

bular neoplasia: A potentially characteristic subset with abnormality of cell adhesion and polarity molecules, and lack in neuroendocrine differentiation. 102nd Annual Meeting of the United-States-and-Canadian-Academy-of-Pathology (USCAP), Mar 2-8, 2013, Baltimore, MD.

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

II. 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(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。昨年度までに、少数例の乳がん検体を用い、がん抑制遺伝子である *BRCA1/2* 及び *PTEN* 遺伝子プロモーター領域の定量的 DNA メチル化解析を行い、*BRCA1* の高メチル化が TNBC に高頻度に存在することを見いだした。今年度は解析症例数を増やし、121 症例の乳がん検体を用いて *BRCA1* の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は 9 症例の乳がんに認められ、その全てが TNBC であった(TNBC 38 症例のうち 24%)。BRCA1 の免疫組織化学染色では、*BRCA1* のメチル化を示した乳がんは顕著にその染色性の消失を認めた。本研究により、*BRCA1* のエピジェネティックな不活化は TNBC に特異的に存在することが明らかとなった。*BRCA1* のメチル化による乳がんの層別化は、今後、抗がん剤に対する治療反応性を検討する上で有用であると期待できる。

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 (TNBC) は乳がん全体の 10-20% を占め、内分泌療法が適用できず、また、HER2

陽性乳がんのような分子標的薬もなく、他の亜型と比較して予後不良である。TNBC は極めて不均一な乳がんとして知られ、TNBC の中での治療奏効率の差異が大きいことが問題となっている。従って、TNBC 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 TNBC の本体解明、新規診断・治療の開発を目指すことを目的とした。昨年度までに、乳がんのがん抑制遺伝子 *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、乳がん細胞株(18 系統)及び乳がん検体(42 症例)を用いて qMSP 法を実施した。その結果、*BRCA1* プロモーター領域の高メチル化が TNBC の 12 例中 2 例(17%)と高率に存在することを見いだした。今年度は、症例数を増やして結果の確認をするとともに、他のサブタイプとの比較も行った。

B. 研究方法

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)。

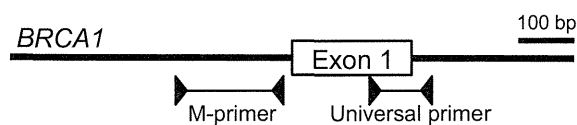


図 1 メチル化解析に用いたプライマー

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 *Sss*I 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。

$$\text{メチル化レベル(\%)} = \frac{\text{検体中のメチル化DNA分子数} / \text{検体中の全DNA分子数}}{\text{M-control中のメチル化DNA分子数} / \text{M-control中の全DNA分子数}} \times 100$$

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。

(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。

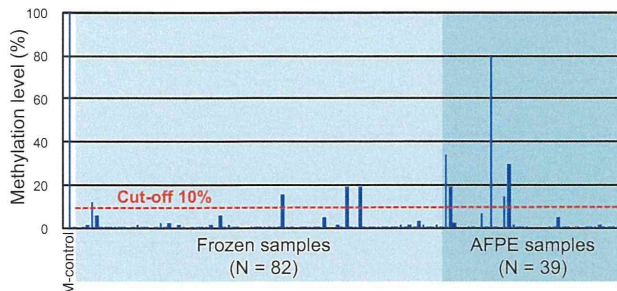


図3 乳がん検体121症例における*BRCA1*プロモーター領域のメチル化

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。

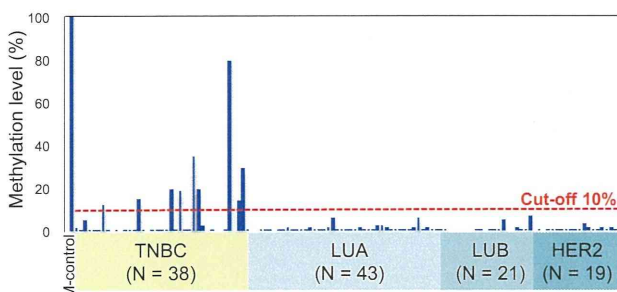


図4 *BRCA1*プロモーター領域メチル化の乳がんサブタイプ別比較

2) 乳がん検体の *BRCA1* 免疫組織化学染色

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では有意に頻度が高かった ($P<0.001$)。

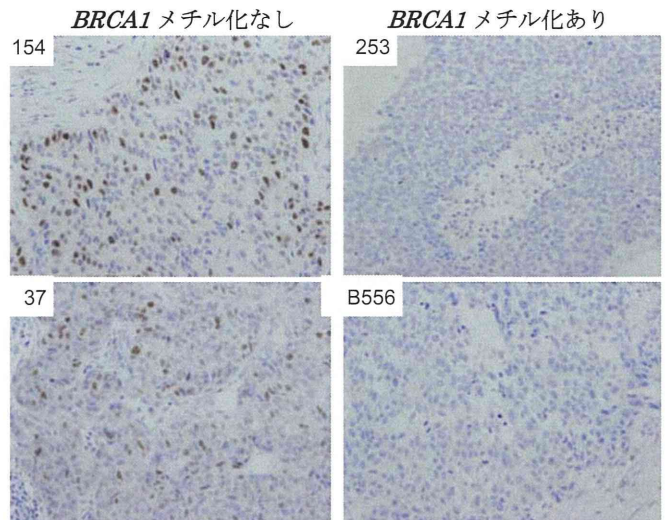


図5 乳がん検体における*BRCA1*の免疫染色の結果

D. 考察

今年度は解析症例数を増やし、121 症例の乳がん検体を用いて 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は9 症例の乳がん認められ、その全てが TNBC であった。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。

一部の乳がんでは、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(図4)。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。

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。しかし、TNBC では、Phase III の臨床試験で有効性は示されなかった(O'Shaughnessy, *J. Clin. Oncol.*, 2011)。この試験では TNBC を特に層別化しておらず、*BRCA1* のメチル化をマーカーに用いて症例を選別することにより、有効性を示せる可能性がある。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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.

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

なし

3. その他

なし

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 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

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。本年度は、発がん過程で重要な役割を担うことおよび幹細胞の機能維持にも関わることが知られているテロメラーゼに着目し、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。このELISAを用いて、細胞株でのhTERTの定量が可能であった。今後、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）患者の血清など臨床検体を用いてhTERT定量を行うことで、治療効果判定や再発の早期発見に役立てていく予定である。

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り、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hTERT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。

hTERTの発現量はテロメラーゼ活性とよ

く相関することがわかっており、臨床検体でも、免疫染色を用いて、乳がん組織中のhTERT発現量が予後と相関することが報告されている。

最近、乳がんにおいて、血清hTERT量が臨床病期と相関していることが報告された。さらに、hTERT遺伝子座にトリプルネガティブ乳がん（TNBC）のリスクと強く相関するSNPが報告され、TNBCにおけるhTERTの役割が示唆された。

このようなことから、TNBCの患者検体でhTERTの定量を行うことができれば、予後予測、治療効果判定、再発の早期発見などに有用であると考えられた。しかしながら、現在までは、簡便で信頼性の高いhTERTの定量法は確立されていなかった。

従って今年度、本研究では、hTERT定量のためのELISAの系を確立することを目的とした。この系を用いて、今後臨床検体の解析を行い、診断や治療に応用していく予定である。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮) 特記事項なし。

C. 研究結果

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。ブランク上限(LOB)は0.03ng/ml、変動係数を10%未満を誤差許容範囲と設定

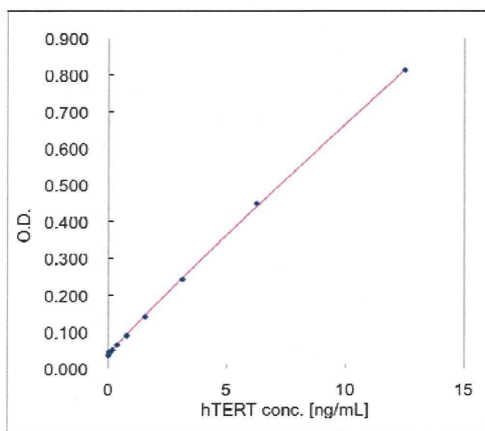


図1.新規hTERT ELISAの標準曲線

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)。

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, OVISE, 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)。

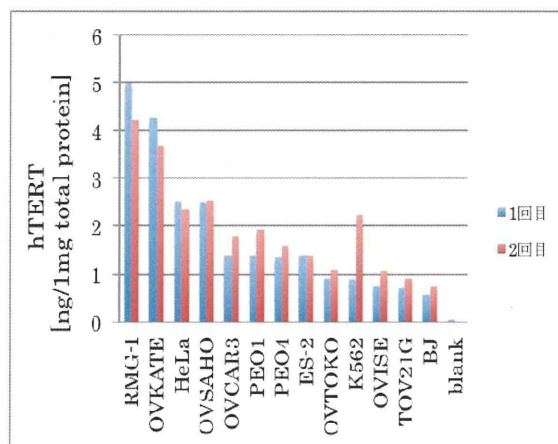


図2.各種癌細胞株の内在性hTERTの定量

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)。

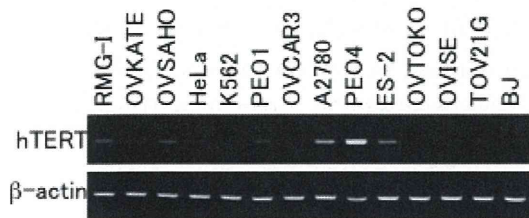


図3. 各種癌細胞の内在性hTERT mRNA

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, HCC1937, 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)。

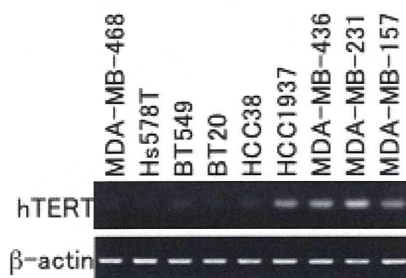


図4. TNBC細胞株の内在性hTERT mRNA

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)。

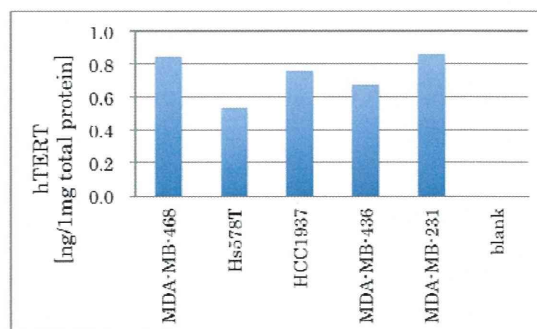


図5. TNBC細胞株の内在性hTERTの定量

D. 考察

hTERTは発癌の分子機序、がん幹細胞の維持に関わっており、臨床検体でもhTERTの定量の重要性が示唆されているため、簡便で信頼性の高い定量システムの開発が重要と考えられる。本研究では、我々は、新規モノクローナル抗体を用いて新規のELISAを開発した。このELISAは、既存のELISAと比較しても感度に優れており、再現性も良好であった。また、細胞株を用いた実験では、内在性のhTERTの定量が可能であることがわかった。また、hTERTの蛋白量とmRNA量は必ずしも相関しておらず、mRNA定量は蛋白量の予測には不十分であり、蛋白自体の定量が重要であることが示唆された。

今後はまず乳がん患者の血清において、hTERT定量を行う予定である。このELISAは簡便で再現性が高いため、臨床応用が可能であれば、診断、治療効果判定、再発の早期スクリーニングなどに有用であると考えられ、幅広い癌治療への応用が期待され

る。

E. 結論

新規モノクローナル抗体を用いて、hTERTの定量のための新規ELISAを開発し、その性能を評価した。このELISAは感度と再現性に優れ、細胞株では内在性のhTERTを検出することが可能であった。今後は、臨床検体への幅広い応用を目指していく。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

国際学会

該当なし

国内学会

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

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

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 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。BRCA1遺伝子変異を有するMDA-MB-436株は、他の細胞株と比較し、10倍以上Olaparibに対して感受性であった。感受性株であるMDA-MB-436と非感受性株であるMDA-MB-231を用いた細胞障害性抗がん剤との併用試験では、感受性株において相以上の併用効果を認めた。抗がん剤の中では、CPT-11との併用効果が最も優れていた。CPT-11はvivo実験においても、vitroでの結果と同様にOlaparibとの併用効果を認めた。以上の結果より、Olaparibとの併用には、CPT-11が有望であり、またBRCA1遺伝子変異はOlaparibの感受性因子であると同時に、DNA障害性抗癌剤との併用効果の規定因子でもあると考えられた。

A. 研究目的

研究目的は、新規未承認薬であるOlaparibのトリプルネガティブ乳がん細胞株における感受性、および細胞障害性抗がん剤との併用効果を検討し、併用薬としてのベストパートナーを探索するとともに、その感受性規定因子を明らかにすることである。具体的には、①トリプルネガティブ乳がん細胞株9株を用いOlaparibの感受性を確認する、②Olaparibと細胞障害性抗がん剤の併用効果をcombination index法を用いて検証する、③Olaparibと細胞障害性抗がん剤の併用効果得をマウス移植モデルで確認する、④以上の検討から、細胞障害性抗がん剤との併用効果を規定する因子を探索する、である。

B. 研究方法

(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15mg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。

C. 研究結果

(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（図1）。

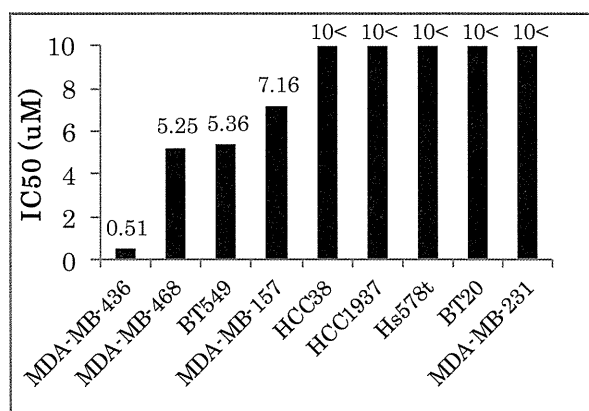


図1 トリプルネガティブ乳がんに対するOlaparibの感受性

(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

MDA-MB-436とMDA-MB-231を用いてCombi

nation 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加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）。

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

表1 Olaparibと細胞障害性抗がん剤との併用効果（CI法）

(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

MDA-MB-436細胞をマウスの背部に移植し、すべての推定腫瘍体積が、100 mm³以上に到達した時点で治療を開始した。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。

D. 考察

トリプルネガティブ乳がんは、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。PARP阻害剤はPARPによる塩基除去修復経路を介したDNAの一本鎖切断修復を阻害し、アポトーシスを誘導する。本薬剤は、DNA修復機能の障害を有する腫瘍に対する治療やsynthetic lethalityの概念を利用したDNA障害性抗がん剤との併用療法として治療開発が行われている。トリプルネガティブ乳がんはBRCA関連腫瘍、BRCA1遺伝子のメチル化、PTENタンパク欠損などのDNA修復機構に障害を有する割合が高く、新たな治療戦略としてPARP阻害剤が期待されている。本検討では、トリ

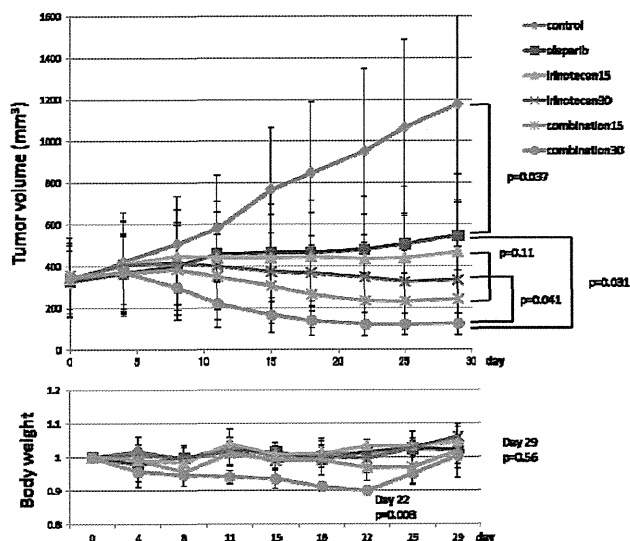


図2 マウス移植モデルにおけるOlaparibとCPT-11の併用効果

プルネガティブ乳がん細胞株を用いた薬効試験の結果、BRCA1遺伝子変異をもつ腫瘍においてOlaparibの感受性が高い事は、従来の報告通りであったが、細胞障害性抗がん剤との併用においても、同遺伝子変異を持つ細胞株の方が、その効果が高い事が示唆された。これらの細胞障害性抗がん剤の中ではCPT-11がもっとも併用効果が高く、腫瘍移植モデルにおいても、その効果が確認された。併用効果のメカニズムについての詳細は不明であるが、DNAの修復作用を複数にわたって阻害することで、細胞障害性抗がん剤の感受性を高めた可能性がある。CPT-11との併用効果が、他の抗がん剤との併用効果より高いことに関しては、薬剤排泄などのその他のinteractionなども含めて、今後検討する予定である。

E. 結論

BRCA1遺伝子変異陽性のトリプルネガティブ乳がんに対して、Olaparibは単剤で有効であるのと同時に、細胞障害性抗がん剤との併用において、相加以上の効果が確認された。その中でもCPT-11との併用効果が最も高かった。併用効果のメカニズムについてはさらに詳しい検討が必要であり、現在、併用効果を規定する因子としてトランスポーターに関係した腫瘍内薬物濃度の解析実験を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katanasaka Y, Kodera Y, Kitamura Y, Morimoto T, Tamura T, Koizumi F. Epidermal growth factor receptor variant ty

- pe III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Mol Cancer*. 2013 Apr 25;12:31. doi: 10.1186/1476-4598-12-31.
2. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Sci.*, 103(11):1946-54, 2012.
 3. Kondo S, Ueno H, Hashimoto J, Morizane C, Koizumi F, Okusaka T, Tamura K. Circulating endothelial cells and other angiogenesis factors in pancreatic carcinoma patients receiving gemcitabine chemotherapy. *BMC Cancer*. 2012 Jun 25; 12:268. doi: 10.1186/1471-2407-12-268.
 4. 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.*, 103(9):1665-71, 2012.
 5. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer.*, 106(4):727-32, 2012.
 6. Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Nida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res.*, 1(7):823-33, 2011.
 7. Nishio M, Yamanaka T, Matsumoto K, Kimura H, Sakai K, Sakai A, Sone T, Horiike A, Koizumi F, Kasahara K, Ohira T, Ikeda N, Saijo N, Arao T, Nishio K. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.*, 6(11):1889-94, 2011.
 8. Arao T, Matsumoto K, Furuta K, Kudo K, Kaneda H, Nagai T, Sakai K, Fujita Y, Tamura D, Aomatsu K, Koizumi F, Nishio K. Acquired drug resistance to vascular endothelial growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. *Anticancer Res.*, 31(9):2787-96, 2011.
 9. Taguchi F, Kodera Y, Katanasaka Y, Yanagihara K, Tamura T, Koizumi F. Efficacy of RAD001 (everolimus) against advanced gastric cancer with peritoneal dissemination. *Invest New Drugs.*, 29(6):1198-205, 2011.
 10. Kodera Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio K, Tamura T, Koizumi F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.*, 13(3):R66, 2011.
 11. Yamada K, Yamamoto N, Yamada Y, Nookihara H, Fujiwara Y, Hirata T, Koizumi F, Nishio K, Koyama N, Tamura T. Phase I dose-escalation study and biomarker analysis of E7080 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.*, 17(8):2528-37, 2011.
 12. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, Konno T, Katsumata N, Ando M, Aogi K, Koizumi F, Nishio K, Fujiwara Y. Fc(gamma)R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol.*, 22(6):1302-7, 2011.
 13. Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, Naitou H, Maeda N, Koizumi F, Miyagawa S, Ohashi N, Oku N. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer.*, 127(11):2685-98, 2010.
2. 学会発表
なし

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
なし
3. その他
なし

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 当院にて1995～2000年の間にリンパ節転移陰性浸潤性乳癌で手術療法を受けた530名の女性につき切除組織のホルモン受容体とHER2の免疫組織化学とHER2 FISH法により、75例（14%）のトリプルネガティブ（TN）を同定した。10年無再発生存率は78.2%、10年生存率は87.5%であり、ホルモン受容体陽性群に比べて予後不良であった。TN乳がんの中で術前化学療法の途中で病状進行（PD）となる例の予測因子を見出す目的で、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）のパラフィン包埋病理ブロックから構築された組織マイクロアレイ（TMA）を用い、免疫染色による抗体スクリーニングを開始した。

A. 研究目的

本年度における研究目的は、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ための検討を行うことにある。

1については、TN乳がんの診断に必要なエストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PgR）、HER2の免疫組織化学による測定法が標準化された時期が2000年以降であるため、わが国におけるTN乳がんの長期予後に関するデータを得る目的で実施した。

2については、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変化を明らかにする目的で実施した。

並行して、TN乳がん細胞におけるBRCA1遺伝子のDNAメチル化研究、多層的オミックス研究等の研究支援を進めた。

B. 研究方法

(1) 研究デザイン

i) 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、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。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。

ii) 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、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。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（pH6.0）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。

(2) 研究支援

BRCA1 DNAメチル化を調べた乳癌症例103例（TN乳がん31例、その他の乳がん72例）においてパラフィンブロックから切片を作製し、抗BRCA1抗体（マウス単クローナルAb-1, Calbiochem）による免疫組織化学的検索と評価

を実施した。

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	Calbioc hem
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

(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) 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(浸潤癌巢が含まれず)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-en-

rich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($p = 0.0007$)。

(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

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乳がんと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。

(3) 研究支援

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。

D. 考察

国立がん研究センター中央病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、卵巣明細胞腺癌関連分子、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。

E. 結論

早期のpN0乳がんの中でTN乳がんの比率、予後について検討した。また、化学療法抵抗性の指標となるバイオマーカーの探索をTMA構築と免疫組織化学を用いた抗体スクリーニングによって進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with three different cut-off values and histological and nuclear grades in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. *Breast Cancer*, in press

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

2. 学会報告

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

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.

Tsuda H, Yoshida M, Miyagi-Maeshima A, Sasaki-Katsurada Y. Mucinous breast carcinoma associated with lobular neoplasia: A potentially characteristic subset with abnormality of cell adhesion and polarity molecules, and lack in neuroendocrine differentiation. 102nd Annual Meeting of the United-States-and-Canadian-Academy-of-Pathology (USCAP), Mar 2-8, 2013, Baltimore, MD.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし
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）を含む乳がん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。1)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。PI3CA変異を35%にみとめた。2)乳がん562症例を対象に、最も多い組織型の浸潤性乳管がん（IDC）と他の亜型との術前化学療法の奏効と無再発生存期間と全生存期間を検討した。結果、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。又術前化学療法の奏効に関しても、metaplastic carcinomaや小葉がんは有意にpCRが少なかったが、同様に有意にpCRが少ないアポクリン癌の予後は良好であった。3)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、いずれのカットオフを用いても、組織学的悪性グレードとDFSに強い相関をみとめた。ただし、TNBCに（ER- HER2-）に関しては、Luminal A/B（ER+, HER2-）と比較して相関が低い傾向にあった。

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。

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症例を対象に、術前化学療法の奏効と無再発生存期間を解析した。

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症例を対象に、Ki-67値と組織学的悪性グレードとDFSとの相関について検討した。

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。

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。

(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

TNB試験の対象症例の背景を図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
	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
	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。

表2 たんぱく質発現及び遺伝子変異

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。

表3 pAKT及びpERK1/2に相関する因子

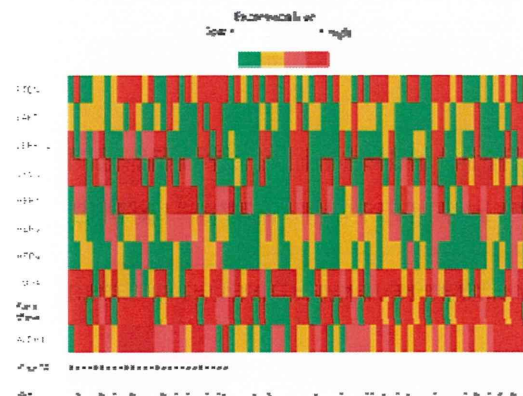
		p-value
pAKT	<i>PIK3CA</i> mutation	0.63
	HER1	0.64
	HER3	0.23
	HER4 (membrane)	0.004
	HER4 (cytoplasmic)	0.001
	IGF1R	0.17
	PTEN	0.64
pERK1/2	<i>PIK3CA</i> mutation	0.21
	HER1	0.64
	HER3	0.09
	HER4 (membrane)	0.35
	HER4 (cytoplasmic)	0.28
	IGF1R	0.17
	ALDH1	1.00

Basal subtype 0.44

Markers	number	%
<i>PIK3CA</i> 変異	26	35
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

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1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2