別化、最適化に関する検討では、腋窩リンパ節転移個数、そのうちセンチネルリンパ節転移陽性個数、腋窩リンパ節転移陽性例における転移の状況、動態を詳細に検討した。

数理モデル研究に関しては、腋窩リンパ節転移予測モデルについて、15 の臨床病理学的因子が ADTree アルゴリズムにより自動的に選択された。作成されたモデルの予測精度は、学習用データで受信者動作特性 (ROC) 曲線下面積 (Area under ROC: AUC)=0.770 [95%信頼

区間 (CI): 0.689- 0.850, $P < 0.0001$]、評価用データで AUC=0.772 (95% CI: 0.689- 0.856, $P < 0.0001$) と高い予測精度と汎用性を示した。ブートストラップ法を用いてアウトカム (リンパ節の転移の有無) の症例を変動させた場合にどの程度予測値が変動するかを調べたが、学習用データでは 0.766 (95% CI: 0.760- 0.772)、評価用データでは 0.768 (95% CI: 0.763- 0.774) と大きな変動はなかった。また、欠損データの値をランダムに変化させた場合、AUC 値の変動は小さく欠損値への耐性が示唆された。本モデルを web サイトとして立ち上げ、必量な変数を入力すれば予測結果が自動計算され表示されるシステムを開発した。アンストラサイクリン、タキサンを用いる術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果予測モデルでは 28 の臨床病理学的因子から 15 の因子が選択され、作成されたモデルは、学習用データで AUC=0.766 [95%信頼区間 (CI): 0.671- 0.861, $P < 0.0001$]、評価用データで 0.787 (95% CI: 0.716- 0.858, $P < 0.0001$) と高い予測精度と汎化能力を示した。モデルによる予測確率 20%以下を pCR の可能性が低い群と仮定した場合、偽陰性率は 7.7%、陰性的中率は 95.9%であった。また、モデル作成手法の比較として、同一のデータから多変量ロジスティック回帰を用いて別の予測モデルを開発したが、予測精度は AUC=0.754 と ADTree を用いたモデルのほうが高精度であった。本モデルも web サイトとして立ち上げ、必量な変数を入力すれば予測結果が自動計算され表示されるシステムを開発した。抗 HER2 薬トラスツズマブを含む術前化学療法施行症

例における予後予測モデルの作成では、主要評価項目を無病生存期間、副次評価項目を全生存期間、無再発生存期間として、pCRの予測因子の探索、局所・領域再発の発現の有無と発現までの期間、脳転移の発現の有無と発現までの期間などの検討を計画している。事前に国内50施設を対象に行ったアンケート調査によると、研究参加可能であると回答した施設は45施設であり、対象症例は約1000例見込まれる。93%の施設ではHER2検査は現行と同じく免疫組織染色とFISHを併用して行っており、91%の施設では術前療法として現行の標準レジメンであるアンスラサイクリンおよびタキサン併用レジメンにトラスツズマブを併用している。本研究はすでに京都大学医学部附属病院の倫理審査承認を得ており、近日中に調査を開始する予定である。

ホルモン療法の中ではアロマターゼ阻害(AI)薬がエストロゲン受容体陽性の閉経後乳癌に対する第一選択薬とみなされるようになったが、AI薬の作用機序には不明な点が多く、抗腫瘍効果の分子機序は未だよくわかっていない。そこでmicroRNA(miRNA)に着目した研究を遂行、AI薬の投与が複数のがん関連miRNAの発現を変動させ、さらに、既知のがん抑制因子であるlet-7fが*aromatase*遺伝子を標的mRNAとしている可能性が見いだされた。これらの研究成果は新規のホルモン療法効果予測マーカーとなる可能性を示唆している。

医療経済学的効率性の検討では、ホルモン受容体陽性早期乳がん患者において、再発リスクの評価と化学療法の効果予測に基づいて、

術後化学療法の適応を示し、効果の見込めない化学療法を回避することによって、毒性軽減につながる多遺伝子検査(multigene assay)のなかで、国際的に実用化され、日本での臨床的検証研究も報告されている70遺伝子シグネチャー(MammaPrint®)の日本の保健システム下での経済評価を行った。推定された増分費用効果比は、N-, Her2-で¥3,873,922/QALYであったが、感度分析では必ずしも頑健な結果とはいえなかった。したがって費用対効果に優れる可能性があり、公的医療制度で同検査の提供が社会的に受け入れられる可能性もあることが示唆された。

考察

今回の検討でluminal-type乳がんにおける薬物療法選択、ホルモン療法単独か化学療法→ホルモン療法の適応に関するひとつの指針が示されたと考えられる。

組織グレード、病期などにKi67LI、多遺伝子検査21遺伝子シグナチャー等を組み合わせることによって、ホルモン療法単独で良好な予後が期待できる症例を選別することが可能であり、同時に手術術式の予測にも役立つ可能性がある。

多遺伝子検査は全般に高コストであり、利用効率性を高めることが求められるが、本研究ではKi67LI等を組みあわせることで、多遺伝子検査の必要性が高い症例の絞り込みが可能と思われる。また、cut pointにより異なるエンドポイントの設定も可能で、複数の臨

床的要求に対応することもできるかもしれない。現在、本アルゴリズムを用いた化学ホルモン併用療法の効果予測、予後予測能に関する検討を前向きに行っている。腋窩治療の最適化、特に腋窩リンパ節転移陽性例における腋窩廓清の省略は重要な臨床的課題である。腋窩リンパ節転移陰性例での腋窩廓清省略はすでに国際的にコンセンサスをえているが、少数の腋窩リンパ節転移陽性例での腋窩廓清の省略については現在議論が進んでいるところである。Z11 試験との関連で今回、都立駒込病院の症例を用いて検討したが、いくらのリンパ節を検査すると腋窩廓清省略の選択が可能か、まだ結論には至らなかった。さらに前向きに、多くの症例で、リンパ管マッピングや検査方法も含めて検討を進める必要があると考えられた。

Alternating decision tree (ADTree) 数理モデル系を用いたアルゴリズムの研究では、腋窩リンパ節転移の有無の予測、術前化学療法の組織学的効果の予測いずれにおいても予測精度の向上がえられた。必量な変数を入力すれば予測結果が自動計算され表示されるシステムを web サイトとして立ち上げ、開発した。現在、前向き臨床研究を遂行中である。術前化学療法の組織学的効果予測モデルでは ER-/HER2-乳がんにおける予測精度が低いことが明らかになった。現在、これらの腫瘍に対する予測精度の向上に努めている。同対象の症例を多く集積しモデル化を再度行うこと、新しいバイオマーカーを導入することを検討している。

抗 HER2 薬トラスツズマブを含む術前化学療

法施行症例における予後予測関連モデル研究については、京都大学医学部附属病院の倫理審査承認を得られており、近日中に研究を開始する予定であるが、術前治療効果に基づいて、治療効果別にモデルを構成する予定である。HER2 陽性乳がん抗 HER2 薬の効果に基づく予後予測研究は未だほとんどなく、新しい研究課題である。

アロマターゼ阻害 (AI) 薬は閉経後ホルモン療法の第一選択薬で頻用される。しかしながら、エストロゲンの枯渇等をもたらす AI 薬の作用機序には不明な点が多く残されており、抗腫瘍効果の分子機序について未だよくわかっていない。そこで microRNA (miRNA) に着目した研究を遂行中で、本年度は AI 薬の投与が複数のがん関連 miRNA の発現を変動させ、さらに、既知のがん抑制因子の let-7f が *aromatase* 遺伝子を標的 mRNA としている可能性が見いだされた。これは非常に重要な知見であり、ホルモン療法の効果発現機序、耐性機序の分析、また効果予測バイオマーカー開発においても有用と考えている。

医療経済学的効率性の検討では、これまでの 21 gene signature に加えて、国際的に実用化され、日本での臨床的検証研究も報告されている 70 遺伝子シグネチャー (MammaPrint®) の日本の保健システム下での経済評価を行った。ホルモン受容体陽性早期乳がん患者において、予後良好亜群を選別でき、また、最近の研究では化学療法の効果予測にも役立つ可能性が示唆されており、毒性の軽減につながることを期待される。推定増分費用効果比は、

N-1, Her2-で¥3,873,922/QALYであった。費用対効果に優れる可能性があつて、公的医療制度で同検査の提供が社会的に受け入れられる可能性もあることが示唆された。

結論

ホルモン受容体陽性 luminal-type 乳がんでは組織グレード、病期等に加えて、増殖指標 Ki67/ MIB1 labeling index (Ki67LI)、多遺伝子検査を組み合わせたアルゴリズムの最適化を行った。

術前ホルモン療法臨床試験の腫瘍組織材料を用いた検討から、術前ホルモン療法の効果予測、局所療法の予測に有用である可能性が示唆された。ひとつの検査、あるいはアルゴリズムが複数の臨床的エンドポイントの評価に有用であることも示された。

腋窩リンパ節転移陽性例における転移の状況を都立駒込病院の原発性乳がん 1,425 例のデータを用いて詳細に解析した。

数理モデルを用いた研究では、腋窩リンパ節転移の有無を予測するモデルおよび術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果予測モデルを高精度化した。術前抗 HER2+ 化学療法施行例における組織学的抗腫瘍効果別術後予後予測モデルに関する検討を行った。データを入力すれば予測結果を表示する web システムを構築、前向き臨床的検証的検討を行った。

microRNA (miRNA) のアロマトラーゼ阻害薬の作

用機序における関与に関する検討を行い、let-7f が *aromatase* を標的 mRNA とする可能性等新たな知見が見いだされた。

多遺伝子検査の医療経済学的効率性の検討では、70 遺伝子シグネチャー (MammaPrint®) の日本の保健システム下における評価を行った。ホルモン受容体陽性の早期乳がん患者を対象にするが、推定増分費用効果は腋窩リンパ節転移陰性、Her2 陰性症例で 3,873,922/QALY、費用対効果に優れる可能性があり、公的医療制度で同検査の提供が社会的に受け入れられる可能性もある。

一連の成果は原発性乳がん患者における治療成績の向上と毒性の軽減と QOL の改善に寄与し、また医療経済的負担の軽減にも貢献すると考えられた。

文献

- 1) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011; 378(9804):1707-16. Epub 2011 Oct 19.

- 2) Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;365:1273-83.
- 3) Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5:5-23. Epub 2010 Nov 24
- 4) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22:1736-47. Epub 2011 Jun 27.
- 5) Toi M, Saji S, Masuda N, Ohno S, Nakamura S, Nakayama T, Kashiwaba M, Kamigaki S, Kuroi K; Japan Breast Cancer Research Group-Translational Research Group. Ki67 index changes, pathological response and clinical benefits in primary breast cancer patients treated with 24 weeks of aromatase inhibition. *Cancer Sci.* 2011;102:858-65.
- 6) F. 健康危険情報なし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
1. Ueno T, Emi M, Sato H et al. Genome-wide copy number analysis in primary breast cancer. *Expert Opin Ther Targets. Suppl1:S31-5, 2012*
2. Chan MS, Wang L, Chanplakorn N. Effects of estrogen depletion on angiogenesis in estrogen-receptor-positive breast carcinoma--an immunohistochemical study of vasohibin-1 and CD31 with correlation to pathobiological response of the patients in neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. *Expert Opin Ther Targets. Suppl 1:S69-78, 2012*
3. Kondo M Hoshi SL, Ishiguro H et al. Economic evaluation of the 70-gene prognosis-signature (MammaPrint®) in hormone receptor-positive, lymph node-negative, human epidermal growth factor receptor type 2-negative early stage breast

- cancer in Japan. *Breast Cancer Res Treat* [Epub ahead of print] 2012"
4. Takada M, Saji S, Masuda N et al. Relationship between body mass index and preoperative treatment response to aromatase inhibitor exemestane in postmenopausal patients with primary breast cancer. *Breast* 21(1):40-5, 2012
 5. Ichikawa T Sato F, Terasawa K et al. Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One*7(2):e31422, 2012
 6. Han HS, Reis IM, Zhao W et al. Racial differences in acute toxicities of neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in patients with early-stage breast cancer. *Eur J Cancer* 47(17):2537-45, 2011
 7. Toi M, Winer EP, Inamoto T et al. Identifying gaps in the locoregional management of early breast cancer: highlights from the Kyoto Consensus Conference. *Ann Surg Oncol* 18(10):2885-92, 2011
 8. Qian N, Ueno T, Kawaguchi-Sakita N et al. Prognostic significance of tumor/stromal caveolin-1 expression in breast cancer patients. *Cancer Sci*102(8):1590-6, 2011
 9. Iwata H Sato N, Masuda N et al. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 41(7):867-75, 2011
 10. Kondo M, Hoshi SL, Yamanaka T et al. 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* 127(3):739-49, 2011
 11. Aogi K, Yoshida M, Sagara Y et al. The efficacy and safety of gemcitabine plus paclitaxel combination first-line therapy for Japanese patients with metastatic breast cancer including triple-negative phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 67(5):1007-15, 2011
 12. Chow LW Yip AY, Chu WP et al. 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 Biol125(1-2):112-9, 2011
13. Ki67 index changes, pathological response and clinical benefits in primary breast cancer patients treated with 24 weeks of aromatase inhibition. Toi M, Saji S, Masuda N et al. Cancer Sci102(4):858-65, 2011
5. 戸井雅和、乳がんにおける予防戦略、第9回日本予防医学会学術総会、2011年11月19日 東京
6. Masakazu Toi, How to optimize antiangiogenic therapy in human breast cancer INTERNATIONAL CONFERENCE IN MEMORY OF JUDAH FOLKMAN, 2012年1月14日 イタリア
7. 戸井雅和、乳癌治療におけるゲノム薬理学 Pharmacogenomic approach in breast cancer treatment、第45回制癌剤適応研究会、2012年3月2日 東京

2. 学会発表

1. Masakazu Toi Predictive Biomarkers for breast cancer treatment. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日 名古屋
2. 戸井雅和、がん薬物療法のバイオマーカー、乳癌第49回日本癌治療学会学術集会 2011年10月29日 名古屋
3. Masakazu Toi, Predictive Markers for the Treatment of Primary Breast Cancer. BIT'S 2nd Annual Congress of Biomarkers2011年11月9日、中国
4. Masakazu Toi, Biomarkers for clinical trial Global Cancer Genome Consortium- Tata Memorial Center Symposium on Translating Cancer Genomics to Medicine. 2011年11月12日 インド

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

表 1 : 21 遺伝子シグナチャーと臨床成績との相関 (JFMC 3 4 試験より)

Recurrence score: RS

1) RS と臨床効果

RS Group	Clinical Response
Low (< 18)	19/32 = 59.4%
Intermediate (18 - 30)	10/17 = 58.8%
High (≥ 31)	3/15 = 20.0%

p=0.015 for Comparison Between Low and High RS Groups (2-sided Fisher's exact test)

2) RS と乳房温存率

RS Group	BCS
Low (< 18)	29/32 = 90.6%
Intermediate (18 - 30)	13/17 = 76.5%
High (≥ 31)	7/15 = 46.7%

3) Logistic Regression 解析 (乳房温存)

Marker	Unadjusted		Adjusted for Tumor Size and PgR Allred Score	
	Odds Ratio (95% CI)	p-value	Odds Ratio (95% CI)	p-value
RS/50	0.055 (0.009, 0.323)	0.001	0.016 (<0.001, 0.259)	0.004
ER by RT-PCR	1.786 (1.150, 2.774)	0.001	1.881 (1.090, 3.245)	0.023
Ki-67 by IHC	0.957 (0.921, 0.994)	0.024	0.953 (0.907, 1.002)	0.060

Masuda N. et al. ASCO 2011

RS: Recurrence score

図1：原発性乳がんにおける治療法選択の手順、アルゴリズム

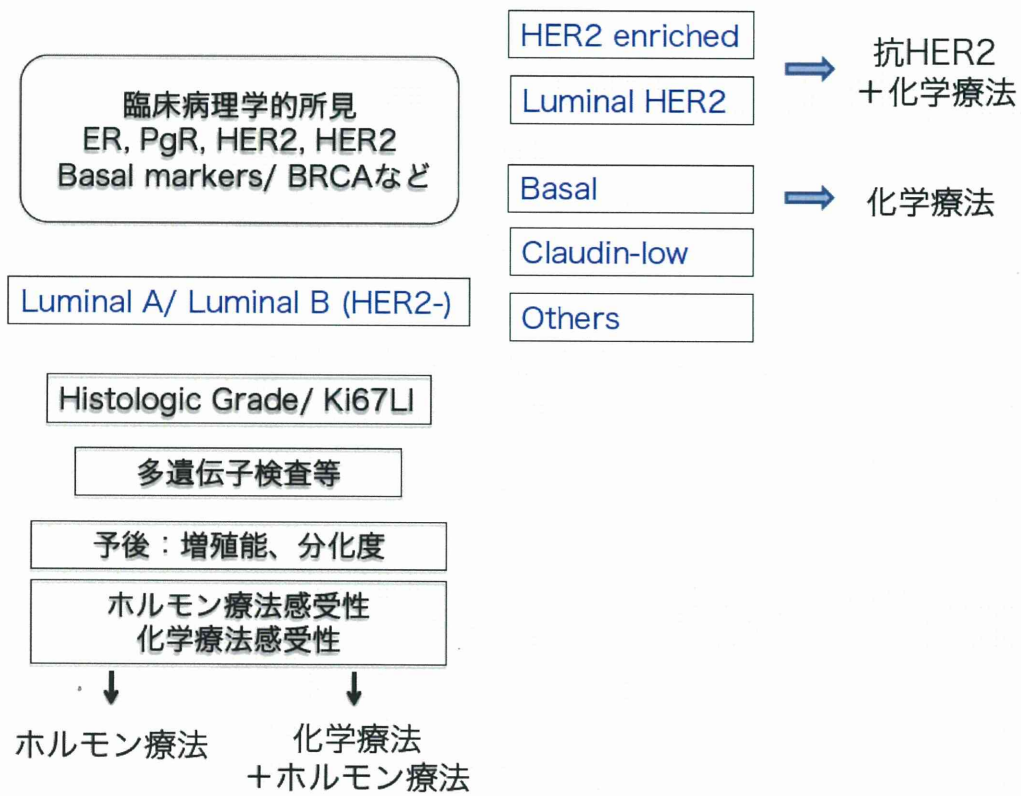
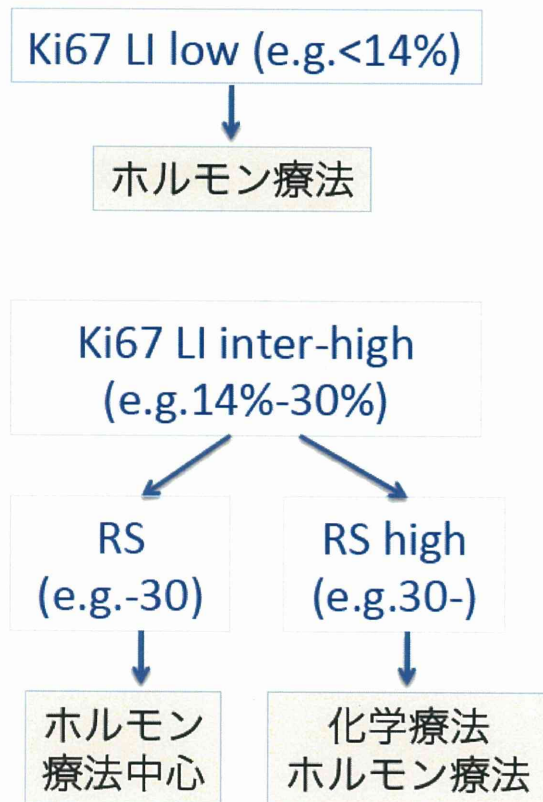


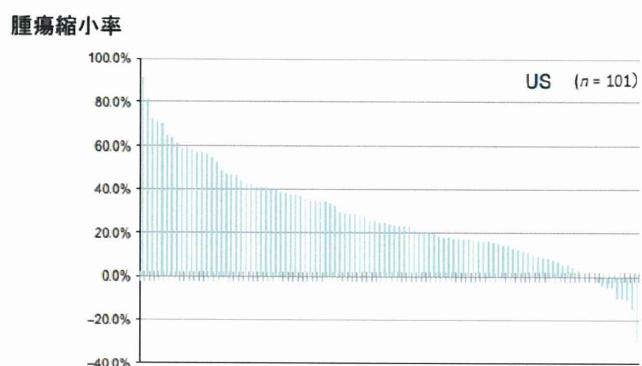
図2 : Ki-67 LI と RS を組み合わせによる luminal-type 乳がんの治療法選択



RS: Recurrence score

図3：ホルモン受容体陽性原発性乳がんに対する術前ホルモン療法の効果

アロマターゼ阻害薬



◇ ホルモン療法の効果予測

- ER/ PgR levels
- Histologic grade
- Ki67 LI
- 21 gene signature
- New markers

治療前に全乳房切

除が必要された症例59例中40例に術前治療後、温存手術を施行。

乳癌におけるアロマターゼ阻害剤投与によるマイクロ RNA の変動および let-7f による CYP19A1 遺伝子の制御に関する検討

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

アロマターゼ阻害剤(AI 剤)はエストロゲン受容体陽性閉経後乳癌に対する内分泌療法の第一選択薬としての地位を確立した。一方、AI 剤の作用機序は不明な点が多く、AI 剤が癌細胞にどのような分子学的影響を及ぼし、抗腫瘍作用を発揮するのかわかっていない。そこでわれわれは、近年、腫瘍の発生や進展との関連が明らかになってきている microRNA (miRNA) に着目し、AI 剤投与に伴う miRNA の発現変動について検討を行ってきた。

本研究では、第3世代 AI 剤(レトロゾール)投与前後の乳癌培養細胞株において、miRNA の網羅的解析として PCR アレイ解析を行い、AI 剤の投与が複数の癌関連 miRNA の発現を変動させることを示した。われわれは次に、複数の miRNA 標的遺伝子予測プログラムを用いて、変動した miRNA のうち既知の癌抑制因子である let-7f が *aromatase* 遺伝子を標的 mRNA としている可能性を明示した。また同時に let-7f の発現がレトロゾール投与により回復したことに着目した。

続いて行った実験では、リアルタイム PCR 法を用いて、乳癌細胞株及び乳癌凍結組織において、let-7f と *aromatase* mRNA の発現が逆相関していることを示した。さらに Laser capture microdissection / 定量的 PCR 法と免疫組織化学を組み合わせ、*aromatase* の免疫染色強度と let-7f の発現間にも有意な逆相関が見られることを初めて明らかにした。

Let-7f と *aromatase* の関係についてはルシフェラーゼアッセイを行い、*aromatase* 3'末端に実際の let-7f 結合配列が存在することを初めて明らかにした。続いて行った細胞増殖試験や細胞遊走能アッセイの結果では let-7f が乳癌培養細胞において強い細胞増殖抑制、細胞走化能抑制作用を発揮することが示された。

以上のことから、乳癌における腫瘍抑制 miRNA である let-7f は AI 剤によりその発現を回復し、*aromatase* 遺伝子を直接制御していることが明らかになった。AI 剤にはエストロゲン生成の最終律速酵素である *aromatase* を阻害することで全身および乳癌局所でのエストロゲン作用を低下させるという従来の作用に加えて、乳癌細胞での miRNA の発現を調節することによる第2の作用＝腫瘍抑制効果を有していると考えられる。今後、miRNA を介した AI 剤の抗腫瘍効果の臨床的意義および治療効果予測マーカーとしての miRNA の役割について、検討していきたい。

A. 研究目的

乳癌はエストロゲン依存性の悪性腫瘍であり、閉経後乳癌の約3分の2の症例がエストロゲン受容体(ER)を有している。閉経を迎えた女性では血中のエストロゲン濃度が著減するが、血中アンドロゲンが腫瘍局所でエストロゲンに変換されることにより、エストロゲン依存性乳癌の増殖を支えている。この変換を担う最終律速酵素が Cytochrome P450 Aromatase (CYP19A1) である。Aromatase 活性は閉経前女性の卵巣、妊娠中女性の胎盤や閉経後女性の末梢脂肪組織に見出され、正常乳腺組織、乳癌組織及び乳癌周囲間質にも発現していることが確認されている。

このようなエストロゲン依存性乳癌患者でエストロゲンの腫瘍促進作用を抑制するための内分泌/ホルモン療法の第一選択薬となったのが第3世代アロマターゼ阻害剤である。AI 剤は作用機序の違いにより2種類に分けることができる。1つはステロイド環を有し、非可逆性のステロイド系アンドロゲン類似

化合物(エキセメスタン)、もう1つは可逆性の非ステロイド系トリアゾール化合物(アナストロゾール、レトロゾールなど)である。この両者には *aromatase* 活性の阻害、およびエストロゲン合成抑制作用にほとんど違いは見られず、臨床的にもその違いは明らかではない。

一方、腫瘍の発生や進展に関わる新しい因子として近年 microRNA (以下 miRNA) が注目されている。miRNA は内在性に発現する22塩基程度の短い1本鎖RNAである。miRNA 自身は蛋白質をコードしないという点が特徴的である。miRNA は相補的な配列を有するターゲット mRNA の3'末端領域に”不完全”に結合することによって、一度に複数の遺伝子を抑制的に制御しつつ、そのバランスを調節している。その生物学的重要性から miRNA は種々の悪性腫瘍で検索され、乳癌に関与する miRNA も数多く報告されている。また、miRNA と薬剤感受性及び薬剤耐性の関与についても数多く報告されており、腫瘍の進展および治療効果に miRNA が密接に関与している可能性が示唆され

る。しかしながら本研究の対象である AI 剤と miRNA の関連については、報告は数少なく、AI 単剤投与による miRNA 発現誘導やその発現プロファイルの変動など明らかにされていない点が多い。そこで本研究では、本研究では、アロマターゼ阻害剤投与に伴うヒト乳癌 miRNA プロファイルの変動を検証することによりアロマターゼ阻害剤における miRNA の役割およびその臨床的意義を明らかにすることを目的とした。さらに変動した miRNA のうち let-7f に着目し、let-7f のターゲット mRNA の解明を行うことを目的として、以下の 4 項目に関する検討を行った。

共培養及びアロマターゼ阻害剤投与による aromatase mRNA の変動

乳癌細胞をヒト乳癌組織から採取した間質細胞と共に共培養し、AI 剤投与前後の aromatase mRNA の発現量を定量解析した。

アロマターゼ阻害剤投与による miRNA プロファイルの変動

乳癌組織及び乳癌培養細胞における AI 剤投与に伴う miRNA の発現変動を検討する目的で、AI 剤投与前後の miRNA 発現量を比較した。

miRNA のターゲット遺伝子の検索

miRNA のターゲット遺伝子を複数のターゲット予測プログラムを用いて検証した。さらに、AI 剤の抗腫瘍効果への関与をより明確にするために、癌抑制 miRNA に着目し、ターゲット遺伝子における実際の miRNA 結合配列を検証した。

乳癌細胞の増殖能、細胞走化能への関与

乳癌における癌抑制 miRNA の生物学的役割を検証する目的で、miRNA を乳癌細胞株にトランスフェクションし、細胞増殖及び細胞走化能への影響を検討した。

B. 研究方法

使用薬剤

第 3 世代非ステロイド系 AI 剤であるレトロゾール (ノバルティスファーマ) を使用した。

培養細胞株と共培養

乳癌細胞として ER α 陽性細胞 MCF-7 及びヒト乳癌組織から分離・培養された間質細胞 32N を使用した。MCF-7 は東北大学加齢医学研究所 細胞資源センターから入手した。間質細胞 32N は Yamaguchi らにより、ヒト乳癌組織から抽出した間質成分をプライマリーカルチャーによって確立した間質細胞株である。MCF-7 と 32N は RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) に牛胎児血清 10% (以下 FBS; ニチレイバイオサイエンス、東京) を添加した通常培地を用いて培養した。培養条件は、5% CO₂ 37°C とした。

MCF-7 と 32N それぞれのエストロゲンを枯渇させ

るため、デキストランコート・チャコール FBS 添加 RPMI 1640 に培地を交換し、5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した。6 穴細胞培養用プレートに MCF-7 を培養し、ThinCert (0.4 μ m pore; Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) をその上部に挿入して 32N を培養した。この共培養モデルでは、乳癌細胞と間質細胞を物理的にメンブレンで隔離し、メンブレンの細胞が移動することのできない 0.4 μ m の微細孔を通して、両細胞由来の液性因子 (サイトカイン等) のみの相互作用を観察することができる (共培養 MCF-7 を以下 MCF-7co とする)。共培養法を用いることにより、*in vitro* 実験系において *in vivo* の乳癌微小環境で観察される間質細胞と乳癌細胞の相補作用を再現することが可能となり、実際の乳癌組織同様、乳癌 MCF-7 に aromatase を誘導することができる。48 時間の共培養ののち、レトロゾール 10nM を添加した (以下 MCF-7co/le)。32N を含む ThinCert を取り外し、MCF-7, MCF-7co, MCF-7co/le から TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて total RNA を抽出した。

症例

Aromatase mRNA と miRNA の解析に用いた臨床検体は以下の通りである。

① 香港大学及び香港クイーン・メアリー病院 (Hong Kong) にて行われた臨床試験 Celecoxib Anti-Aromatase Neoadjuvant trial (CAAN trial) において、3 ヶ月間術前 AI 療法 (レトロゾール 2.5mg またはエキセメスタン 25mg、連日投与) を受け、治療前後の凍結乳癌組織が使用可能であった閉経後の ER 陽性 8 症例

② 東北大学病院乳腺内分泌外科で乳癌切除術を受け、凍結乳癌組織が使用可能であった術前療法未施行の閉経後 ER 陽性 11 症例

RNA 抽出前にそれぞれの乳癌組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、病理診断を行った。その後、凍結切片を tissue homogenizer を用いて細砕し、TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。

Laser capture microdissection (LCM) と miRNA 抽出

乳癌組織における癌細胞の miRNA プロファイルを作成するため、癌細胞のみをレーザーにて回収できる Laser capture microdissection 法 (以下、LCM) を行った。東北公済病院にて切除された乳癌 20 症例の 10%ホルマリン固定パラフィン切片 (formalin-fixed paraffin embedded tissues; FFPE) を、ミクロトーム (大和光機工業、朝霞市) で 8 μ m の厚さに薄切した。MMI CellCut (MMI Molecular Machines & Industries, Glattbrugg, Switzerland) を用いて LCM を行い、光学顕微鏡による観察の上、トルイジンブルー染色を行

った標本から癌細胞成分のみをレーザーで切り出した。切り出した癌細胞成分からの miRNA 抽出には PureLink miRNA Isolation Kit (Invitrogen)、cDNA 合成には RT² miRNA First Strand kit (Qiagen, Mannheim, Germany) を用いた。

Real-time PCR 解析 (mRNA) 解析

MCF-7 及び乳癌組織における aromatase mRNA の解析のため、total RNA は上記の手順で抽出した。cDNA の合成は QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) を用いて行った。Real-time PCR 解析には LightCycler System 及び FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた。解析に用いたプライマーは Aromatase (X13589) および Ribosomal protein L13A (RPL13A) (NM_012423) である。Aromatase 及びハウスキーピング遺伝子 (RPL13A) の発現量を定量するために、遺伝子濃度が既知のスタンダードを使用してスタンダード曲線を作製し、ターゲット遺伝子の相対量を定量した。mRNA レベルは RPL13A に対する相対量 (%) として算出し、比較・解析を行った。

RT² miRNA PCR assay

MCF-7co 及び MCF-7co/le における PCR アレイ解析は RT² miRNA PCR Array Human Cancer MAH-102A (Qiagen) を用いて行った。当アレイは癌の発生及び進展に密接に関連しているとされる 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 2 well ずつ含まれている。

MCF-7、凍結乳癌組織及び FFPE 組織における miRNA let-7f の定量には RT² miRNA PCR assay (Qiagen) を用い、内部コントロール遺伝子として U6 を使用した。Total RNA の抽出は上述の通りである。RT² miRNA First Strand Kit (MA-03, QIAGEN) を用いて cDNA の作製を行った。PCR は ABI7500 Real-Time PCR System (Applied systems, Foster city, CA) を用いて使用説明書に従って行った。データ解析はオンライン解析ソフトである miRNA PCR array system (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> ; QIAGEN) を使用した。

miRNA の標的遺伝子の予測

5 つのオンライン標的遺伝子予測プログラムを用いて、レトロゾール投与により変動した miRNA が標的とする遺伝子の予測を行った。

TargetScan 5.1 (<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (<http://www.microrna.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>), PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_notes.htm)

l) を用いた。

免疫組織化学

免疫組織化学には 10%ホルマリン固定パラフィン切片を用い、ヒストファインキット (ニチレイバイオサイエンス) を使用して行った。

抗aromatase抗体はマウスモノクローナル677抗体 (ノバルティス) を使用した。677抗体はnativeな aromataseを用いて作製された抗体であり、抗原に対する認識特異性が詳細に検討されている。Aromatase の免疫染色における一次抗体の希釈倍率は1/3000とした。ここでは抗原賦活化処理は行っていない。他に、マウスモノクローナル抗体である抗ER α (ER1D5; Immunotech, Marseille, France)、抗progesterone receptor (MAB429; Chemicon International, Temecula, CA)をそれぞれ用いた。これらの標本の抗原賦活化処理はクエン酸バッファー (2mmol/L クエン酸、9mmol クエン酸三ナトリウムpH6.0) 中においてオートクレーブ処理 (120度) 5分とした。一次抗体の希釈倍率はそれぞれ1/50, 1/50, 1/100とした。

抗原抗体複合体は、1mmol/L 3,3'-diaminobenzidine 溶液 (50mmol/L Tris-HCl pH7.6, 用時調整で 0.006% まで H₂O₂ を添加) にて染色し、ヘマトキシリンで核染色を施した。

Aromatase の評価方法は既出論文にしたがって、細胞質が染色された陽性細胞のおおよそのパーセンテージを proportion score (PS : 0, <1%; 1, - 25%; 2, - 50%; and 3, >50%)、染色強度を intensity score (IS: 0, なし; 1, 弱; 2, 中等度; and 3, 強) に分類した。Aromatase の染色性は PS+IS の total score (TS) として評価を行った。

ER、PgR は Allred score を用いて Proportion Score (PS; 0 から 5) と Intensity Score (IS; 0 から 3) の合計得点 Total Score (TS; 0 から 8) として計算し、ER score TS3 以上を ER 陽性乳癌として評価した。

Let-7f のトランスフェクション

Hsa-let-7f (Genolution Pharmaceuticals, Seoul, Korea) 5nM または 10nM を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) に PBS を加えて希釈し、室温で 10 分間インキュベートし、トランスフェクション混合液を作製した。ネガティブコントロールとして scramble siRNA (Genolution Pharmaceuticals) を使用した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

3'UTR ルシフェラーゼアッセイには pmirGLO Dual-Luciferase miR Target Expression Vector (Promega, Fitchburg, WI) を用いた。使用したプライマーの配列は次の通りである。

CYP19A1 Forward primers

F1

(5'-AAAGCTAGCCTAGAGAAGGCTGGTCAGTAC-3'