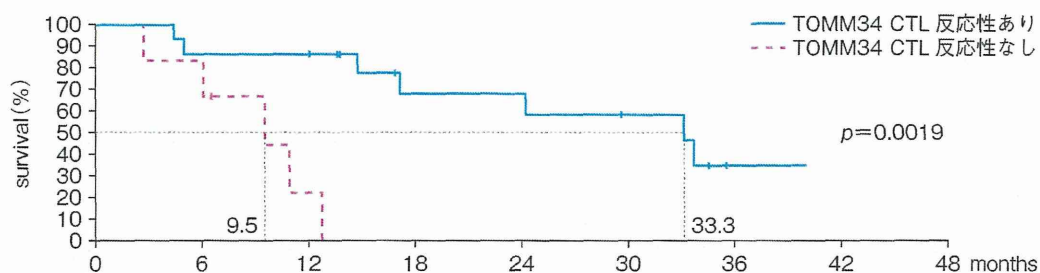
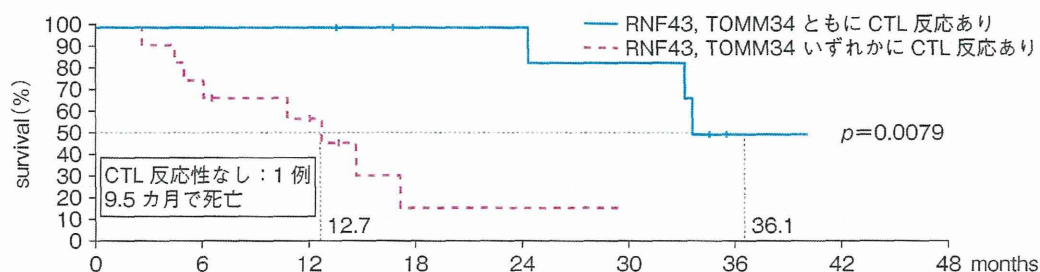


a: RNF43に対する反応性の有無と全生存期間



b: TOMM34に対する反応性と全生存期間



c: RNF43, TOMM34 ともに反応性がみられた群 (8例) とどちらか一方に反応性がみられた群 (12例), いずれにも反応性が得られなかった群 (1例) の全生存期間

図5 ペプチドワクチンの CTL 反応性と生存期間

始しているが、すでに肝、肺転移巣の縮小 (PR) を 4 例に、腫瘍マーカーの低下を 2 例に認め、ペプチドワクチンカクテルの手応えを感じている。ちなみに欧米では 13 種類の大腸癌関連ペプチドを組み合わせたペプチドカクテルによる第 I/II 相試験が実施されている (IMA-910: immatics biotechnologies)。まだ結果に関する報告はされていないが興味もたれる臨床研究である。

## 2) ヘルパーキラーハイブリッドペプチド、オーバーラッピングペプチドなどの試み

西村孝司教授 (北海道大学遺伝子制御研究所) らはキラー T 細胞のみでなくヘルパー T 細胞活性の増強をも目論んだハイブリッドペプチド (helper/killer hybrid epitope long peptide) の開発に取り組んでいる。in vivo で抗腫瘍効果を得るためにはヘルパー T

細胞の導入が必須であることは 1980 年代からマウスの実験系を中心に数多く報告されてきた<sup>17)</sup>。キラー T 細胞の増殖、分化にヘルパー T 細胞 (ことに Th1 型) 由来サイトカイン (IL-2, IFN- $\gamma$ ) が重要な役割を果たすことはいうまでもなく、このアプローチは理論的にも支持されるものと考えられる。このほかオーバーラッピングペプチド (overlapping peptides) を含めたロングペプチド (30~40-mer) の試みも欧米を中心に開始されており<sup>18)</sup>、今後の展開が大いに期待される。

## おわりに

大腸癌肝転移に特化した免疫療法として免疫化学肝動注療法を紹介した。切除不能肝転移巣の効率的な縮

小効果が認められるうえ、肝障害が少なく、肝切除を前提とした治療法として新たな展開が期待される。一方、がんペプチドワクチン療法は肝転移に限った治療ではなく、多臓器転移を有し、しかも標準的の化学療法に抵抗性となった患者を対象としている。極度進行状態で通常は免疫機能も低下しており、大きな期待のもてない状況であるにもかかわらず、多種ペプチドカクテルで objective response がみられ始めていることは注目に値する。近いうちにこれらの成績を明らかにしたうえで、治験に入る準備を進めたいと目論んでいる。

#### 文 献

- 1) 大腸癌研究会編：大腸癌治療ガイドライン（医師用2010年版），金原出版，東京，2010，p.20～21.
- 2) Okuno, K., Yasutomi, M., Kon, M., Hatakeyama, K., Muto, T., Kitajima, M., Koyanagi, Y., Hamano, K., Ohta, H., Aiba, K., Arai, Y., Sowa, M., Kikkawa, N., Takayasu, Y. and Isomoto, H. : Intrahepatic interleukin-2 with chemotherapy for unresectable liver metastases : A randomized multicenter trial. *Hepatogastroenterology*, 46 : 1116～1121, 1999.
- 3) Okuno, K., Kaneda, K. and Yasutomi, M. : Regional IL-2-based immunochemotherapy of colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology*, 46 : 1263～1267, 1999.
- 4) Okuno, K., Hirohata, T., Nakamura, K., Jinnai, H., Shigeoka, H., Koh, K., Shindo, K. and Yasutomi, M. : Hepatic arterial infusions of interleukin-2 (IL-2)-based immunochemotherapy in the treatment of unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Clin. Ther.*, 15 : 672～683, 1993.
- 5) Weiss, L., Grundmann, E., Torhorst, J., Hartveit, F., Moberg, I., Eder, M., Fenoglio-Preiser, C. M., Napier, J., Horne, C. H., Lopez, M. J., et al. : Hematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma : An analysis of 1541 necropsies. *J. Pathol.*, 150 : 195-203, 1986.
- 6) 荒井保明, 竹内義人 : 肝転移の治療方針 : 動注化学療法. *大腸癌 FRONTIER*, 1 : 286～291, 2008.
- 7) Arai, Y., Inaba, Y., Takeuchi, Y. and Ariyoshi, Y. : Intermittent hepatic arterial infusion of high-dose 5-FU on a weekly schedule for liver metastases from colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 40 : 526～530, 1997.
- 8) Morris-Stiff, G., Tan, Y. M. and Vauthey, J. N. : Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 34 : 609～614, 2008.
- 9) Boon, T. : Tumor antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes : Present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer*, 54 : 177～180, 1993.
- 10) Itoh, K. and Yamada, A. : Personalized peptide vaccines : A new therapeutic modality for cancer. *Cancer Sci.*, 97 : 970～976, 2006.
- 11) Correale, P., Cusi, M. G., Tsang, K. Y., Del Vecchio, M. T., Marsili, S., Placa, M. L., Intrivici, C., Aquino, A., Micheli, L., Nencini, C., Ferrari, F., Giorgi, G., Bonmassar, E. and Francini, G. : Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 8950～8958, 2005.
- 12) Hattori, T., Mine, T., Komatsu, N., Yamada, A., Itoh, K., Shiozaki, H. and Okuno, K. : Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with UFT and UZEL for metastatic colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 58 : 1845～1854, 2009.
- 13) Uchida, N., Tsunoda, T., Wada, T., Furukawa, Y., Nakamura, Y. and Tahara, H. : Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 10 : 8577～8586, 2004.
- 14) Shimokawa, T., Matsushima, S., Tsunoda, T., Tahara, H., Nakamura, Y. and Furukawa, Y. : Identification of TOMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *Int. J. Oncol.*, 29 : 381～386, 2006.
- 15) Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A. and Benson, A. B. 3rd. : Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200 : Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLF-FOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer : Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.*, 20 : 1539～1544, 2007.
- 16) Okuno, K., Sugiura, F., Hida, J., Tokoro, T., Ishimaru, E., Sukegawa, Y. and Ueda, K. : Phase I clinical trial of a novel peptide vaccine in combination with UFT/LV for metastatic colorectal cancer. *Exp. Ther. Med.*, 2 : 73～79, 2011.
- 17) DeVita, V. T. Jr., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. : *Biologic Therapy of Cancer*. JB Lippincott Company, New York, 1991, p. 197～213.
- 18) 奥野清隆 : 海外で臨床試験の進んでいるペプチドワクチン療法. *Mebio*, 27 : 43～48, 2010.

特

集

## 消化器がんにおけるがんワクチン療法

Gastrointestinal  
Research

# 大腸がんにおけるがんワクチン療法

奥野清隆\*

### Summary

cDNA 発現クローニング法や網羅的遺伝子発現解析法を用いて大腸がんを高発現する新規がん遺伝子がつぎつぎと発見され、その遺伝子にコードされるがん抗原がペプチドレベルで同定された。まさにがん特異的免疫療法の幕開けである。本稿では進行・再発大腸がんにおいてこれまでわが国で施行されたテラーメイド型ワクチンと大腸がん高発現型ワクチンの臨床結果を解説するとともに、現状の問題点、ならびに今後の展望について、筆者の経験をもとに考察する。

### Key words

テラーメイド型ペプチドワクチン 大腸がん高発現型ペプチドワクチン 進行・再発大腸がん

### はじめに

大腸がんはわが国において罹患、死亡数とも多く、とくに女性のがん死因の第1位であることから大腸がん治療はきわめて重要な課題である。手術療法、化学療法、放射線療法の進歩により、大腸がん全体の5年生存率は70%程度が得られているものの、Stage IVは依然20%以下であり、新たな集学的治療の開発が望まれる所以でもある。1991年T. Boonらによってはじめてヒトメラノーマにおける腫瘍抗原(melanoma antigen-encoding gene-1: MAGE-1)が同定された<sup>1)</sup>ことを嚆矢として、その後つぎつぎと新規がん抗原が多種類のがん腫に対して同定された。大腸がんもその例外ではなく、多くの大腸がん抗原が同定され、それら由来のがんペプチドワクチンの安

全性、臨床効果が欧米をはじめわが国でも盛んに検討されている。本稿では筆者の経験をもとに、わが国における大腸がんペプチドワクチン研究の現状と今後の展望について述べたい。

## 1 | がんペプチドワクチンによる免疫療法

### 1) テラーメイド型ワクチン

伊東恭悟教授(久留米大学免疫学)は、Boonらと同じcomplementary DNA (cDNA) 発現クローニング法を用いて(メラノーマではなく)わが国に患者の多い腺がんや扁平上皮がんが発現するがん関連抗原を数多く同定した。それらからわが国に多いhuman leukocyte antigen (HLA) タイプであるHLA-A24(日本人の約60%が該当)やHLA-A02(同じく約20%)に結合し、キラーT

\*OKUNO Kiyotaka/近畿大学医学部外科学

細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL, 細胞傷害性 T 細胞ともいう) を誘導できるペプチド (9-mer) を同定し, それらの臨床効果を検証しようと試みた. 多くの進行・再発がんに投与したが, ペプチド特異的な T 細胞反応がみられても多くはがんの進行を抑えられず, 臨床効果としては乏しいものであった. そこであらかじめ, 患者末梢血リンパ球を採取し, 伊東らが有する 40 種類程度のがんペプチドの免疫応答性をスクリーニングして, 応答性の高い 3~4 種を選定して患者に投与する個別化ワクチン (personalized vaccination)<sup>2)</sup>を考案した. 患者の免疫能にあわせたワクチン療法なのでテーラーメイド型ワクチンともよばれる. こうすればただちに強い免疫応答が得られ, 従来型ワクチンでの免疫誘導にかかるタイムラグがなくなる利点がある.

さらに伊東らは臨床効果増強のために化学療法との併用も検討した. 一般的に化学療法は免疫反応を抑制すると考えられ, 事実, 多くの化学療法薬は骨髄抑制作用を有し, 顆粒球減少, リンパ球減少をきたしやすいが, 用法, 用量によってはこのような有害事象がみられないことがある. さらに化学療法薬の併用によって, ①がん患者の担がん量が減少する, ②CTL の death signal に対する腫瘍抵抗性を低下させる (がん細胞が殺されやすくなる), ③担がん状態で出現する制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) を減少させる, という相乗的な効果も報告されている<sup>3)</sup>. したがって組み合わせる化学療法薬の種類, 投与方法を慎重に検討すれば, 化学療法併用は臨床効果の増強を期待できる. このような見地からわれわれは伊東教授らと共同研究で, 手術不能, 化学療法抵抗性の進行・再発大腸がん患者に対するホリナート・テガフル・ウラシル [UFT/LV (ロイコボリン<sup>®</sup>, ユーゼル<sup>®</sup>)] 経口抗がん剤とテーラーメイド型がんワクチン療法を検討した. UFT/LV は静注フルオロウラシル (5-FU)/LV との同等性が証明され, 広く世界で大腸がんの標準的薬療法と認め

られているが, 顆粒球減少, リンパ球減少の有害事象は少なく免疫療法との併用に適していると判断したからである. 登録された 14 例のうち, 臨床効果の評価がおこなえた 13 例では, 6 例が stable disease (SD) [うち 3 例が minor response (MR)], 7 例が progressive disease (PD) で, 無増悪生存期間 (progression-free survival: PFS) は 10.7 週 (範囲: 5.0-51 週) であったが, 3 年以上の長期生存がみられ, 興味あることに, ペプチドワクチン投与による抗原特異的 T 細胞反応や免疫グロブリン G (IgG) 反応の強い患者に長期生存期間が認められた<sup>4)</sup>.

## 2) 大腸がん高発現型ペプチドワクチン

中村祐輔教授 (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター) らは, cDNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的遺伝子解析をおこない, がん腫に特異的に高発現し, さらに細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子を多数同定した. それらから CTL の標的となるような HLA クラス I, これも前項で述べたように日本人に多く存在する HLA-A2402 に結合しうるペプチドを探索し, 新規がん抗原 (オンコアンチゲン) を同定した. 大腸がんを例にあげれば ring finger protein 43 (RNF43)<sup>5)</sup>, 34 kDa-translocase of the outer mitochondrial membrane (TOMM34)<sup>6)</sup> などであり, 中村らの解析では大腸がんサンプルならびに大腸がん細胞株の約 80~90% に発現がみられるが, 正常組織は精巣を除いてほとんど発現がないことが確認された. これらのはがん免疫療法の理想的な抗原であり, 誘導された CTL は大腸がん細胞を特異的に傷害するが正常組織は傷害しない (精巣では抗原は発現するがクラス I 抗原の発現がないため CTL の攻撃は免れる). われわれは中村らとの共同研究で, 標準療法抵抗性となった進行・再発大腸がんのうち HLA-A24 陽性患者を対象に, RNF43, TOMM34 の 2 種類のペプチドと経口抗がん剤 UFT/LV を

## 特集

### 消化器がんにおけるがんワクチン療法

併用するがんペプチド免疫化学療法をおこなった。施行された21例のうち、プロトコールの規定投与に達しなかった2例を除くとSD 16例、PD 3例であり、PFSの中央値は7.2ヵ月、全生存期間 (overall survival: OS) の中央値は24.4ヵ月という結果であった。第I相試験のシングルアームであるため評価はむずかしいが、ほとんどが通常の化学療法 (一次、二次) に抵抗性となった対象症例であることを考えれば、大規模な化学療法比較試験であるE3200試験<sup>7)</sup>のPFS中央値 (5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin (FOLFOX4): 4.5ヵ月 vs. FOLFOX4+ペバシズマブ: 7.5ヵ月)、OS中央値 (FOLFOX4: 10.8ヵ月 vs. FOLFOX4+ペバシズマブ: 13.0ヵ月) と比較して遜色のない成績と考えられる。さらに興味深いのは、この21例のうち、RNF43、TOMM34のCTL誘導能との関連であった。すなわちいずれの抗原に対しても、CTLが誘導された群ではそうでなかった群にくらべて、生存期間が延長する傾向があり、とくに双方にCTLが誘導された群はどちらか一方に誘導された群、あるいはまったくCTLが誘導されなかった群に比較して、有意に生存期間が延長していた<sup>8)</sup> (図1)。双方にCTLが誘導された群の平均生存期間は3年(36.1ヵ月)に達しており、今後さらに大規模な試験で検証する価値があると考えられた。われわれの施設では2種類の大腸がん関連ペプチドワクチンを用いたが、裕彰一ら(山口大学大学院医学研究科消化器・腫瘍外科学)は同様に進行再発大腸がん患者に上記のRNF43、TOMM34に加えてKOC1、さらに腫瘍新生血管を傷害するために血管内皮細胞受容体 [vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), VEGFR2] ペプチドを加えた5種類のペプチドカクテルとFOLFOXを併用する免疫化学療法をおこなったところ、17例に対してPR 10例、SD 7例、PDは0例という成績であったという (personal communication)。

## 2 | 今後の展望

### 1) 術後補助療法 (再発予防) への応用

がんペプチドワクチン療法の第I相試験では接種局所の皮膚発赤、硬結以外には強い有害事象もなく、すべて安全に投与できている。また臨床効果も症例数、観察期間は短いもののペプチド特異的CTL反応と生存期間には相関が認められた。しかし、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 基準を満たす病巣の縮小 (CR, PR) 例はほとんどみられず、最大の理由は過大な担がん量だと考えられた。現実的にはペプチドワクチンが最も威力を発揮できるのは再発予防と考えられ、現在Stage III大腸がんを対象に術後にペプチドワクチン+UFT/LVを投与するランダム化比較試験を開始している。HLA-key open という手法 (わが国ではHLA-A24が全人口の60%を占めるため、全例投与すれば60%が適合例、残り40%が非適合となり、理論的には6:4に自然に割り振られる) を用いてone armで、主要評価項目 (primary endpoint) は3年無再発生存率である。これまで16例に対して術後6クール (30週) 投与した (表1)。うち9例はすでに予定量を完遂して観察中である。いまだ再発例はなく、治療の継続、観察をつづけているが、feasibility studyとしては安全性、実行性に問題なく、今後はHLA-A24症例を対象に大規模なpivotal studyを計画している。

### 2) 多種ペプチドによるカクテルワクチンの試み

進行・再発大腸がんの治療において、2種類のペプチドワクチンでは効果が限られるとすれば当然、より多くの組み合わせ (ペプチドカクテル) による効果が期待される。われわれはこれまで用いてきたRNF43、TOMM34の2種に加えて、新たに中村研で開発された新規大腸がんペプチド [forkhead box M1 (FOXM1), maternal embry-

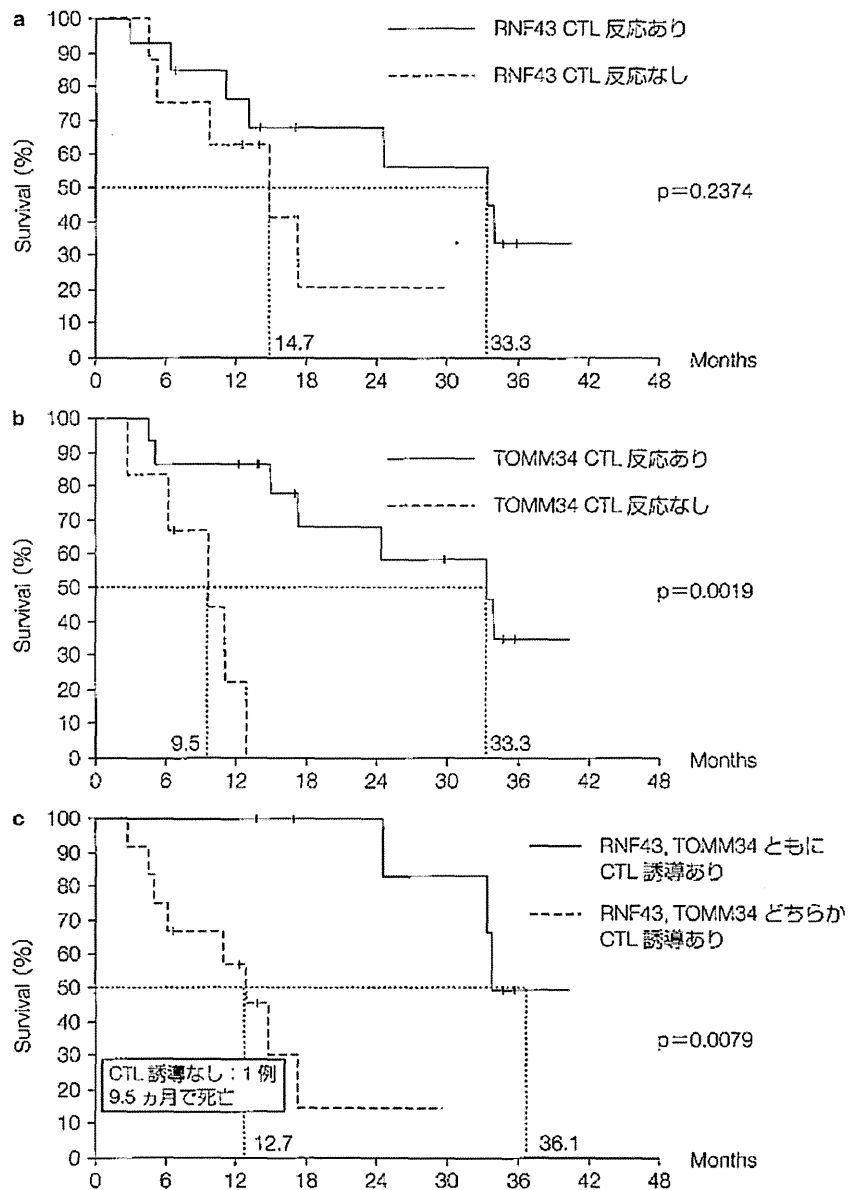


図 1. ペプチドワクチンの CTL 反応性と OS

再発大腸がん 21 例のうち RNF43, TOMM34 ともに CTL 反応あり (8 例), RNF43 のみ CTL 反応あり (5 例), TOMM34 のみ CTL 反応あり (7 例), いずれにも CTL 反応なし (1 例).

a : RNF43 に対する CTL 反応性と OS

b : TOMM34 に対する CTL 反応性と OS

c : RNF43, TOMM34 に対する CTL 反応性と OS

(Okuno K *et al.*, 2011<sup>9)</sup> より一部改変引用)



表 1. Stage III大腸がん術後のがんペプチドワクチン+UFT/LVによるアジュバント療法

Pt. No.	Gender	Age	Location	Stage	PS	Vac	Rec	RFS	Skin reaction	Institute
1	F	71	RS	IIIa	0	30	—	18 M	G1	Kinki Univ
2	F	76	A	IIIb	1	30	—	18 M	G1	Kinki Univ
3	F	69	A	IIIa	0	30	—	18 M	G1	Kinki Univ
4	F	58	S	IIIa	0	30	—	18 M	—	Kinki Univ
5	F	60	T	IIIb	0	30	—	18 M	G1	Kinki Univ
6	M	61	A	IIIa	0	30	—	12 M	G1	Kinki Univ
7	M	64	Rb	IIIa	0	30	—	17 M	G1	Kinki Univ
8	F	73	S	IIIa	0	30	—	7 M	G1	Kinki Univ
9	F	58	Ra	IIIa	0	30	—	8 M	G1	Kinki Univ
10	F	47	Ra	IIIa	0	28	—	3 M	G1	Kinki Univ
11	M	62	Rb	IIIb	0	24	—	4 M	G1	Kinki Univ
12	M	74	S	IIIa	0	19	—	4 M	G1	Kinki Univ
13	F	37	S	IIIa	0	20	—	5 M	G1	Yamaguchi Univ
14	F	70	S	IIIa	0	11	—	—	G1	Kinki Univ
15	M	67	A	IIIa	0	3	—	—	—	Kinki Univ
16	M	64	Ra	IIIb	0	5	—	—	—	Kinki Univ

これまで Stage III大腸がん術後 16 例に施行された。うち 9 例は重篤な有害事象もなく、安全に予定 5 コース (30 回ワクチン投与) を完遂した。まだ最長観察期間が 18 カ月であるが再発例はない。Vac : vaccination, Rec : recurrence, RFS : recurrence free survival (無再発生存期間), G1 : grade I

onic leucine zipper kinase (MELK), Holliday junction recognition protein (HJURP)] 3 種とさらに血管内皮細胞受容体 (VEGFR1, VEGFR2) ペプチド 2 種を組み合わせた、7 種類のカクテルペプチドによるワクチン治療を開始した。現状では最強の大腸がん治療ペプチドワクチンと考えられ、標準療法抵抗性の再発大腸がんに対する臨床効果を期待している。ちなみに欧米では、13 種類の大腸がん関連ペプチドを組み合わせたペプチドカクテルによる第 I/II 相試験が実施されている (IMA-910 : iminatics biotechnologies)。まだ結果に関する報告はされていないが、興味のもたれる臨床研究である。

### 3) ヘルパーキラーハイブリッドペプチド、オーバーラッピングペプチドなどの試み

西村孝司教授 (北海道大学遺伝子病制御研究所) らは、CTL のみでなくヘルパー T (Th) 細胞活性

の増強をも目論んだハイブリッドペプチド (helper/killer hybrid epitope long peptide) の開発に取り組んでいる。In vivo で抗腫瘍効果を得るためには Th 細胞の導入が必須であることは、1980 年代からマウスの実験系を中心に数多く報告されてきた<sup>9)</sup>。CTL の増殖、分化に Th 細胞 (とくに Th1 型) 由来サイトカイン [インターロイキン (IL)-2, インターフェロン (IFN)- $\gamma$ ] が重要な役割を果たすことはいままでもなく、このアプローチは理論的にも支持されるものと考えられる。このほか、オーバーラッピングペプチド (overlapping peptides) を含めたロングペプチド (30~40-mer) の試みも欧米を中心に開始されており<sup>10)</sup>、今後の展開が大いに期待される。

### おわりに

がんペプチドワクチン療法の臨床研究はまだ端緒についたばかりで、科学的評価ができるほど充

分な症例数, 比較試験がなされているわけではない. その見地からは本法を評価するのは時期尚早であるが, 大腸がんを例にとっても本稿のように興味深い結果が得られつつある. 近い将来, がんペプチドワクチンの科学的評価がなされて, 臨床現場に新規治療薬として登場することを信じて執筆する.

#### 文 献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P *et al* : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 : 1643-1647, 1991
- 2) Itoh K, Yamada A : Personalized peptide vaccines : a new therapeutic modality for cancer. *Cancer Sci* 97 : 970-976, 2006
- 3) Correale P, Del Vecchio MT, Genova GD *et al* : Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J Clin Oncol* 23 : 8950-8958, 2005
- 4) Hattori T, Mine T, Komatsu N *et al* : Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with UFT and UZEL for metastatic colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 58 : 1843-1852, 2009
- 5) Uchida N, Tsunoda T, Wada T *et al* : Ring Finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10 : 8577-8586, 2004
- 6) Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T *et al* : Identification of TOMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *Int J Oncol* 29 : 381-386, 2006
- 7) Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ *et al* : Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer : results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 20 : 1539-1544, 2007
- 8) Okuno K, Sugiura F, Hida J *et al* : Phase I clinical trial of a novel peptide vaccine in combination with UFT/LV for metastatic colorectal cancer. *Exp Ther Med* 2 : 73-79, 2011
- 9) Yang JC, Rosenberg SA : Adoptive cellular therapy : Pre-clinical studies. In : *Biologic Therapy of Cancer*, ed. by DeVita VT *et al*, JB Lippincot Co., Philadelphia, 1991, pp. 197-213,
- 10) 奥野清隆 : 海外で臨床試験の進んでいるペプチドワクチン療法. *Mebio* 27 : 43-48, 2010



日本臨牀 70 卷 増刊号 7 (2012 年 9 月 20 日発行) 別刷

# 乳癌(第 2 版)

—基礎と臨床の最新研究動向—

I. 乳癌の診断・治療の変遷と展望

内分泌療法の変遷と展望

山下啓子

遠山竜也

岩瀬弘敬

小林俊三

## I 乳癌の診断・治療の変遷と展望

## 内分泌療法の変遷と展望

Change and perspective in endocrine therapy

山下啓子<sup>1</sup> 遠山竜也<sup>2</sup> 岩瀬弘敬<sup>3</sup> 小林俊三<sup>4</sup>

Key words : 乳癌, 内分泌療法, エストロゲンレセプター

## はじめに

乳癌の遺伝子発現プロファイル解析によるとエストロゲンレセプター(estrogen receptor: ER)陽性乳癌とER陰性乳癌ではプロファイルが大きく異なり, 発生・進展のメカニズムが異なると考えられている<sup>1)</sup>. 乳癌のエストロゲン依存性は乳癌細胞でホルモンレセプター(ERとプロゲステロンレセプター(progesterone receptor: PgR))の少なくともどちらかが発現していることを前提とする. ER陽性乳癌は日本人女性においては全乳癌の約8割を占め<sup>2)</sup>, エストロゲンがERに結合することによりエストロゲン依存性増殖・進展が促進される. 乳癌の内分泌療法(ホルモン療法)はERを標的とする分子標的治療であり, 1896年のBeatsonによる卵巣摘出術以来115年の歴史をもつ. 内分泌療法はホルモンレセプター陽性症例に対して①卵巣や末梢組織でのエストロゲン産生を抑制する, または②ホルモンレセプターの機能を修飾することにより乳癌細胞へのエストロゲンの作用を阻害する, を基本概念としている. なお, 本稿で用いているERは記載がない場合はすべてエストロゲンレセプターアルファ(estrogen receptor  $\alpha$ : ER $\alpha$ )である.

## 1 乳癌組織におけるホルモンレセプター(ER/PgR)の発現

ER陽性乳癌は現在, 正常乳腺の分化の最終段階である分化した乳管上皮細胞から発生すると考えられている<sup>1)</sup>. 乳癌のエストロゲン依存性は, 乳癌細胞がホルモンレセプター(ER/PgR)を発現していることを前提とする. エストロゲンがその受容体であるERに結合することにより乳癌の増殖・進展が促進され, また, PgRはエストロゲンによりERを介して誘導されるERの標的遺伝子の一つである.

乳癌組織におけるホルモンレセプターの発現は現在, 免疫組織化学法で評価している. ERの発現を正常乳腺および前癌病変で検討した報告によると, 閉経前の正常乳管上皮細胞は約30%がER陽性細胞である<sup>3)</sup>. 一方, atypical ductal hyperplasiaなどの前癌病変ではほぼすべての上皮細胞がER強陽性を示す. low gradeの非浸潤性乳管癌(ductal carcinoma *in situ*: DCIS)ではほぼすべての癌細胞がER強陽性を示すが, high gradeのDCISではほぼすべての癌細胞がER陰性である. 浸潤性乳癌におけるホルモンレセプターの発現量(陽性細胞率)は症例により様々な分布を示し0%から100%まで

<sup>1</sup>Hiroko Yamashita: Breast and Endocrine Surgery, Hokkaido University Hospital 北海道大学病院 乳腺・内分泌外科 <sup>2</sup>Tatsuya Toyama: Breast and Endocrine Surgery, Nagoya City University Hospital 名古屋市立大学病院 乳腺内分泌外科 <sup>3</sup>Hiroataka Iwase: Department of Breast and Endocrine Surgery, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University 熊本大学大学院生命科学研究部 乳腺・内分泌外科学分野 <sup>4</sup>Shunzo Kobayashi: Nagoya Municipal Hospital 名古屋市病院局

連続的に存在する。

乳癌組織におけるホルモンレセプターの陽性/陰性の判定方法は、陽性細胞率を評価する方法、および陽性細胞率と染色強度をスコア化して評価する Allred score や H score が広く用いられている。日本乳癌学会の班研究‘適切なホルモンレセプター検索に関する研究’ (梅村班) では、陽性細胞率 10% 以上を陽性、10% 未満を境界域、陽性細胞率 0 を陰性とする J-score を提唱した。また 2010 年、米国臨床腫瘍学会と臨床病理医協会 (ASCO/CAP) から、ホルモンレセプター陽性と判定するカットオフを 1% とすることが提唱された<sup>4)</sup>。癌細胞の核に少なくとも 1% の染色陽性細胞がある場合、ER/PgR 陽性と判定することを推奨している。

ER 陽性乳癌において ER の陽性細胞率は 1% から 100% まで存在するが、乳癌組織の ER の発現量と予後について Allred らは術後内分泌療法を行った症例の予後を解析し ER の発現量が高いほど予後良好であることを報告した<sup>5)</sup>。最近の閉経後乳癌の術後内分泌療法の臨床試験の報告においても、アロマターゼ阻害剤、タモキシフェンともに ER/PgR の発現量が高いほど予後良好であることが示されている。著者らは内分泌療法を施行した再発乳癌における乳癌組織の ER/PgR の発現量と内分泌療法の効果、予後について検討し、ER/PgR の発現量は内分泌療法有効例で有意に高く、ER/PgR の陽性細胞率 1% 以上の症例が有意に再発後の予後が良好であることを報告した<sup>6)</sup>。また手術を行っていない進行乳癌において乳癌組織の ER の発現量とアロマターゼ阻害剤による内分泌療法の奏効期間を検討し、ER の陽性細胞率 2/3 以上の症例は一次内分泌療法の奏効期間、化学療法に至るまでの期間ともに有意に長いことを報告した<sup>7)</sup>。このように乳癌組織の ER の発現量は内分泌療法の奏効性や予後などの生物学的特性に関与することが明らかとなっている。

## 2 乳癌組織におけるエストロゲンレセプターの発現調節

乳癌組織における ER の発現調節に関しては、ER 遺伝子のメチル化や ER 遺伝子の変異などの報告があるが臨床的に重要な知見は見いだされていない。2007 年マイクロ RNA (microRNA) による ER の発現調節に関する基礎研究が報告された<sup>8)</sup>。microRNA は 20-25 塩基からなる内因性の一本鎖 RNA で、標的メッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 末端非翻訳領域 (3' UTR) に結合して mRNA を分解あるいはタンパクへの翻訳を抑制することにより、標的遺伝子の発現を抑制する。Adams らは乳癌細胞を用いて microRNA の一つ miR-206 が ER の mRNA 3' UTR に結合して、ER の mRNA とタンパク発現を抑制することを報告した<sup>9)</sup>。著者らは乳癌組織における miR-206 の発現を定量的 RT-PCR 法により検討し、ER の mRNA、タンパク発現量が高いほど miR-206 の発現が低いことを見いだした<sup>9)</sup>。更に著者らは ER の mRNA に結合すると報告されている 7 つの microRNA の乳癌組織における発現を検討し、ER のタンパク発現量や予後と関連する microRNA を見いだした<sup>10)</sup>。

## 3 乳癌のエストロゲン依存性と内分泌療法

内分泌療法はホルモンレセプター陽性症例に対して、①卵巣や末梢組織でのエストロゲンの産生を抑制する、または②ホルモンレセプターの機能を修飾することにより乳癌細胞へのエストロゲンの作用を阻害することを基本概念とする、ER を標的とした分子標的治療である。そのため重篤な副作用の頻度が低く、ホルモンレセプター陽性症例では非常に有効率が高い。ホルモンレセプター陽性症例においては、再発予防目的の術後薬物療法および進行再発乳癌に対する治療ともに第 1 選択として行われる。

### 1) 内分泌療法の変遷

乳癌の内分泌療法は 1896 年に Beatson により行われた卵巣摘出術に始まる。ついで 1951

表1 エストロゲンレセプターの局在と SERM, SERD の組織特異性

	SERM		SERD	理想的な SERM
	タモキシフェン (ノルバデックス <sup>®</sup> )	ラロキシフェン (エビスタ <sup>®</sup> )	フルベストラント (フェソロデックス <sup>®</sup> )	
骨	E	E	AE	E
心血管系	E	E	AE	E
肝(脂質代謝)	E	E	AE	E
乳腺	AE	AE	AE	AE
子宮内膜	E	AE	AE	AE
膣	AE	AE	AE	E
中枢神経系 (視床下部-下垂体)	AE	AE	不明	E
中枢神経系(海馬)	E	E	不明	E

E: エストロゲン作用, AE: 抗エストロゲン作用.

年に副腎摘出術, 1952年に下垂体摘出術と続き, 外科的処置による女性ホルモン量の抑制が行われた. 1960年代に開発の始まったタモキシフェンが内分泌療法の位置づけを確立した. その後ERの存在と内分泌療法の奏効性との関係が明らかとなり, ER(ER $\alpha$ , ER $\beta$ )のクローニングから内分泌療法の作用機序が分子生物学的に解明された. 更に末梢組織でのエストロゲン産生に関する intracrinology の概念がアロマターゼ阻害剤の開発に繋がった.

## 2) エストロゲンの作用機序

内分泌療法の作用・副作用を理解するうえでエストロゲンの作用機序の理解が必要である. エストロゲンは乳腺以外にも子宮, 骨, 肝(脂質代謝), 心血管系, 中枢神経系などで重要な役割を果たし幅広い生理作用をもつ(表1). エストロゲンの作用はエストロゲンの標的臓器(細胞)に存在するER(ER $\alpha$ , ER $\beta$ )を介して発揮される. ERは主に核内に存在し, エストラジオールがERに結合すると, ERは二量体となり標的遺伝子のプロモーター領域のエストロゲン応答配列(estrogen response element: ERE)に結合して標的遺伝子の転写を活性化する. ERは転写因子であり, この作用は genomic action と呼ばれる. ERの転写調節には転写共役因子(転写活性化因子, 転写抑制因子)の関与も重要である.

## 3) SERM(選択的エストロゲンレセプター機能調節物質: selective estrogen receptor modulator)

SERMはエストロゲンがERに結合する部位(ERのligand binding domain)と同じ部位に結合してエストロゲンがERに結合するのを競合阻害する薬剤であり, ERが存在するエストロゲンの標的臓器によりエストロゲン作用と抗エストロゲン作用を種々の割合・程度で発現する(表1). これまでタモキシフェン, トレミフェン, ラロキシフェンが乳癌の治療や予防薬, 骨粗鬆症の治療薬として開発されている. なおSERMとはエストロゲンの作用機序, 特にERの解析の進歩に伴い導入された言葉で, 以前は抗エストロゲン剤と総称されていた.

最近, タモキシフェンを活性体のエンドキシフェンに変換する酵素CYP2D6の遺伝子多型がタモキシフェンの効果に関与することが指摘されている. CYP2D6は幾つかの遺伝子多型が存在するが, \*4ホモタイプは血漿中のエンドキシフェン濃度が低くタモキシフェンの効果が期待できない可能性が報告されている. \*4ホモタイプは欧米人の5-10%にみられるがアジア人では1%未満である. 一方, \*10ホモタイプはアジア人に多くみられCYP2D6の活性がやや低下する. 著者らは術後タモキシフェンを単独投与したリンパ節転移陰性乳癌の予後を検討し, CYP2D6\*10遺伝子多型は disease-free survival

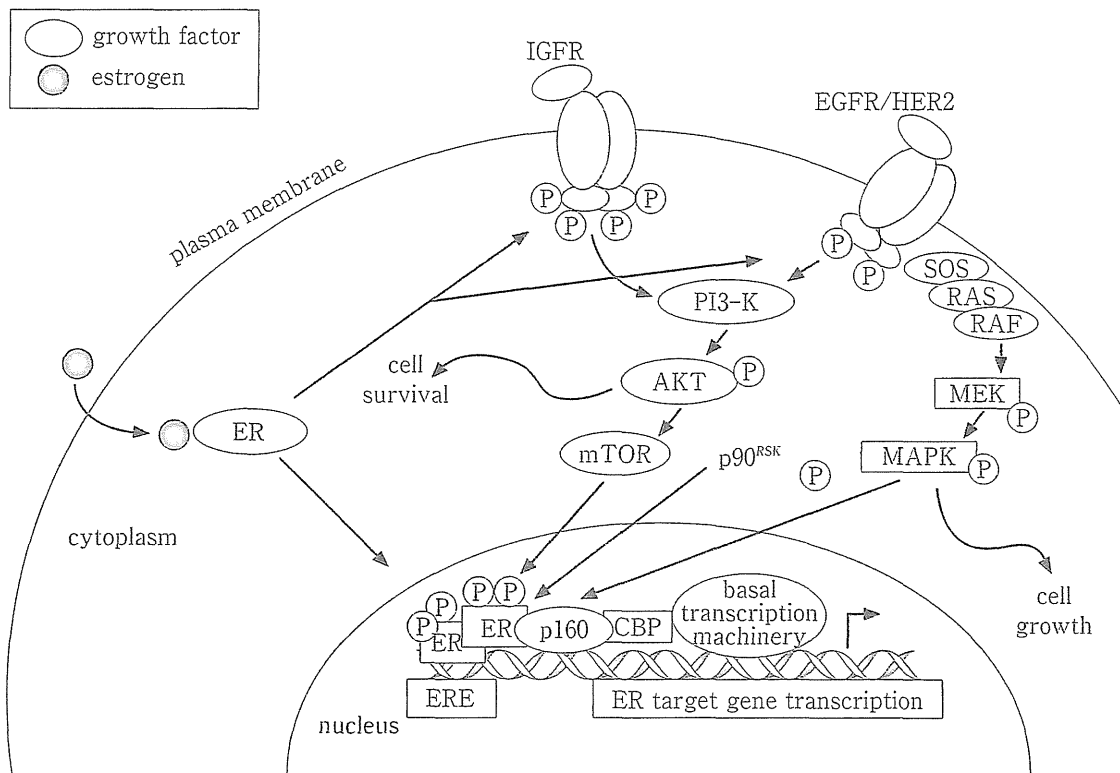


図1 エストロゲンレセプター(ER)と膜型増殖因子受容体のシグナルとのクロストーク (文献<sup>14)</sup>より引用)

に影響しないことを報告した<sup>11)</sup>。

4) SERD(選択的エストロゲンレセプター機能抑制物質: selective estrogen receptor downregulator)

SERDはERに結合するがSERMと異なりエストロゲン作用をもたないpure antiestrogenである。SERDはERを分解させ、エストロゲンがERに結合するのを競合阻害し、ERの二量体化を阻害する。これらERに対する作用によりERが標的遺伝子のEREに結合できず、ERタンパクの発現低下もきたす<sup>12)</sup>。これまで唯一フルベストラントが開発され使用されている。日本でもフルベストラント500mg/4週投与がER陽性閉経後進行再発乳癌の二次以降の内分泌療法剤として2011年9月に承認された。

5) エストロゲン産生の抑制

閉経前ER陽性乳癌に対する卵巣機能抑制(LHRHアナログ)と、閉経後女性に適応のアロマターゼ阻害剤が開発されている。血中エストロゲン濃度の低下をきたすため標的臓器に対し

てエストロゲン作用が発揮できず、これが正常組織においては副作用として発現する。特に、長期のエストロゲン低下による骨粗鬆症および虚血性心疾患に対する影響が指摘されている。

アロマターゼ阻害剤の主な副作用として関節痛や筋肉痛が発現し、重篤な場合は投与が継続できない症例も存在する。血中エストロゲン低下による筋骨格系の副作用のメカニズムについて、アロマターゼ阻害剤の臨床試験(MA.27)の症例を用いたgenome-wide association studyにより関連する遺伝子多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が同定された<sup>13)</sup>。同定されたSNPはT-cell leukemia 1A(TCL1A)遺伝子のプロモーター領域に存在し、このSNPによりERE(ERの結合部位)が生じる。筋骨格系症状が強く出た人はエストロゲンがERに結合することによりTCL1A遺伝子が発現し、炎症性サイトカインであるIL17の発現に関与することが報告された。このようなメカニズムの解明により今後、筋骨格系の副作用に対する対策がと

れるようになると思われる。

#### 4 内分泌療法抵抗性

内分泌療法抵抗性のメカニズムとしては、乳癌細胞でERの発現がメチル化などにより陰性化する場合も存在するが、ERが発現しているにもかかわらず抵抗性を示す場合が多いと考えられている。その原因として特にERのシグナルと膜型増殖因子受容体(IGFR, EGFR, HER2など)の細胞内シグナル伝達のクロストークが指摘されている(図1)<sup>14)</sup>。膜型増殖因子受容体からのシグナルがERのリン酸化、そして転写を亢進させる場合が主な機序で、エストロゲンの存在下(細胞質のERを介した膜型増殖因子受容体とのクロストーク)、非存在下いずれにおいても生じうる。タモキシフェンやアロマターゼ阻害剤抵抗性のメカニズムの一つとして説明され、抵抗性克服のために膜型増殖因子受容体の下流の細胞内シグナル分子である phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) の経路を中心としたシグナル伝達阻害剤の開発が進められている。最近mTOR阻害剤である everolimus をス

テロイド系アロマターゼ阻害剤と併用することにより、非ステロイド系アロマターゼ阻害剤耐性進行再発乳癌において有意に progression-free survival が延長することが報告された<sup>15)</sup>。

#### おわりに

ER陽性乳癌と内分泌療法について最近の知見を概説した。術後薬物療法でのタモキシフェン5年投与は約5割の再発抑制効果を示し、世界で50万人以上の乳癌患者の生命を救ったと見積もられている。ER陽性乳癌の予後はこの30年間で明らかに改善した<sup>2)</sup>。これは再発予防目的として行う術後内分泌療法を中心とした薬物療法の進歩によるものである。しかしながら、特に腋窩リンパ節転移陽性症例は術後5年以降の再発リスクも高く、いかに予後を改善するかが課題の一つである。そのために、より長期の内分泌療法や適切な内分泌療法剤の選択のほか、現在行っている内分泌療法や化学療法とは作用機序の異なる新たな薬物療法の開発が必要であると考えられている。その候補として、mTOR阻害剤のほか、ビスホスホネートやRANKL阻害剤が注目されている。

#### 文献

- 1) Prat A, Perou CM: Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 15: 842-844, 2009.
- 2) Yamashita H, et al: Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann Oncol* 22: 1318-1325, 2011.
- 3) Allred DC, et al: The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res* 6: 240-245, 2004.
- 4) Hammond ME, et al: 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.
- 5) Harvey JM, et al: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1474-1481, 1999.
- 6) Yamashita H, et al: Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 13: 74-83, 2006.
- 7) Endo Y, et al: High estrogen receptor expression and low Ki67 expression are associated with improved time to progression during first-line endocrine therapy with aromatase inhibitors in breast cancer. *Int J Clin Oncol* 16: 512-518, 2011.
- 8) Adams BD, et al: The micro-ribonucleic acid(miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha(ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol* 21: 1132-1147, 2007.
- 9) Kondo N, et al: miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human

- breast cancer. *Cancer Res* **68**: 5004–5008, 2008.
- 10) Yoshimoto N, et al: Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **130**: 331–339, 2011.
  - 11) Toyama T, et al: No association between CYP2D6\*10 genotype and survival of node–negative Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. *Jpn J Clin Oncol* **39**: 651–656, 2009.
  - 12) Osborne CK, et al: Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* **90**(Suppl 1): S2–S6, 2004.
  - 13) Ingle JN, et al: Genome–wide associations and functional genomic studies of musculoskeletal adverse events in women receiving aromatase inhibitors. *J Clin Oncol* **28**: 4674–4682, 2010.
  - 14) Johnston SR: New strategies in estrogen receptor–positive breast cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 1979–1987, 2010.
  - 15) Baselga J, et al: Everolimus in postmenopausal hormone–receptor–positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* **366**(6): 520–529, 2012.





# エストロゲンレセプター陽性乳癌における microRNAの役割に関する研究

北海道大学病院乳腺・内分泌外科, 名古屋市立大学病院乳腺内分泌外科\*

山下 啓子 遠山 竜也\* 吉本 信保\* 遠藤 友美\*

## エストロゲンレセプター陽性乳癌における microRNAの役割に関する研究

北海道大学病院乳腺・内分泌外科, 名古屋市立大学病院乳腺内分泌外科\*  
山下 啓子 遠山 竜也\* 吉本 信保\* 遠藤 友美\*

### *Role of microRNAs in estrogen receptor-positive breast cancer*

Breast and Endocrine Surgery, Hokkaido University Hospital,  
Breast and Endocrine Surgery, Nagoya City University Hospital\*

Hiroko Yamashita, Tatsuya Toyama\*, Nobuyasu Yoshimoto\* and Yumi Endo\*

乳癌組織のエストロゲンレセプター (ER; estrogen receptor) の発現量は内分泌療法や化学療法の奏効性や予後などの生物学的特性に関与する。乳癌組織のERの発現調節に関しては, ER遺伝子のメチル化やER蛋白のユビキチン化による分解などの報告があるが, 臨床的に重要であるものは未だ見出されていない。最近, ERのmRNA 3'末端非翻訳領域に結合してERのmRNAと蛋白発現を抑制するマイクロRNA (microRNA) が報告された。われわれは乳癌組織におけるこれらERのmRNAに直接結合するmicroRNAの発現を定量的RT-PCR法により検討して, ERの蛋白発現や予後に関与するmicroRNAを見出した。さらに最近, ER陽性乳癌の生物学的特性に関与すると考えられるmicroRNAとその標的遺伝子を同定し, これらが治療標的あるいは薬物療法の感受性のバイオマーカーとして有用であると推測している。

**Key words:** 乳癌 (breast cancer), エストロゲンレセプター (estrogen receptor), マイクロRNA (microRNA)

#### はじめに

乳癌には, 乳癌細胞がエストロゲンレセプター (ER; estrogen receptor) を発現してエストロゲン依存性に発生・進展するER陽性乳癌と, 乳癌細胞がERを発現していなくてエストロゲン非依存性に発生・進展するER陰性乳癌が存在し, 現在, 両者は発生する細胞や臨床像が異なり, 生物学的に異なる病気であると考えられている。エストロ

ゲンレセプター (ER) 陽性乳癌は, 正常乳腺の分化の最終段階である, 分化した乳腺上皮細胞から発生すると考えられている[1]。乳癌組織におけるERの発現は, 現在, 免疫組織化学法により評価している。ERの発現量 (陽性細胞率) は症例により様々な分布を示し, 0%から100%まで連続的に存在し, 内分泌療法や化学療法の奏効性や予後などの生物学的特性の指標として非常に重要である。乳癌組織のERの発現調節に関しては, これまでER遺伝子のメチル化やER蛋白のユビキチン化による分解などが報告されているが, 臨床的に重要であるものは未だ見出されていない。さらに, ER陽性乳癌は内分泌高感受性であるluminal Aと内分泌低感受性であるluminal Bサブタイプが存在することが明らかになっている[2]。われわれは, 遺

別冊請求先: 〒060-8648 北海道札幌市北区北14条西5丁目

北海道大学病院乳腺・内分泌外科 山下啓子

E-mail address: hirokoy@huhp.hokudai.ac.jp

伝子発現制御機構のひとつとして最近注目されているマイクロRNA (microRNA) について、ER遺伝子の発現やER陽性乳癌の生物学的特性への関与に関する研究を行ってきたので、本稿ではその研究の一端も含めて紹介する。

なお、本稿で用いているエストロゲンレセプターはすべて、エストロゲンレセプターアルファ (ER $\alpha$ ; estrogen receptor  $\alpha$ ) である。

## 1. 乳癌組織におけるエストロゲンレセプター (ER) の発現の臨床的意義

免疫組織化学法によるERの発現を正常乳腺および前癌病変で検討したAllredらの報告によると、閉経前の正常乳管上皮細胞は約30%がER陽性細胞である。一方、atypical ductal hyperplasia, atypical lobular hyperplasiaといった前癌病変ではほぼすべての上皮細胞がER強陽性となっている[3]。これに対して、low gradeの非浸潤性乳管癌 (DCIS; ductal carcinoma in situ) ではほぼすべての癌細胞がER強陽性を示すが、high gradeのDCISではほぼすべての癌細胞がER陰性である。浸潤性乳癌におけるERの発現は、現在、免疫組織化学法により評価するが、ERの発現量 (陽性細胞率) は症例により様々な分布を示し、0%から100%まで連続的に存在する[3]。2010年、米国臨床腫瘍学会と病理 (ASCO/CAP) から、乳癌組織においてホルモンレセプター (ER/プロゲステロンレセプター: PgR) 陽性と判定するカットオフを1%とすることが提唱された[4]。癌細胞の核に少なくとも1%の染色陽性細胞がある場合、ER/PgR陽性と判定することを推奨している。

乳癌組織のERの発現量と予後について、Allredらは術後内分泌療法を行った症例の予後を解析し、ERの発現量が高いほど予後良好であることを報告した[5]。最近の閉経後乳癌の術後内分泌療法 (アロマトラーゼ阻害剤とタモキシフェンの比較) の臨床試験の報告においても、アロマトラーゼ阻害剤、タモキシフェンともにER/PgRの発現量が高いほど予後良好であることが示されている[6]。

われわれは内分泌療法を施行した再発乳癌における乳癌組織のERの発現量と内分泌療法の効果および予後について検討し、ERの発現量は内分泌療法有効例で有意に高く、ERの陽性細胞率1%以上の症例が有意に再発後の予後が良好であることを報告した[7]。PgRの発現量と内分泌療法の効果および予後についても同様に、PgRの発現量は内分泌療法有効例で有意に高く、陽性細胞率1%以上の症例で有意に再発後の予後が良好であった。さらにわれわれは、手術を行っていない進行乳癌において乳癌組織のERの発現量とアロマトラーゼ阻害剤による一次内分泌療法の奏効期間を検討し、ERの陽性細胞率2/3以上の症例は、2/3以下の症例に比べて、一次内分泌療法の奏効期間、化学療法に至るまでの期間ともに有意に長いことを報告した[8]。最

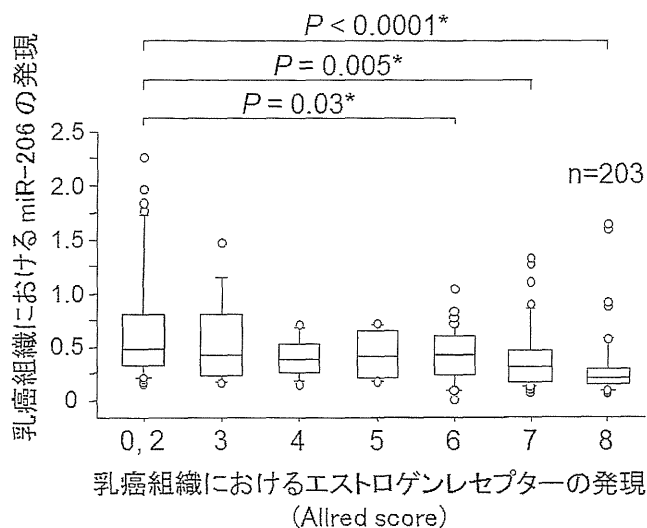


図1. 乳癌組織におけるERの発現とmiR-206の発現の相関[14]。ER $\alpha$ の蛋白発現量が高いほどmiR-206の発現が低い。

近、ER陽性乳癌は内分泌高感受性であるluminal Aと内分泌低感受性であるluminal Bサブタイプが存在することが明らかになり、luminal Aサブタイプは現在の標準的治療法の効果が期待できない可能性が指摘されている[2]。このように、乳癌組織のERの発現量は内分泌療法や化学療法の奏効性および予後に関与することが明らかとなっている。

## 2. 乳癌組織におけるERの発現調節

乳癌組織のERの発現調節に関してはER $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域のメチル化[9]やER $\alpha$ 遺伝子の変異[10]、ER $\alpha$ 蛋白のユビキチン化による分解[11]などの報告があるが、臨床的に重要であるものは未だ見出されていない。2007年、マイクロRNA (microRNA) によるER $\alpha$ の発現調節に関する基礎研究が報告された[12]。

microRNAは20-25塩基からなる内因性の一本鎖RNAで、標的mRNAの3'末端非翻訳領域に結合して標的mRNAを分解あるいは蛋白への翻訳を抑制することにより、標的遺伝子の発現を抑制する[13]。Adamsらは、乳癌細胞を用いてmicroRNAのひとつmiR-206がER $\alpha$ のmRNA 3'末端非翻訳領域に結合して、ER $\alpha$ のmRNAと蛋白発現を抑制することを報告した[12]。われわれは乳癌組織におけるmiR-206の発現を定量的RT-PCR法により検討し、ER $\alpha$ のmRNAおよび蛋白発現量が高いほどmiR-206の発現が低いことを見出した(図1)[14]。この結果はmiR-206が乳癌組織におけるER $\alpha$ の発現を抑制していることを示唆している。miR-206をER陽性乳癌細胞MCF-7に導入すると、ERのmRNA発現は抑制され、さらに細胞増殖が抑制された。最近、miR-206以外にも幾つかのmicroRNAが乳癌細胞においてER $\alpha$ のmRNAに直接結合することにより、ER $\alpha$ の発現量を調節している可能性が報告されている[15, 16]。わ

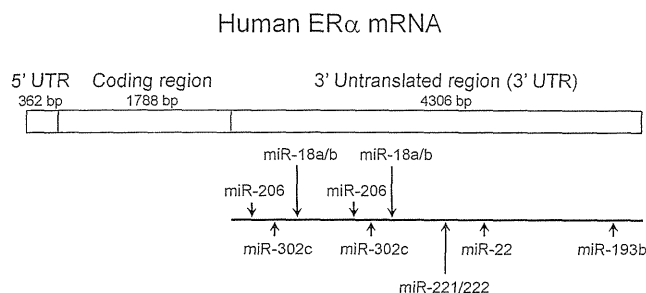


図2. ER $\alpha$ のmRNA 3'末端非翻訳領域(3'UTR)に結合するmicroRNA。

われわれは、ER $\alpha$ のmRNAに結合すると報告されている7つのmicroRNAの乳癌組織における発現を検討し、ERの蛋白発現や予後との相関を検討した(図2)[17]。その結果、miR-18aはER陰性乳癌で高発現していた。一方、miR-193bの発現は、ERの発現量が高いほど、発現量が高いという逆の結果となった。さらに、ER陽性HER2陰性乳癌において、miR-18b低発現症例はmiR-18b高発現症例に比べて有意に予後(生存率)が良好であった(図3)。

### 3. ER陽性乳癌におけるmicroRNAの役割

microRNAは、標的遺伝子の3'末端非翻訳領域に結合して遺伝子の発現を抑制するが、ひとつのmicroRNAの標的はひとつと限らず、通常、複数の遺伝子を標的とする[18]。また、個々のmicroRNAは複数の標的遺伝子の発現を同時に制御する。さらに、ひとつの遺伝子を複数のmicroRNAが標的とする。このように、microRNAによる遺伝子発現調節は複雑であり、microRNAは遺伝子発現を広範囲にわたって調和しつつ微調整すると考えられている。

Luらは、2005年にヒト癌におけるmicroRNA発現プロファイルを初めて報告した[19]。microRNA発現プロファイルは正常組織と腫瘍で大きく異なり、概して正常組織で発現が高いことが示されている。また、癌によりmicroRNA発現プロファイルは異なることが報告された。Iorioらは、乳癌におけるmicroRNA発現プロファイルを初めて報告した[20]。microRNA発現プロファイルは正常乳腺と乳癌で異なること、また、乳癌のなかでもプロファイルが分類されることを報告している。彼らは、ER陽性乳癌とER陰性乳癌とで異なる発現レベルを示すmicroRNA(miR-206を含む)を幾つか報告している。さらに同じサンプルを用いてmRNAとmicroRNAの発現プロファイルを検討した報告によると、mRNA発現プロファイルのサブタイプ間でmicroRNAの発現プロファイルが異なることが示された[21]。また、microRNAの発現プロファイルは、ERの発現状況やgradeによって異なることが報告されている。われわれは最近、ER陽性乳癌の内分泌高感受性乳癌/低感受性乳癌においてmicroRNAとmRNAのマイクロアレイ解析を行い、これら2群間でmicroRNAとmRNAの発現パ

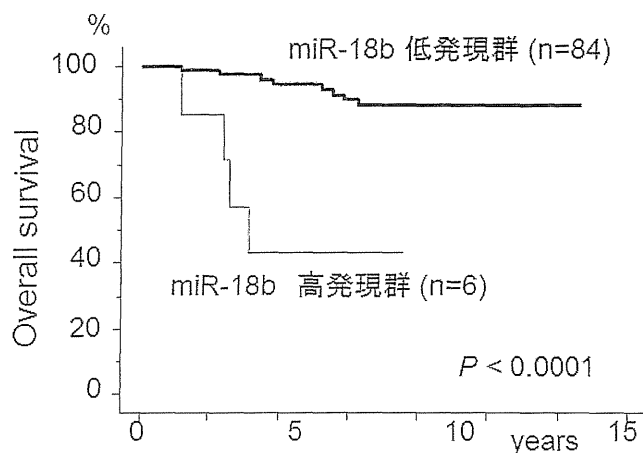


図3. ER陽性HER2陰性乳癌におけるmiR-18b発現と予後[17]。miR-18b低発現症例はmiR-18b高発現症例に比べて有意に予後(生存率)が良好である。

ターンが異なることを見出している。また、ER陽性乳癌の生物学的特性に関与すると考えられるmicroRNAとその標的遺伝子を同定し、これらが治療標的あるいは薬物療法の感受性のバイオマーカーとして有用であると推測している。われわれは、現在、microRNAがER陽性乳癌の生物学的特性に関与していると考えている。

### おわりに

ER陽性乳癌の予後はこの30年間で明らかに改善した[22]。これは再発予防(微小転移の根絶)目的として行う内分泌療法を中心とした薬物療法の進歩によるものと考えられる。しかしながら、特に腋窩リンパ節転移陽性症例は、術後5年以降においても再発をきたす場合がある。このような症例の予後をいかに改善するかが課題のひとつとなっており、現在行っている内分泌療法や化学療法とは作用機序の異なる新たな薬物療法の開発が必要であると思われる。幾つかのmicroRNAがER陽性乳癌の発生・進展に関与していると予測され、そのメカニズムの解明が新たな治療法の確立に繋がる可能性があると考えている。

### 【文献】

1. Prat A, Perou CM: Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 15: 842-844, 2009
2. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al.: 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* 22: 1736-1747, 2011
3. Allred DC, Brown P, Medina D: The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res* 6: 240-245, 2004
4. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al.: 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
5. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. : Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17 : 1474-1481, 1999
  6. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. : Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 26 : 1059-1065, 2008
  7. Yamashita H, Yando Y, Nishio M, et al. : Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 13 : 74-83, 2006
  8. Endo Y, Toyama T, Takahashi S, et al. : High estrogen receptor expression and low Ki67 expression are associated with improved time to progression during first-line endocrine therapy with aromatase inhibitors in breast cancer. *Int J Clin Oncol* 16 : 512-518, 2011
  9. Giacinti L, Claudio PP, Lopez M, et al. : Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Oncologist* 11 : 1-8, 2006
  10. Herynk MH, Fuqua SA : Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25 : 869-898, 2004
  11. Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, et al. : Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23 : 4813-4823, 2004
  12. Adams BD, Furneaux H, White BA : The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol* 21 : 1132-1147, 2007
  13. Krol J, Loedige I, Filipowicz W : The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11 : 597-610, 2010
  14. Kondo N, Toyama T, Sugiura H, et al. : miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 68 : 5004-5008, 2008
  15. Leivonen SK, Makela R, Ostling P, et al. : Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene* 28 : 3926-3936, 2009
  16. Pandey DP, Picard D : miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 29 : 3783-3790, 2009
  17. Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, et al. : Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 130 : 331-339, 2011
  18. Peter ME : Targeting of mRNAs by multiple miRNAs : the next step. *Oncogene* 29 : 2161-2164, 2010
  19. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. : MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 : 834-838, 2005
  20. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. : MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65 : 7065-7070, 2005
  21. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. : MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8 : R214, 2007
  22. Yamashita H, Iwase H, Toyama T, et al. : Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women : trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann Oncol* 22 : 1318-1325, 2011