

201220022A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 田村 研治

平成 25 (2013) 年 5 月

＜目 次＞

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	
	田村 研治	1
II.	分担研究報告書	19
	1. 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リサーチ	高田江里子
	2. 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	山口聡子
	3. ゲノム、タンパク解析、薬剤感受性試験	小泉史明
	4. 病理解析、免疫組織染色、組織アレイを用いた解析	津田 均
	5. TNBを対象とした大規模レトロスペクティブ臨床試験	木下 貴之
	6. TNBを対象とした大規模プロスペクティブ臨床試験	藤原 康弘
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV.	研究成果の刊行物・別刷	49

# 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・腫瘍内科 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) *BRCA1* のプロモーター領域の高メチル化が TNB に特異的な変化であることを明らかにし、*BRCA1* の免疫組織染色においては、*BRCA1* タンパク発現が消失していることを明らかにしたこと、2) テロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の定量的ための ELISA を開発し、細胞株レベル、血清レベルでの測定が可能になったこと、3) *BRCA1* 遺伝子異常を有する MDA-MB-436 株において PARP 阻害剤である Olaparib の感受性が高く、また、同株において、Olaparib と塩酸イリノテカンとの相乗効果を *in vitro*, *in vivo* で明らかにしたこと、4) リンパ節転移陰性乳がんにおいて TNB は有意に予後不良であり、また、TNB 術前化学療法症例において増悪 (PD) した症例では、TWIST, SNAIL1/2, Vimentin, NS などの発現量が高かったこと、5) TNB に特徴的な metaplastic carcinoma や小葉がんは、術前化学療法の奏効が低く、有意に無再発生存期間が短いこと、6) 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) の付随研究において、*BRCA1* の発現量が低い症例のほうが、CBDCA の上乗せ効果が高い傾向にあったこと、などである。

### 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・腫瘍内科 科長  
山口 聡子 国立がん研究センター研究所  
がん幹細胞研究分野 特任研究員  
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  
11F 支援施設 室長  
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  
乳腺外科 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。

がん幹細胞機能維持に必須の分子基盤を解明し、この維持に必要な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

解析し、がん幹細胞を標的とした診断治療法の開発を目指す。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、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。本年度は、テロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の定量のためのELISAを新規に開発した。

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(TNBC)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した。

近年、新規分子標的薬としてPARP阻害剤が注目されている。PARP阻害剤の一つであるOlaparibは、前臨床および臨床試験においてBRCA遺伝子変異を有する腫瘍に対し高い感受性を認めており、細胞障害性抗がん剤との併用を含めて現在開発がすすんでいる。我々はヘテロな集団であるトリプルネガティブ乳がんに対するOlaparibの感受性、および様々な細胞障害性抗がん剤との併用効果を検討し、その効果規定因子を探索した。

本年度における研究目的の一つに、1. 施設の乳癌患者におけるトリプルネガティブ(TN)乳がんの割合と、長期予後について調査すること、2. 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ことがある。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

### 1. hTERT定量のためのELISA法の開発

hTERTに対するポリクローナル抗体を固相化抗体として、新規モノクローナル抗体を液相化抗体として、サンドイッチELISAを構築し、hTERTのリコンビナント蛋白を用いて性能を確認した。このELISAの系を用いて、癌細胞の細胞株の抽出液でhTERT蛋白の定量が可能であることを示した。また、同じ細胞株を用いて、RT-PCR法でmRNAを測定した。

### 2. 乳がん組織、細胞を用いたメチル化解析

#### ① 材料

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凍結組織検体 82 症例、及び、アセトン固定・パラフィン包埋(AFPE)検体 39 症例を用いた(表 1)。

表 1 メチル化解析に用いた乳がん検体

手術検体	凍結組織検体	AFPE検体	合計
TNBC	20	18	38
Luminal A (LUA)	30	13	43
Luminal B (LUB)	17	4	21
HER2-enriched (HER2)	15	4	19
合計	82	39	121

#### ② ゲノム DNA の抽出

凍結保存検体からのゲノム DNA 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 DNA 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)を用いて抽出した。

#### ③ ゲノム DNA の bisulfite 処理

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 bisulfite 処理を行なった。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)により精製し、-20°Cにて保存した。

④ 定量的 methylation-specific PCR (qMSP) 法

Bisulfite 処理した DNA を鋳型に、*BRCA1* プロモーター領域のメチル化 DNA 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。また、全ゲノム DNA のコピー数算出の目的で、CpG 部位を認識しないユニバーサルプライマーを用いて同様に増幅させた(図 1)。コントロール用完全メチル化 DNA (M-control) は、ヒトリンパ球のゲノム DNA を *SssI* methylase (New England Biolabs) で処理した。分子数既知の標準 DNA により作成した検量線により、それぞれの分子数を測定、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 2 の式により算出した。Cut-off 値は、我々の以前の解析(Terada, *Carcinogenesis*, 2009)と同様に 10%に設定し、10%以上をメチル化陽性とした。

$$\text{メチル化レベル(\%) = } \frac{\text{検体中のメチル化コピー数} / \text{検体中の全コピー数}}{\text{M-control中のメチル化コピー数} / \text{M-control中の全コピー数}} \times 100$$

図 2 メチル化レベルの算出

⑤ 免疫組織化学染色

qMSP 法に使用した乳がん検体のうち、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織が得られた 103 症例 (TNBC 31 例、LUA 41 例、LUB 21 例、HER2 10 例) について、BRCA1 タンパクの免疫組織化学染色を行った。一次抗体として抗 BRCA1 マウスモノクローナル抗 Ab-1(Calbiochem)を用い、ChemMate ENVISION キット(Dako)及び自動染色装置 Autostainer Link 48(Dako)にて検出した。判定は、染色性の強度を陰性(0)、弱(1)、中(2)、強(3)の 4 段階、陽性細胞比率を陰性(0)、<1%(1)、1 ~ <10%(2)、10 ~ <33%(3)、33 ~ <67%(4)、67% 以上(5)の 6 段階に分類、加算して 0-8 点までのスコア化し、3 点以上を陽性とした。

3. 病理学的解析

① リンパ節転移陰性浸潤性 (pN0) 乳がんにおける TNBC の頻度と予後

1996~2000年に国立がんセンター中央病院にて外科手術を受けた pN0 浸潤性乳がん 530 例につき、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上で、2 mm 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。薄切した TMA ブロックに対し ER (1D5, Dako), PgR (PgR636, Dako), HER2 (HercepTest, Dako) の免疫染色を行った。

また、これらの 530 名の患者につき病理報告書により腫瘍浸潤径、組織径、核グレード、リンパ管・血管侵襲の有無を調査し、診療録により患者予後を調査した。追跡期間中央値は 120.1 か月 (0.6 ~ 160.3 か月) であった。

② 術前化学療法で PD となる乳がんの予測バイオマーカーの検討

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、1990 年 1 月 ~ 2000 年 3 月までに国立がん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、2 mm 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。これらの TMA の薄切切片を対象に免疫組織化学的に、表 1 に示した分子の発現を検索した、染色はいずれもクエン酸バッファー (pH 6.0) 熱処理、Dako の自動染色装置を用いた。

その他、化学療法耐性で予後不良な卵巣明細胞腺がんのマーカーとして研究所と共同で見出した分子 3 種類 (Honda K et al. 投稿中) についても免疫染色で検討を行った。

表 1. 検討に用いた抗体

分子	抗体種類	希釈	商品名	メーカー
BRCA1	Mono (マウス)	1/100	clone A b-1	Calbiochem
PARP	Mono (ウサギ)	1/100	clone E 102	Abcam
ABCG2	Poly (ウサギ)	1/200	PAB2516 0	Abnova
ABCG2	Mono (マウス)	1/200	MAB1047 8	Abnova
ABCB1	Poly (ウサギ)	1/200	PAB1650 8	Abnova
SLC01B3	Poly (ウサギ)	1/100	PAB2109 9	Abnova
TWIST	Poly (ウサギ)	1/100	ab49254	Abcam
TWIST2	Mono (マウス)	1/300	clone 3 C8	Abnova
TWISTNB	Poly (ウサギ)	1/50	PAB2149 1	Abnova
Vimentin	Mono (マウス)	1/200	V9	Dako
SNAIL2	Poly (ウサギ)	1/200	PAB1923	Abnova

#### 4. TNBC におけるに対する Olaparib の感受性

##### ①トリプルネガティブ乳がんに対するOlaparibの感受性の確認

トリプルネガティブ乳がん9細胞株に対するOlaparibの感受性をCell Counting Kit-8を用い確認した。

##### ②トリプルネガティブ乳がんにおけるOlaparibと細胞障害性抗がん剤の併用効果の検証

感受性株であるMDA-MB-436、および非感受性株であるMDA-MB-231を用いて既存の細胞障害性抗がん剤 (Cisplatin、CPT-11、Paclitaxel、Eribulin) との併用効果について、combination index (CI) 法を用いて検証した。

##### ③マウス移植モデルを用いたOlaparibとCPT-11の併用効果の確認

感受性株であるMDA-MB-436をマウスに移植し、腫瘍生着確認後、Olaparibを50 mg/kg/day day1-5/weekの量で3週間腹腔内投与、CPT-11を15 mgまたは30mg/kg/day day1, 4/weekの量で3週間腹腔内投与、およびそれぞれを併用投与し、抗腫瘍効果を検討した。

#### 5) TNB のバイオマーカー (レトロスペクティブ)

##### 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。

1998-2008年に国立がん研究センター中央病院で術前化学療法を施行した562例。

1996-2000年に国立がん研究センター中央病院で乳がんに対する根治的な手術を施行した369例。

##### 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。

Ki-67の抗体は、MIB-1, Dako社のものを用いた。

##### 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。

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のバイオマーカー (プロスペクティブ)

①TNB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。

③HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療における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, STAT, ZEB1, TWISTなどの発現量とPI3K変異を測定する。登録施設のほとんどにおいて付随研究のIRBが通過した。約半数の施設より未染の切片を回収した。登録症例数190例に対して100例の未染の切片が回収できた。

#### (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定量のためのELISA法の開発

hTERTに対するポリクローナル抗体を固相化抗体、新規モノクローナル抗体を液相化抗体として、新規ELISAを構築した。

hTERT定量化のためのELISAを構築するために、hTERTに対するポリクローナル抗体を固相化抗体、我々が作成した新規hTERTモノクローナル抗体を液相化抗体として、サンドイッチELISAを構築した。hTERTのリコンビナント蛋白を用いて、感度を調べた。blank上限(LOB)は0.03ng/ml、変動係数を10%未満を誤差許容範囲と設定した場合、定量限界(LOQ)0.31ng/mlと感度は良好であった。また、高い再現性で標準曲線を良好に描くことができた(図1)。

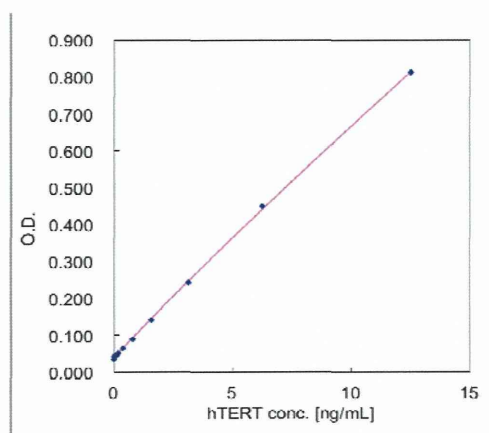


図1.新規hTERT ELISAの標準曲線

このELISAは、既存のhTERT ELISA (変動係数15%でLOQ 0.686ng/mL)と比較しても、感度の面で優れていると考えられた。

次に血清にhTERTのリコンビナント蛋白を添加し、検体希釈倍数5倍にてhTERT ELISAでの測定を行って、添加回収率を算出したところ、回収率は89%以上と良好であり、血清検体の測定が可能であると考えられた。

新規hTERT ELISAを用いて、細胞株のlysateにおいてhTERTの定量を行った。

次に、構築したhTERT ELISAを用いて、各種癌細胞の細胞株で内在性のhTERTを検出可能かどうか調べた。

12種類の癌細胞の細胞株 (RMG-I, OVKATE, HeLa, OVSAHO, OVCAR3, PEO1, PEO4, ES-2, OVTOKO, K562, OWISE, TOV21G) および非癌細胞のコントロー

ル (BJ: 繊維芽細胞) から細胞液を抽出し、2回の独立した実験で測定を行ったところ、hTERT濃度の絶対値の再現性は良好であった(図2)。また、12種類全ての癌細胞の細胞株でコントロールの繊維芽細胞よりもhTERT値が高値を示した(図2)。

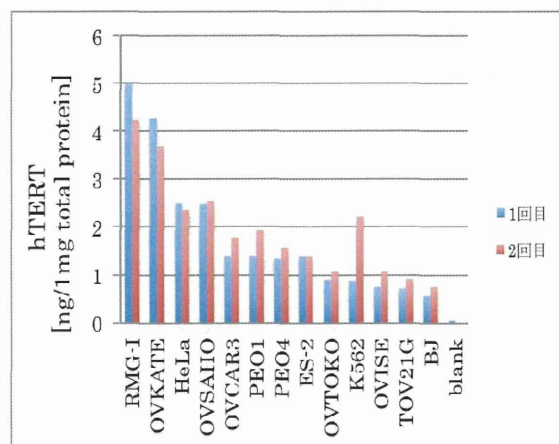


図2.各種癌細胞株の内在性hTERTの定量

以上から、新規ELISAで細胞株の内在性のhTERTの定量が可能であると考えられた。

これらの細胞株において、hTERT mRNAをRT-PCR法を用いて測定したが、ELISAにて測定した蛋白量との間に相関はみとめられなかった(図3)。

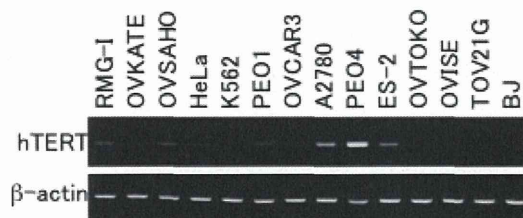


図3. 各種癌細胞の内在性hTERT mRNA

hTERTの蛋白量制御には、転写以外にも様々な機構が関わっているためと考えられる。同時に、hTERT mRNA測定のみでは蛋白量を予測が不可能であり、蛋白そのものの定量が必要であることが示唆された。

トリプルネガティブ乳がん細胞株での内在性のhTERTの定量を行った。

次に、トリプルネガティブ乳がんの細胞株を用いて、内在性のhTERT定量を行った。

まず、トリプルネガティブ乳がん細胞株9種における(MDA-MB-468, Hs578T, BT549, BT20, HCC38, HC

C1937, MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-157) hTERT mRNAをRT-PCR法を用いて測定した (図4)。



図4. TNBC細胞株の内在性hTERT mRNA

これらの細胞株では、既にエベロリムス感受性が報告されており、エベロリムス低感受性株ほどhTERT mRNAが高い傾向がみとめられた。

次に、新規ELISAを用いて、トリプルネガティブ乳がん細胞株のhTERT蛋白量を定量した。mRNA発現量が低い細胞株2種 (MDA-MB-468, Hs578T) と発現量が高い細胞株3種 (HCC1937, MDA-MB-436, MDA-MB-231) でELISAを行ったが、hTERT蛋白量とmRNA発現量との間に相関はみとめられなかった (図5)。

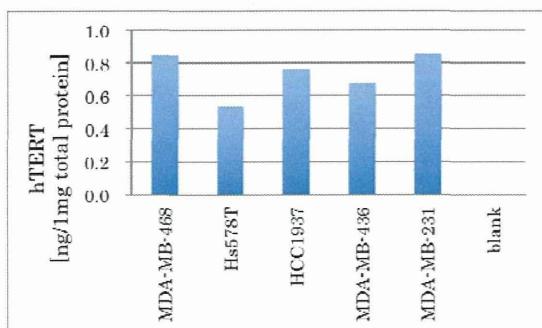


図5. TNBC細胞株の内在性hTERTの定量

## 2) 乳がん組織、細胞を用いたメチル化解析

### 乳がん検体の *BRCA1* メチル化レベル測定

121 症例の乳がん検体を用いて、*BRCA1* プロモーター領域のメチル化レベルを測定した (図3)。その結果、高メチル化を示した乳がん検体は9例存在した (7.4%)。AFPE 検体では、間質の混入が多い検体についてマクロダイセクションを施行していることもあり、凍結保存検体よりも高値のメチル化レベルを示す傾向にあった。

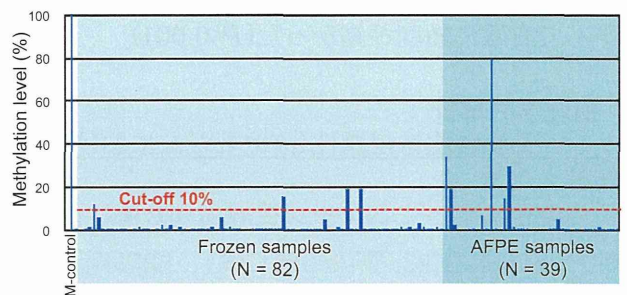


図3 乳がん検体121症例における*BRCA1*プロモーター領域のメチル化

*BRCA1* プロモーター領域のメチル化レベルの結果を、サブタイプ別に示したグラフが図4である。*BRCA1* メチル化陽性を示した乳がん9例は全てTNBCであり (TNBC 38 検体中 24%)、他のサブタイプと比較して有意に高かった。

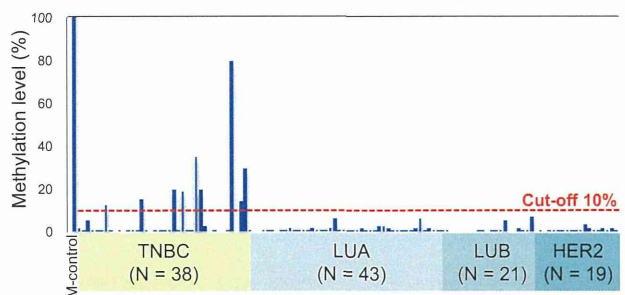


図4 *BRCA1*プロモーター領域メチル化の乳がんサブタイプ別比較

### 乳がん検体の *BRCA1* 免疫組織化学染色

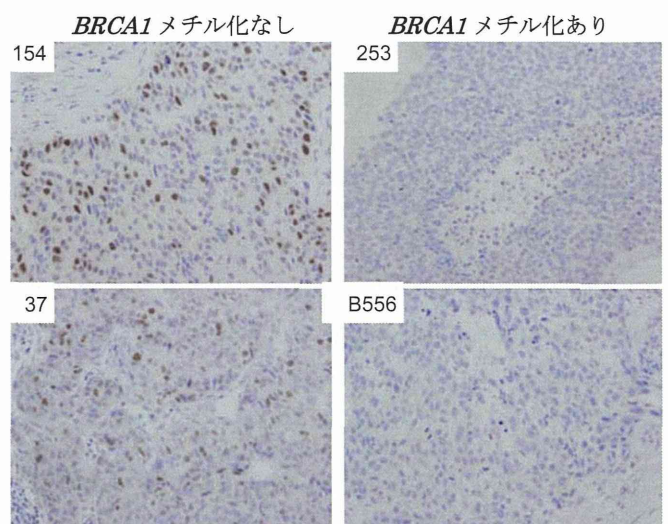


図5 乳がん検体における*BRCA1*の免疫染色の結果

103 症例の乳がん検体を用いて *BRCA1* タンパクの免疫組織化学染色を行ったところ、メチル化陽性乳がんでは顕著な染色性の低下を認め、タンパクレベルでの

発現消失を確認した(図5)。BRCA1タンパク発現消失は、メチル化陽性乳がん8検体中6検体、及び、メチル化陰性乳がん95検体中9検体であり、メチル化陽性乳がん有意に頻度が高かった( $P < 0.001$ )。

### 3) 病理学的解析

#### リンパ節転移陰性浸潤性(pN0)乳がんにおけるTNBCの頻度と予後

免疫染色によってホルモン受容体(HR)陽性かつHER2陰性(luminal/HER2-型)369例(70%)、HR陽性かつHER2陽性(luminal/HER2+型)40例(8%)、HR陰性かつHER2陽性(HER2-enrich型)41例(8%)でTN乳がんは75例(14%)、不明が5例(浸潤癌巣が含まれず)であった。10年無再発生存率はluminal/HER2-群、luminal/HER2+群、HER2-enrich群、TN乳がん群で各々88.3%、81.5%、81.3%、78.2%であり、luminal/HER2-群が最も高く、TN乳がん群が最も低かった。乳がん特異的10年生存率はluminal/HER2-群、luminal/HER2+群、HER2-enrich群、TN乳がん群で各々95.3%、94.9%、80.1%、87.5%であり、luminal/HER2-群、luminal/HER2+群が高く、HER2-enrich群、TN乳がん群が最も低かった( $p = 0.0007$ )。

#### 術前化学療法でPDとなる乳がんの予測バイオマーカーの検討

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、紡錘細胞癌、扁平上皮癌を含む「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。現在、表1の10抗体を用いた免疫染色、卵巣明細胞腺がんのマーカーによる免疫染色を完了し評価を進めている。BRCA1、PARPの検討ではTN乳がんのBRCAness(DNA相同性組み換え修復能不全)、PARP阻害薬に対する反応性等に関する示唆を得られる可能性がある。BRCA1やPARPの発現低下と化学療法薬に対する感受性との関連が予測される。また、ABCG2は尿酸排出トランスポーター、ABCB1はMDR1もしくはP糖タンパクと呼ばれる分子で、SLC01B3も肝臓における薬剤トランスポーターの一つである。これらの分子の強発現ががん細胞による抗がん剤の細胞外排出機能と関連する可能性が予測される。TWIST、TWIST2、SNAIL2、Vimentin等は上皮間葉移行マーカーとして研究に用いられる分子であり、強発現が化生癌の形質発現と関連することが予測され

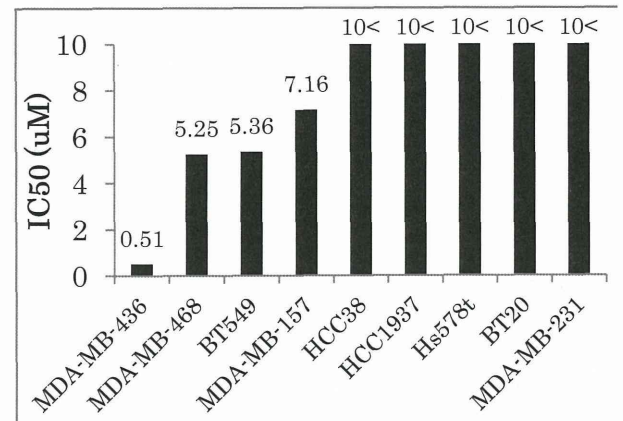
る。TN乳がんに比較的高頻度で発現するBasal-likeマーカー、アポクリンマーカーの検索と併せ、これらの結果を解析し、学会発表、論文発表を行う予定である。

TN乳癌31例を含む103例のBRCA1の免疫染色の結果は別項に記載。このほか、次世代シーケンシングやエクソーム、SNPアレイ、プロテオーム、トランスクリプトームなどの多層的オミックス研究等の支援のための基盤づくりを進めた。

### 4) TNBCにおけるに対するOlaparibの感受性

#### トリプルネガティブ乳がんに対するOlaparibの感受性の確認

トリプルネガティブ乳がん9細胞株のなかで、BRCA1遺伝子変異を有するMDA-MB-436が最もOlaparibの感受性が高く、他の細胞株の10倍以上高感受性であった)。



#### トリプルネガティブ乳がんにおけるOlaparibと細胞障害性抗がん剤の併用効果の検証

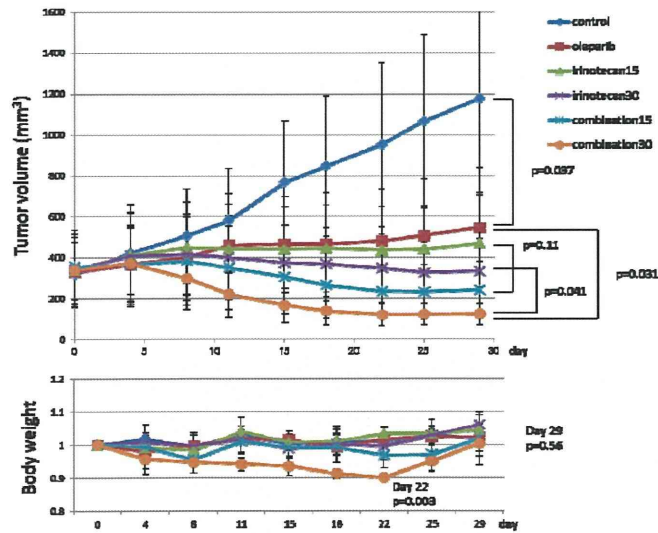
MDA-MB-436とMDA-MB-231を用いてCombination index法により併用試験を行った。CI値は、数値が1に近い値であれば相加的、統計学的に有意差をもって1以下であれば相乗的と判定される。Olaparib感受性株であるMDA-MB-436においては、いずれの細胞障害性抗がん剤との併用においても相以上の併用効果を認めた。特にCPT-11とは強い併用効果を示した。Olaparib非感受性株であるMDA-MB-231においては、CPT-11以外では併用効果を認めなかった。

表1 Olaparibと細胞障害性抗がん剤との併用効果

Combination Drug	Combination Index	
	MDA-MB-436	MDA-MB-231
Cisplatin	0.75	1.47
CPT-11	0.55	0.78
Paclitaxel	0.88	1.41
Eribulin	0.89	1.30

マウス移植モデルを用いたOlaparibとCPT-11の併用効果の確認

OlaparibとCPT-11の併用は、CPT-11 15、30mg/kg群のいずれにおいても腫瘍縮小効果をもたらした。Olaparib、CPT-11の単剤投与群は、Controlに比較して、有意に腫瘍増殖を抑制したが、明らかな腫瘍縮小効果は認めなかった(図2)。*in vitro*でのOlaparibとCPT-11の併用効果は、*vivo*においても再現された。



5) TNBのバイオマーカー(レトロスペクティブ)患者背景

TNB試験の対象症例の背景を表1に示す。

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
	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のみ	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

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示す。

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	

pAKT及びpERK1/2に相関する因子

Markers	number	%	
<i>PIK3CA</i> 変異	26	35	
H1047R	15		
E545K	11		
none	49		
<i>Akt1</i> 変異	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	

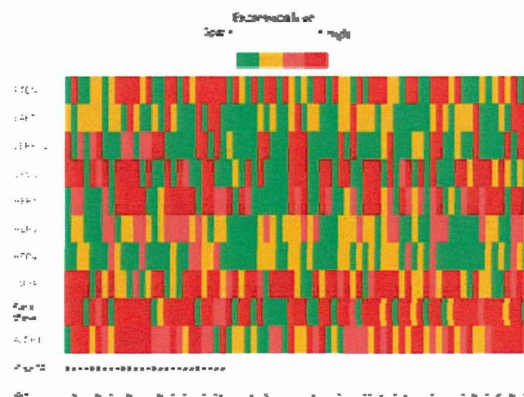
対象症例のTNB組織を用いたがん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無と、リン酸化AKT(pAKT)及びリン酸化ERK1/2(ERK1/2)との相関について検討した。

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
	PTEN	0.64
	ALDH1	0.23
		0.62
	pERK	0.10
pERK1/2	<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

たんぱく質発現及び遺伝子変異マップ

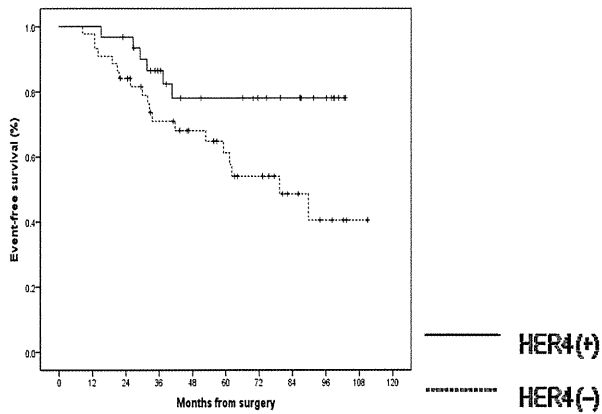
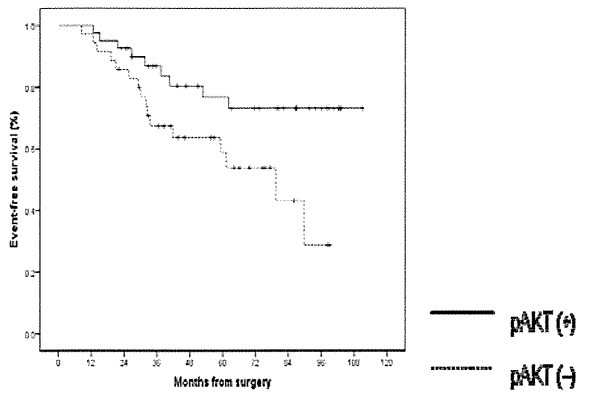
がん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無の結果をマップにしたものを図1に示す。



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2



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を示す。

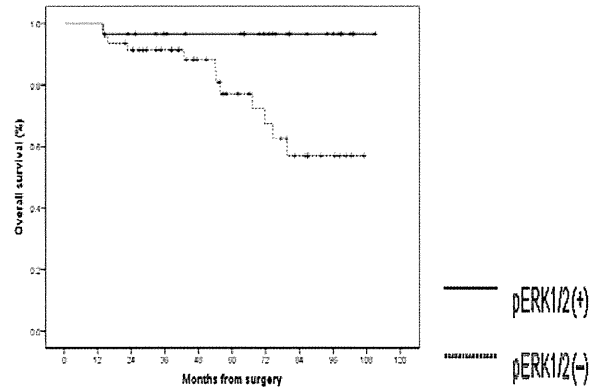
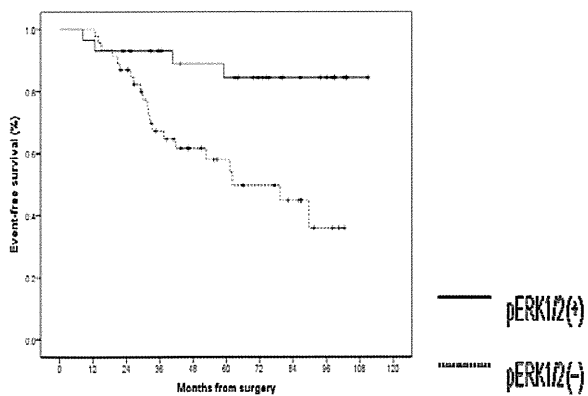


表4 解析対象（組織型）

解析対象（組織型）	症例数	%
B. Malignant (Carcinoma)		
a. Invasive carcinoma	500	89.0
a1. Papillotubular carcinoma	126	22.4
a2. Solid-tubular carcinoma	202	35.9
a3. Scirrhus carcinoma	172	30.6
b. Special types	62	11.0
b1. Mucinous carcinoma	12	2.1
b2. Medullary carcinoma	0	0
b3. Invasive lobular carcinoma	29	5.2
b4. Adenoid cystic carcinoma	0	0
b5. Squamous cell carcinoma	5	0.9
b6. Spindle cell carcinoma	4	0.7
b7. Apocrine carcinoma	5	0.9
b8. Carcinoma with cartilaginous and/or osseous metaplasia	1	0.2
b9. Tubular carcinoma	0	0
b10. Secretory carcinoma	1	0.2
b11. Invasive micropapillary carcinoma	1	0.2
b12. Matrix-producing carcinoma	4	0.7
b13. Others	0	0

図3 浸潤性乳管がん（IDC）と他の亜型との生存期間の比較

トリプルネガティブ乳がんに特徴的なmetaplastic carcinomaや小葉がんの予後が有意に短かった。

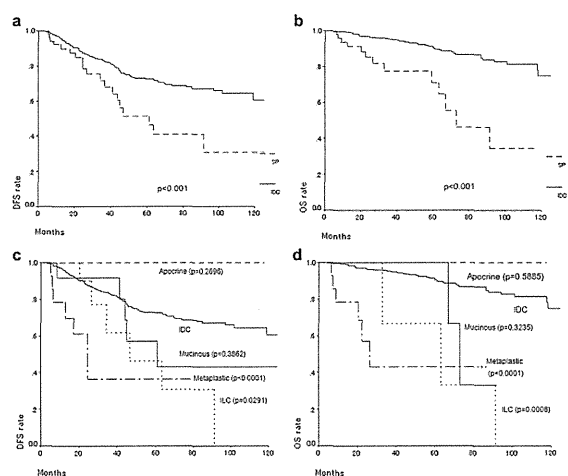


表5 患者背景 (N=365)

	No. of patients (%) (N = 369)
Age	
≤50	146 (40)
>50	223 (60)
Menopause	
Premenopausal	152 (41)
Postmenopausal	217 (59)
Invasive tumor size (cm)	
≤2.0	276 (75)
>2.0 to ≤5.0	89 (24)
>5.0	4 (1)
Histology	
Invasive ductal carcinoma (IDC)	302 (82)
Mucinous carcinoma	26 (7)
Invasive lobular carcinoma	22 (6)

	No. of patients (%) (N = 369)
IDC with predominantly intraductal component	17 (4)
Others (medullary, tubular)	2 (1)
Ki-67 (≥10 %)	
Positive	221 (60)
Negative	148 (40)
Ki-67 (≥14 %)	
Positive	163 (44)
Negative	206 (56)
Ki-67 (≥20 %)	
Positive	87 (24)
Negative	282 (76)
Histological grade	
1	104 (28)
2	175 (47)
3	88 (24)
Unknown	2 (1)
Nuclear grade	
1	156 (42)
2	103 (28)
3	109 (30)
Unknown	1 (0)
Lymphovascular invasion	
Positive	138 (37)
Negative	230 (62)
Unknown	1 (0)
Adjuvant chemotherapy	
Yes	153 (41)
CMF	100 (65) <sup>a</sup>
UFT	52 (34) <sup>a</sup>

	No. of patients (%) (N = 369)
CEF	1 (1)
No	217 (59)
Hormone therapy (tamoxifen)	
Yes	187 (51)
No	182 (49)

表 6: Ki-67 の 3 つのカットオフと組織学的グレードの関係

Ki-67 labeling index	Number of tumors (%)								
	Total	Histological grade			p value	Nuclear grade			p-値
		1	2	3		1	2	3	
Low (<10%)	148	61 (41)	73 (49)	14 (10)	<0.000	98 (66)	33 (22)	17 (12)	<0.0001
High (≥10%)	221 <sup>a</sup>	43 (19)	102 (47)	74 (33)	1	58 (26)	70 (32)	92 (42)	
Low (<14%)	206 <sup>b</sup>	82 (40)	102 (50)	21 (10)	<0.000	126 (61)	52 (25)	28 (14)	<0.0001
High (≥14%)	163 <sup>c</sup>	22 (13)	73 (45)	67 (41)	1	30 (18)	51 (31)	81 (50)	
Low (<20%)	282 <sup>b</sup>	97 (34)	144 (51)	40 (14)	<0.001	146 (52)	81 (29)	55 (19)	<0.0001
High (≥20%)	87 <sup>c</sup>	7 (8)	31 (36)	48 (55)		10 (11)	22 (25)	54 (62)	
Total	369 <sup>a</sup>	104	175	88		156	103	109	

乳がん369症例を対象に、国内におけるKi-67の標準化を試みた。10, 14, 20%の3つのカットオフを設定し解析した結果、いずれのカットを用いても、組織学的悪性グレードとDFSに強い相関をみとめた。

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。

トリプルネガティブ乳がんの亜型の中で、metaplastic carcinomaや小葉がんは予後不良で、従来の抗悪性腫瘍薬に対する感受性に乏しい。一方、アポクリン癌に関しては、従来の抗悪性腫瘍薬に対する感受性に乏しいが、予後は良好であった。国内乳がんにおいて、Ki-67の標準化が可能であったが、TNBCにおける使用は慎重に行うべきである。

## 6) TNBのバイオマーカー (プロスペクティブ)

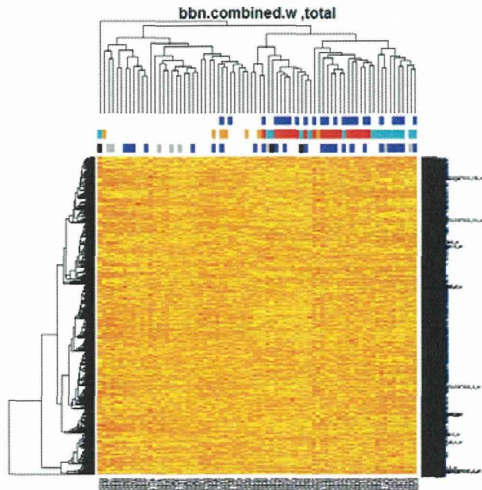
### TNBの術前化学療法のpCRを予測する遺伝子群の探索 (マイクロアレイ解析)

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)。

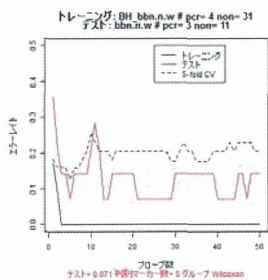


図1 腫瘍検体を用いたクラスタリング



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

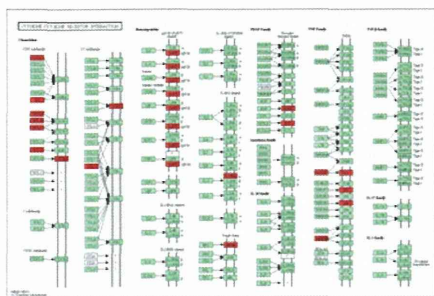
図2 HER2陰性乳がんを対象とした判別解析



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)



### 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

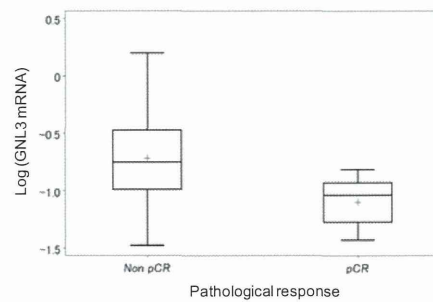


表1 pCRと相関する因子 (多変量解析)

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

## 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。Preliminaryな結果であるが、BRCA1の発現量が低いほうが、CBDCAの上乗せ効果が高い傾向にあった。現在、症例数と追加して検証を試みている。

### D. 考察

テロメラーズは発がん過程に関与すると同時に幹細胞機能維持に関与することが示唆されている。本研究では、これまで知られていなかった複合体としてhTERT/NS/BRG1を同定した。この複合体はがん幹細胞の機能維持に直接的に関与することが示された。加えて、この複合体は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が示された。次に、NSを過剰発現させたTNBCの人工がん幹細胞モデルを作成し、抗がん剤感受性のアッセイ系を確立した。さらに、hTERT定量のための新規ELISA系を確立し、細胞株におけるhTERT蛋白の定量が可能であることが確認できた。今後は、臨床検体を用いてNS/GNL3Lの発現状況と臨床経過の相関を検討することが重要と考えられる。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。さらに、TNBC患者の血清において、hTERT定量を行い、診断、治療効果判定、再発の早期スクリーニングなどへの応用を目指す。

本研究において、BRCA1/2、PTEN、CLDN1及びCLDN2遺伝子のプロモーター領域について、qMSP測定によるDNAメチル化解析を行なった。その結果、BRCA1プロモーター領域の高メチル化がTNBCに特異的に存在することを見いだした。TNBCでは、BRCA1の生殖細胞系列変異が多く、体細胞と突然変異はごく低頻度であることが知られている。(Gonzalez-Angulo, Clin. Cancer Res., 2011). 今回の検討により、BRCA1の不活化の原因にエピジェネティックな機構が深く関与しており、これはTNBCに特異的に存在することが明らかとなっ

た。一部の乳がんで、低レベルながらもわずかに上昇しているメチル化が認められる。このメチル化は、がん細胞のほんの一部で起こっているメチル化と考えられ、がん全体の性質を反映している可能性は低い。多くの報告において、定性的なMSP法を用いて高いメチル化の頻度を検出している(Veeck, J. Clin. Oncol., 2010; Stefansson, Epigenetics, 2011; Gacem, Cancer Epidemiology, 2012)。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できるため、このよう低レベルのメチル化を示した検体を陽性と判定している可能性が高い。一方、本研究で行なっているqMSP法は、解析サンプル中のメチル化されている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となる。これまで、多くの論文でBRCA1のメチル化解析の報告がなされているが、上述の定量性の問題に加え、解析領域がプロモーター領域ではなく、エクソン1内部である論文が極めて多い。DNAメチル化による遺伝子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いる。従って、転写抑制に関わるメチル化を解析するためには、この領域にプライマーを設計することが非常に重要である。PTEN遺伝子についても同様であり、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いるが、定量性の問題、及び、解析領域の問題により、それらの報告では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高い。BRCA1/2を欠失した細胞株がPARP阻害剤に高感受性であることが示されて以来、抗がん剤としてのPARP阻害剤が注目されている。

当院でほぼ均一な方法で治療が行われ、ほぼ均一な基準で診断が行われ、長期フォローアップされたリンパ節転移陰性浸潤性乳がん530例において、TN乳がんの比率と他群に比べての予後を算出した。TN乳がんは14%で海外の比率や国内多施設の比率とほぼ同様であった。TN乳がんは予後不良とされているが今回の検討では、luminalに比べれば相対的に予後不良であるが、10年無再発生存率は78.2%、乳がん特異的10年生存率は87.5%

と、欧米に比べかなり高かった。今回の検討では、TN乳がんにおいて術前化学療法抵抗性のマーカーとして検討すべき候補として、BRCA1関連分子、トランスポーター分子、上皮間葉移行関連分子、卵巣明細胞腺がん関連分子、などを選び検討した。これらの中から、有意なマーカーが出てくることが期待される。また研究所への協力、基盤整備も進み、TN乳がんの基礎研究進展に役立つと考えられる。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た。他施設の研究から分子レベルでTN乳がんを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。

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。Preliminaryな結果であるが、BRCA1の発現量が低いほうが、CBDCAの上乗せ効果が高い傾向にあった。

## E. 結論

抗がん剤感受性のアッセイ系を確立した。さらに、hTERTの定量のための新規ELISAを開発した。今後は、臨床検体への幅広い応用を目指していく。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。

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。

BRCA1プロモーター領域のメチル化はTNBCに特異的に存在し、その頻度は24%だった。BRCA1のメチル化を正確に測定することは、乳がんの性質を知る上で重要である。又、PARP阻害剤の感受性マーカーとなりうる。

TNBが、1) EGFRやサイトケラチン5/6などの上皮系マーカーが陽性な腫瘍、2) BRCA1の異常がある腫瘍、3) がん幹細胞マーカー陽性、EMTの形質をもつ腫瘍の3つに大きく分類されることが示唆された。このことは、今後のTNBの創薬を効率的に行う上で土台となるデータとなる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagatsuma AK, Shimizu C, Takahashi F, Tsuda H, Saji S, Hojo T, Sugano K, Fujii H, Fujiwara Y.  
Impact of recent parity on histopathological tumor features and breast cancer outcome in premenopausal Japanese women Breast Cancer Res. Treat. 2013; 138(3): 941-950.
- 2) Kurebayashi J, Kanomata N, Shimo T, Yamashita T, Aogi K, Nishimura R, Shimizu C, Tsuda H, Moriya T, and Sonoo H. Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity and high Ki67 labeling index predict poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone. Breast Cancer, in press
- 3) Tanabe Y, Hashimoto K, Shimizu C, Hirakawa A, Harano K, Yunokawa M, Yonemori K, Katsumata N, Tamura K, Ando M, Kinoshita T, Fujiwara Y. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. Int J Clin Oncol. 2013 18:132-138.
- 4) Nagao T, Kinoshita T, Hojo T, Tsuda H, Tamura K, Fujiwara Y. The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics. Breast. 2012 21:289-295.
- 5) Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K. Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells. Cancer Sci. 2012 Sep;103:1665-1671.
- 6) Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y. Prognostic

impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. Breast Cancer. 2013 Apr 13. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

#### 国内学会

1. 大河内(高田)江里子, 橋本淳, 津田均, 宮本和明, 田村研治, 牛島俊和. トリプルネガティブ乳がんでは *BRCA1* プロモーターの高メチル化が高頻度に認められる. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
2. 津田 均. Intrinsic subtype 分類の病理学的考え方 (Histological significance of intrinsic subtype classification). 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会、国内合同シンポジウム、2012.7.26~28、大阪
3. Naoko Okamoto, Tomoyasu Kato, Masayuki Yoshida, Satoko Yamaguchi, Mami Yasukawa, Keita Kinoshita, Kiyoko Fukami, Hitoshi Tsuda, Kenkichi Masutomi. Analysis of cancer stem cell markers in ovarian cancers. 第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月19日~21日 札幌

#### 国際学会

1. Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. EBAG9 immunoreactivity is a potential prognostic factor for poor outcome of breast cancer patients with adjuvant tamoxifen therapy. 35th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 4-8, 2012, San Antonio, TX.
2. Tsuda H, Yoshida M, Miyagi-Maeshima A, Sasaki-Katsurada Y. Mucinous breast carcinoma associated with lo