

201220022B

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22-24年度 総合研究報告書

研究代表者 田村 研治

平成 25 (2013) 年 5 月

<目 次>

I.	総合研究報告書	
	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.	研究成果の刊行に関する一覧表	27
III.	研究成果の刊行物・別刷	31

I. 総合研究報告書

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。3年間の研究班の成果として、(1)テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の新規結合パートナーである Nucleostemin(NS)及び類似タンパク質である GNL3L ががん幹細胞解析の機能維持に必須であること、(2)NS や Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)の発現量が、TNB に対する術前化学療法完全寛解(pCR)に相関すること、(3)hTERT/NS/BRG1 複合体がM期進行に寄与すること、(4) NS 過剰発現がん幹細胞モデルを用いた抗がん剤感受性のアッセイ系を確立したこと、(5)テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の定量のためのELISAを開発し、細胞株・血清レベルでの測定が可能になったこと、(6)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タンパク質発現が消失していることを明らかにしたこと、(7)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、(8)EGFRやサイトケラチン5/6の発現の有無が、TNBC細胞株に対するmTOR阻害剤の感受性を規定すること、(9)TNBの患者の予後を規定する分子異常として、HER4、pAKT、pERKを同定したこと、(10)マイクロアレイを用いた解析によりpCRを予測する遺伝子群候補として、特にSTAT3が重要であることを同定したこと、(11)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、TNB術前化学療法症例において増悪した症例では、TWIST, SNAIL1/2, Vimentin, NSなどの発現量が高かったこと、(12)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、(13)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。

研究分担者

	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
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	小泉 史明 国立がん研究センター研究所 11F 支援施設 室長
増富 建吉 国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野 分野長 *平成22年4月～平成23年3月	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
大岡 静衣 国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野 研究員 *平成23年4月～平成24年3月	木下 貴之 国立がん研究センター中央病院 乳腺外科 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 *平成24年4月～平成25年3月	

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。

テロメラーゼは細胞の不死化に重要な役割を担うことで発がんの分子機序に深く関わると同時に幹細胞の機能維持にも重要な役割を果たすことが知られている。しかしながらテロメラーゼががん幹細胞の機能維持にどのように関わっているかについては十分な検討がなされていない。また、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いるが、現在までは、臨床検体に応用可能な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。

本研究では、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 と複合体を形成することを立証し、この複合体ががん幹細胞の機能維持に関わることを細胞生物学的に確認する。また、これらの因子を過剰発現して人工がん幹細胞モデルを作成する。このモデルを用いてトリプルネガティブ乳がん (TNBC) を選択的にターゲットとする薬剤スクリーニングを行うための、抗癌剤感受性アッセイ系を確立する。さらに、hTERT 定量のための新規 ELISA の系を確立する。

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 の中での治療奏功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。我々の研究室ではこれまでに、高精度定量法であるメチル化解析技術、定量的 methylation-specific PCR (qMSP) 法を確立、様々ながんが異常メチル化を検出してきた。本研究ではまず始めに、乳がんのがん抑制遺伝子として知られる *BRCA1/2* 及び *PTEN* 遺伝子、さらに、*CLDN1* 及び *CLDN2* 遺伝子について、qMSP 測定条件を決定した。また、本研究班で材料として豊富に所有するアセトン固定・パラフィン包埋 (AFPE) 検体で qMSP が実施可能であることも確認した。決定した条件を用い、乳がん細胞株 (18 系統)、及び、乳がん検体 (121 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は TNBC に特異的に存在することが明らかとなった。

トリプルネガティブ (TN) 乳がんの中で化学療法抵抗性に関わる分子マーカーを見出すための研究系を確立することにある。TN 乳がんの中には術前全身化学療法に対して抵抗性であるだけでなく治療中に腫瘍が逆に増大する病状進行 (PD) 例が 5% 程度の頻度で存在する。このような例に共通してみられる分子変化と、対照の化学療法に反応性を示す例の分子変化を比較することで、化学療法に抵抗性に関わる分子を明らかにできる可能性がある。

本研究では、①当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、②TN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った。

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、過去の例に対して改めて免疫染色、FISHを標準的な方法によって行い、当施設における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。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が。

②については、このような例に共通してみられる分子変化と、対照例群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。

PARPやBRCA1/2は、どちらもDNA修復酵素の1つである。第II相試験において、BRCA1/2遺伝子に胚細胞変異を有する家族性乳がん、卵巣がんPARP阻害剤が著効することが報告された。又、TNBにおいてはBRCA遺伝子変異の頻度は少ないものの、BRCA1/2蛋白が失活しているものが多く、ランダム化第II相試験では、標準的治療法にPARP阻害剤を加えることで有意に全生存期間を延長することが示された。TNBに対する、他の期待される標的分子には、シグナル伝達系下流に位置するmTORがある。

本研究班は、TNBに対する、標的分子の異常を指標とした個別化治療の確立を目標とする。そのため、1)細胞株を用いた標的分子の同定と抗腫瘍薬のスクリーニング、2)臨床検体を用いた標的分子異常の検出、臨床効果との相関の検討、3)前向き臨床試験を用いた治療法の最適化を試みる。

B. 研究方法

1) TERTとNS

TERTとNSの物理的相互作用については共免疫沈降法を用いて確認した。さらに、hTERT、NSのそれぞれの結合責任領域をtruncation mutantの293T細胞での過剰発現系を用いて強免疫沈降法で解析した。また、NSが、がん幹細胞機能維持に関わることは、確立されたglioblastomaがん幹細胞を用いてNSに対するshRNAでNS発現を人為的に抑制し影響をみた。また逆に、NSを恒常的に過剰発現した際にcolony formation assayと免疫不全マウスを用いての造腫瘍能を確認し、がん幹細胞のマーカーであるCD133やCD44の発現量に及ぼす影響も確認した。

hTERT、NS、BRG1の細胞内局在については蛍光免疫染色したものを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。乳がんおよびTNBCの各種抗がん剤に対する感受性を3D培養系であるCD-DST法の変法、生存性の変化をニュートラルレッドの取り込みによる吸光度の変化によって測定した。

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)。

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 *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

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

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) 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

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

これらの 2 群においては腫瘍のホルマリン固定

パラフィン包埋組織標本を対象にTMAを構築し、免疫染色による分子発現の検討を試みることにした。新たな免疫染色方法 (X) を用いて分子の発現を検討することを踏まえ、下記の通りサンプルサイズを算出した。PD群と対照群におけるXの陽性率の差を、両側検定で、下記の表の α 、検出力 ($1-\beta$) とした場合に必要となるPD群の人数は表1のようになる。

表1. サンプルサイズの算出

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

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

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例のTN乳がん例と、対照群101例を選択した。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2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. in revision) についても免疫染色で検討を行った。

(2) 共同研究支援

TN乳がん36例と対照のluminal型 (HR陽性) 及びHER2-enriched型 (HR陰性、HER2陽性) 例を選び出し、薄切による組織切片を作製、laser-captured microdissectionを行ってDNA抽出用に適した組織サンプルを国立がん研究センター研究所高田江里子博士に提供した。

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。このほか、多層的オミックス研究等の研究の支援を進めた。

表2. 検討に用いた抗体

分子	抗体種類	希釈	商品名	メーカー
BRC A1	Mono (マウス)	1/100	Ab-1	Calbiochem
PARP	Mono (ウサギ)	1/100	E102	Abcam
ABC G2	Poly (ウサギ)	1/200	PAB25160	Abnova
ABC G2	Mono (マウス)	1/200	MAB10478	Abnova
ABC B1	Poly (ウサギ)	1/200	PAB16508	Abnova
SLC O1B3	Poly (ウサギ)	1/100	PAB21099	Abnova
TWI ST	Poly (ウサギ)	1/100	ab49254	Abcam
TWI ST2	Mono (マウス)	1/300	3C8	Abnova
TWI STNB	Poly (ウサギ)	1/50	PAB21491	Abnova
Vimentin	Mono (マウス)	1/200	V9	Dako
SNA IL2	Poly (ウサギ)	1/200	PAB1923	Abnova

4) TNB細胞株を用いた薬剤感受性試験

①TNBにおけるmTOR阻害剤 (エベロリムス) の感受性を規定する分子の同定

高感受性株であるMDA-MB-468株、および非感受性株であるMDA-MB-231株をマウスに移植し、腫瘍生着確認後、everolimusを10 mg/kg/dayの量で、週3回、3週間経口摂取させ抗腫瘍効果を検討した。EGFRの影響は、非感受性株であるMDA-MB-231株、およびMDA-MB-436株に、pVSV-G vectorを用いてwild type EGFRを強制発現させ、またPTENの影響は、PTEN発現を認める、BT-20、およびMDA-MB-231株に、siRNAを用いてPTEN発現をノックダウンし、それぞれの株で、everolimusの感受性を親株と比較した。感受性株であるMDA-MB-468株、BT549株、非感受性株であるMDA-MB-231株、MDA-MB-157株を

用いて、everolimusを0.5、5、50 nMの濃度で1hr暴露させ、細胞回収後western blottingでAKT、Erkの蛋白発現量とリン酸化を検討した。

②TNBにおけるPARP阻害剤 (オラパリブ) の感受性を規定する分子の同定

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。

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。

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。

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法における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) TERTとNS/GNL3L

hTERT-NSは物理的相互作用をする

免疫沈降法にて内在性レベルでのhTERTとNSの物理的相互作用を確認した(図1)。

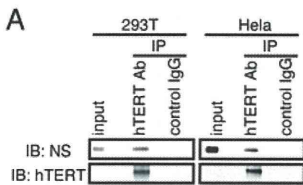


図1: hTERTとNSの内在性レベルでの物理的相互作用の共免疫沈降法による確認。

また、hTERT、NS、GNL3L(NS類似因子)に対する truncation mutant を作製し物理学的相互作用の責任領域を決定したところ、hTERTではN末端側がまたNS、GNL3LではG4-G5領域がこれらの物理的相互作用に必須の領域であることが確認された(図2)。

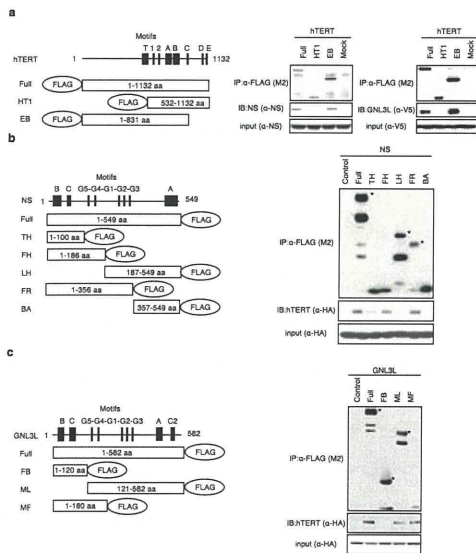


図2: TERTとNS/GNL3Lの結合責任領域の決定。truncation mutant(図左)を過剰発現し免疫沈降後に結合責任領域を同定した(図右)。

NS/GNL3Lはがん幹細胞機能維持に必須の分子である

脳腫瘍がん幹細胞として知られる細胞株(0308)を用いてNSの発現を抑制したところ、がん幹細胞形質の指標となる球状形成能が有意に低下した。

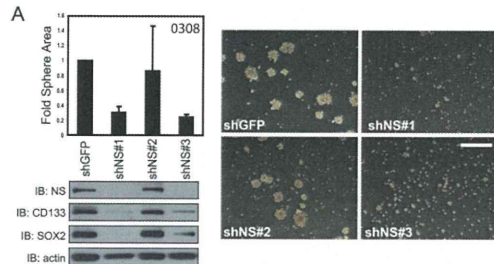


図3: Glioblastomaがん幹細胞でNSの発現を抑制すると、球状形成能およびがん幹細胞マーカーの発現が抑制された。

これと同時にがん幹細胞マーカーであるCD133およびSOX2の発現量も低下することを確認した(図3)。逆にNS/GNL3Lを人為的に過剰発現させた場合、colony formationと免疫不全マウスを用いての造腫瘍能が有意に亢進することを確認した(図4)。また、CD133やCD44などのがん幹細胞マーカーもNS/GNL3Lの発現上昇に伴い有意に上昇することが確認された(図5)。

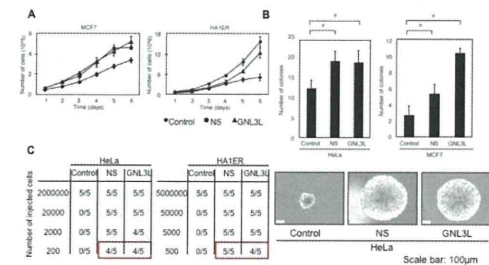


図4: NS/GNL3Lを過剰発現すると、増殖能(A)、コロニー形成能(B)、造腫瘍能(C)が亢進する。

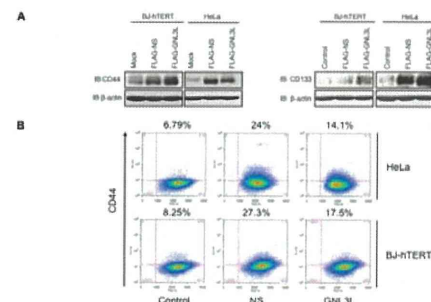


図5： NS/GNL3Lを過剰発現すると、がん幹細胞マーカーの発現が上昇する。

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

上記のがん幹細胞機能維持分子群の時空間的制御機構を明らかにするため、免疫染色法にて細胞の各細胞周期のステージにおけるhTERT、NS、BRG1の局在を観察した。HeLa細胞のM期におけるGFP-hTERT、NS、BRG1の局在を確認したところ、いずれも紡錘糸上で共局在していた。また、我々が作製した新規抗hTERTモノクローナル抗体でもHeLa細胞でM期に紡錘糸が染色された。乳がん組織を新規抗hTERTモノクローナル抗体で染色したところ、HeLa細胞と同様に、M期に紡錘糸様の構造体が染色されることを確認した。

hTERT、NS、BRG1をノックダウンしたHeLa細胞では、コントロール細胞に比較してM期細胞数が有意に増加しており、これらの因子はM期の正常な進行に寄与していることが示唆された。

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

TNBCに対する抗悪性腫瘍薬スクリーニング系を確立するため、NS/GNL3Lを強制発現させた細胞株をがん幹細胞モデルとして用い、抗がん剤感受性のアッセイ系の確立を試みた。

NS、GNL3Lを強制発現させたHeLa細胞とコントロールHeLa細胞を3次元培養であるCD-DST法の変法により培養し、5-FUに対する抵抗性を比較したところ、NS、GNL3Lを強制発現させたHeLa細胞で5-FUに対する抵抗性が見られた。この3次元培養系を用いて、以降の抗がん剤感受性のアッセイを行った。

対照区としてER陽性乳がん細胞株MCF7を用い、試験区として、TNBC細胞株のうち、エベロリムス高感受性株MDA-MB-468細胞と低感受性株MDA-MB-231細胞を用い、それぞれにNSおよびGNL3Lを強制発現させ、薬剤に対するがん幹細胞への感受性を評価した。

まず、乳がんに対する中心的抗がん剤であるアドリアシン、シクロホスファミドそれぞれの単独暴露条件での感受性評価を行った。

アドリアシンに対しては、MCF7細胞では、ネガティブコントロールに比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた (図6a)。一方、MDA-MB-231細胞、MDA-MB-468細胞では、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤の抵抗性に差はみられなかった (図6ab)。これらの結果から、今回の条件では、エベロリムスへの感受性に関わりなく、TNBC細胞株にがん幹細胞形質を付与してもアドリアシンに対する抵抗性は変わらないことがわかった (図6)。

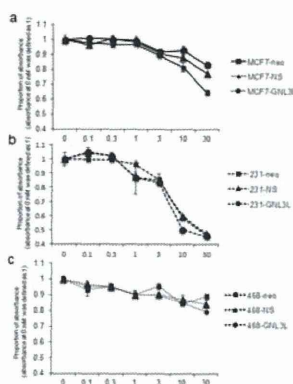


図6： アドリアシンに対する感受性

シクロホスファミドは、MCF7細胞では、ネガティブコントロールに比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた (図7a)。一方、MDA-MB-231細胞では、他の細胞株と比べてシクロホスファミドに対する感受性が高く、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤の抵抗性に差はみられなかった (図7b)。MDA-MB-468細胞ではシクロホスファミドに対する感受性が低く、生存性の低下があまり観察できなかったが、NSおよびGNL3Lを導入することにより若干の薬剤抵抗性を示した (図7c)。これらの結果から、エベロリムス低感受性TNBC細胞にがん幹細胞形質を付与するとシクロホスファミドに対する抵抗性がわずかながら上昇することがわかった (図7)。

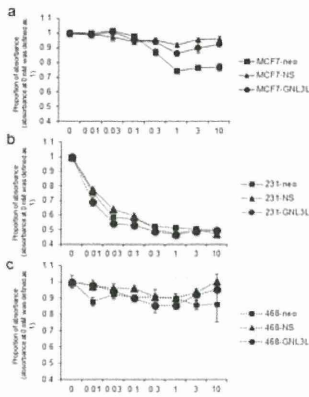


図7：シクロホスファミドに対する感受性

次に乳がん治療における第1選択薬の一つであるパクリタキセルの単独暴露条件での感受性評価を行った。MCF7細胞では、ネガティブコントロールとNSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性に差はなく、がん幹細胞形質を付与してもパクリタキセルに対する抵抗性は変わらなかった（図8）。

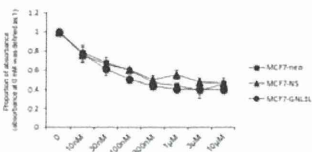


図8：パクリタキセルに対する感受性

次にチロシンキナーゼ阻害剤 (sorafenib) の感受性評価を行った。MCF7細胞およびエベロリムス高感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-468細胞では、ネガティブコントロールに比べ、NSおよびGNL3Lを導入した細胞株において薬剤抵抗性がみられた（図9a、c）。一方、エベロリムス低感受性TNBC細胞株であるMDA-MB-231細胞では、NSおよびGNL3Lを導入しても薬剤抵抗性に差はみられなかった（図9b）。これらの結果から、エベロリムス低感受性TNBC細胞にがん幹細胞形質を付与しても、ソラフェニブに対する抵抗性は変わらないことがわかった（図9）。

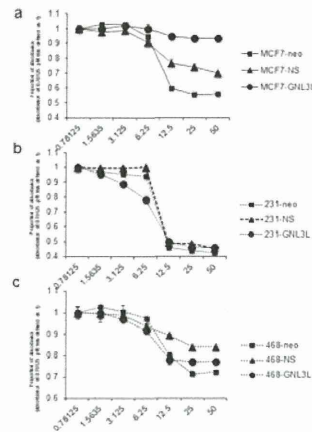


図9：ソラフェニブに対する感受性

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、感度を調べたところ、定量限界(LOQ)0.31ng/mlと良好であった。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10）。

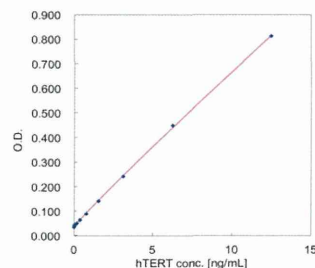


図10：新規hTERT ELISAの標準曲線

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ことが示唆された。

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および非癌細胞（繊維芽細

胞)のコントロール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11)。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11)。

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。

同じ細胞株において、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12)。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。

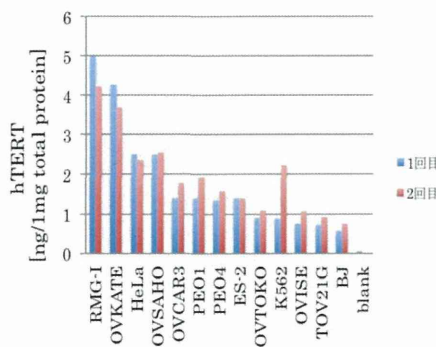


図11：癌細胞株の内在性hTERTの定量

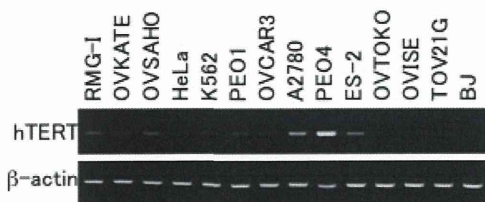


図12：癌細胞株の内在性hTERT mRNA

TNBC細胞株での内在性のhTERTの定量を行った。

次に、TNBC細胞株を用いて、内在性のhTERT定量を行った。まず、TNBC細胞株9種におけるhTERT mRNAをRT-PCR法を用いて測定したところ、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(図13)。



図13：TNBC細胞株の内在性hTERT mRNA

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14)。

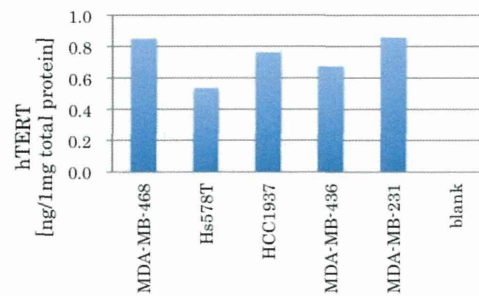


図14：TNBC細胞株の内在性hTERTの定量

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。

2) 乳がん組織、細胞を用いたメチル化解析

(1) 乳がん関連遺伝子の qMSP 測定条件の確立

適切なプライマー設計がなされていなかった *BRCA2*、*PTEN*、*CLDN1* 及び *CLDN2* 遺伝子について、本研究において測定条件を決定した。メチル化 DNA、非メチル化 DNA いずれも、転写開始点直上のヌクレオソームフリー領域にプライマーを設計、コントロール DNA を用いて条件検討を行った。その結果、全ての遺伝子のメチル化 DNA、非メチル化 DNA の各条件で、良好な測定条件を決定できた。

(2) AFPE 検体由来ゲノム DNA の断片化の程度

qMSP 法は高精度定量化を可能とする優れたメチル化解析技術であるが、信頼性の高いデータの取得には、十分量のコピー数を検出できる良質なゲノム DNA を使用することが重要である。本研究ではまず、本研究班で豊富に維持・管理している AFPE 検体の利用が可能か否かを、ゲノム DNA の断片化の程度を解析することで判定した。

AFPE 検体(5例)から抽出したゲノム DNA を電気泳動

し、凍結組織から抽出した DNA と比較した(図 3)。通常、qMSP には、凍結組織から抽出し、制限酵素で断片化したゲノム DNA を用いる。凍結組織由来の DNA は、高分子量に中心を持つスミア上の泳動パターンを呈するのに対し(図 3A)、AFPE 検体由来の DNA は、やや品質が劣るものの高分子量の DNA が高密度に存在し(図 3B)、qMSP に十分利用できることが推定できた。また、収量も約 10mg の検体から 5-8 μ g が得られ、qMSP の測定に十分量であることも確認した。

(3) 乳がん細胞株におけるメチル化レベル測定

TNBC 細胞株 10 系統を含む乳がん細胞株 18 系統における遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルを測定したところ、*BRCA1* 遺伝子において TNBC 細胞株 1 系統で高メチル化を認めた(図 4)。しかし、*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子については、高メチル化を示した細胞株は存在しなかった。

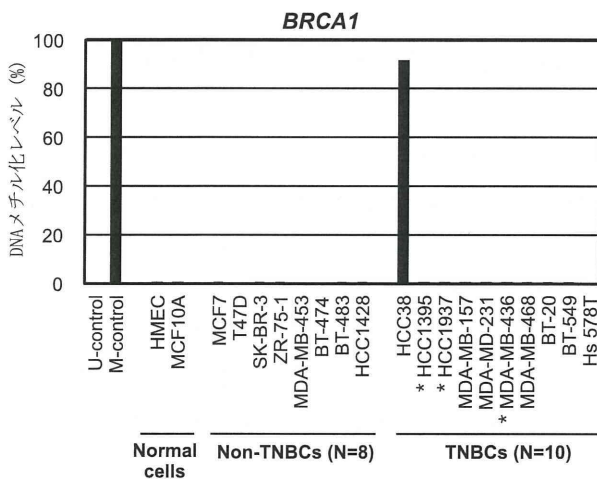


図 4 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株における *BRCA1* プロモーター領域の DNA メチル化レベル
* *BRCA1* 突然変異 (+)

TNBC には一部、claudin-low 乳がんが含まれていることが報告されている。今回、claudin ファミリーの遺伝子のうち、プロモーター領域に CpG アイランドが存在する *CLDN1* 及び *CLDN3* 遺伝子について、乳がん細胞株におけるメチル化レベルを測定した(図 5)。*CLDN1*、*CLDN3* 遺伝子では、それぞれ高メチル化を示す細胞株が数系統存在した。しかし、これらの高メチル化は TNBC とは関係なかった。従って、以後の解析は行なわ

なかった。

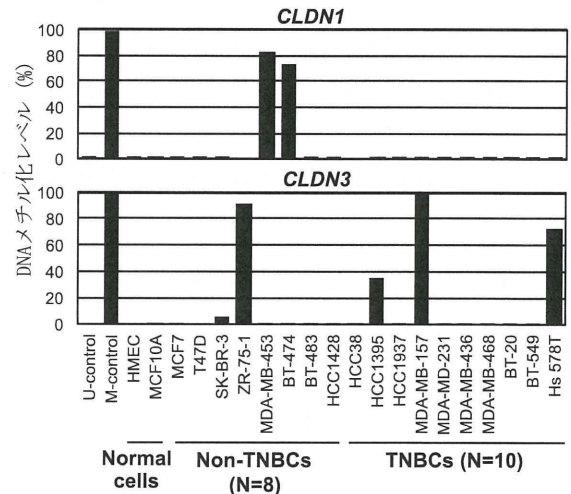


図 5 乳腺上皮細胞及び乳がん細胞株における *CLDN1* 及び *CLDN3* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベル

(4) 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。*BRCA2* 及び *PTEN* 遺伝子については、42 症例の乳がん検体を用いた予備実験において、メチル化レベル上昇を示す検体が一例も存在しなかったため、121 症例を用いた解析は行なわなかった。qMSP 法実施の結果、*BRCA1* プロモーター領域の高メチル化を示した乳がん検体は、解析した乳がん検体全体の中で 9 例存在していた(7.4%)。この 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 6)。

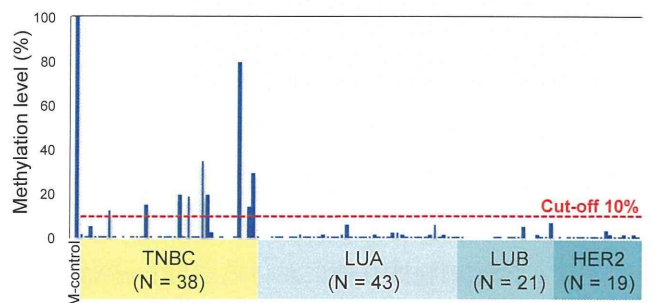


図 6 *BRCA1* プロモーター領域メチル化の乳がんサブタイプ別比較

(5) 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 7)。*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($P < 0.001$)。

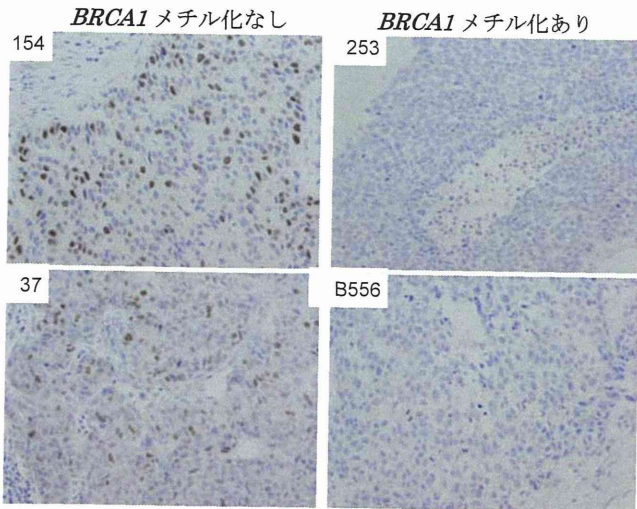


図7 乳がん検体におけるBRCA1の免疫染色の結果

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

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($p = 0.0007$)。

(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の検討からは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り、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、強発現が基質産生癌や骨軟骨化生を伴う癌等、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) 共同研究支援

TN乳がん36例と対照のluminal型(HR陽性)及びHER2-enriched型(HR陰性、HER2陽性)例を選び出し、薄切による組織切片を作製、laser-captured microdissectionを行ってDNA抽出用に適した組織サンプルを研究所に提供した。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のオミックス研究等の個別研究の支援のための検体選択、核酸抽出を行った。

4) TNB細胞株を用いた薬剤感受性試験

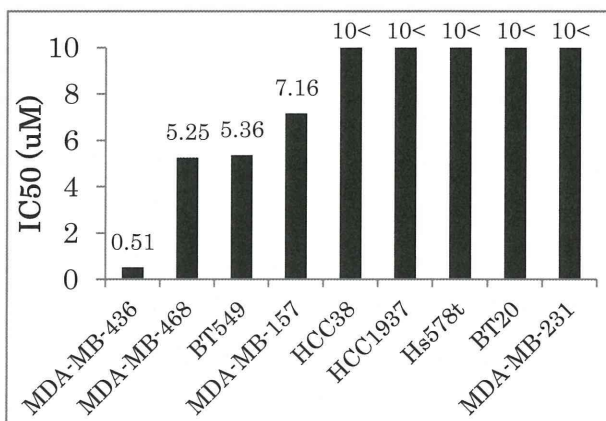
①TNBにおけるmTOR阻害剤(エベロリムス)の感受性を規定する分子の同定

TNB9株中3株において、エベロリムスに対して高感受性($IC_{50}=1nM$ range)であった。TNB9株中2株において中等度感受性($IC_{50}<100nM$)をみとめた。残りTNB9株中4株は薬剤抵抗性($IC_{50}>200nM$)であった。エベロリムスに対する感受性は、標的分子であるmTORの発現量やリン酸化レベル、mTORのシグナル系上流、下流のタンパク質の発現量、従来報告のあったPTENの欠失とは関連しなかった。ただし、高感受性株も低感受性株も低濃度より、mTORの下流のpS6を阻害しているためmTORの阻害は等しく作用していた。高感受性株又は感受性

株の5株では、EGFR陽性もしくはCK5/6陽性であり、いわゆるBasal marker陽性であった。がん幹細胞のマーカーであるsnail, twistは、薬剤抵抗性株で発現量が多い傾向にあった。TNB 細胞株を用いてPTENをsiRNAで抑制しても、EGFR強制発現させてもエベロリムスの感受性は変化しなかった。

②TNBにおけるPARP阻害剤（オラパリブ）の感受性を規定する分子の同定

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

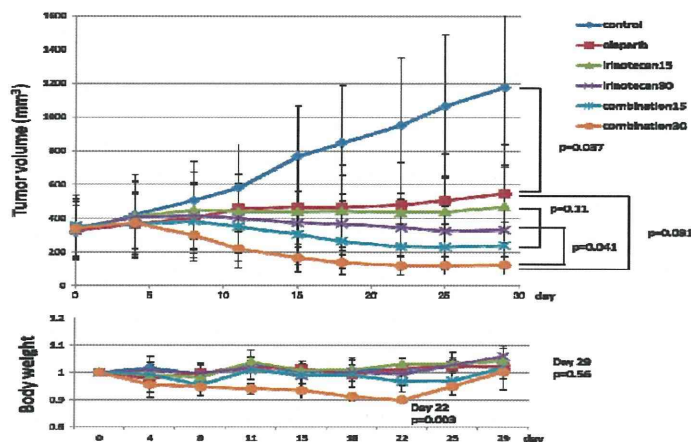
MDA-MB-436とMDA-MB-231を用いてCombination index法により併用試験を行った。CI値は、数値が1に近い値であれば相加的、統計学的に有意差をもって1以下であれば相乗的と判定される。Olaparib感受性株であるMDA-MB-436においては、いずれの細胞障害性抗がん剤との併用においても相以上の併用効果を認めた。特にCPT-11とは強い併用効果を示した。Olaparib非感受性株であるMDA-MB-231においては、CPT-11以外では併用効果を認めなかった。

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。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）

乳がん組織検体での特異的なタンパク質の発現量と術前化学療法のパCRとの相関

II, III期、原発性乳がん530例(術後)の患者背景は、50歳以上が63%、閉経後が58%、組織学的G3以上が46%、Luminal A (HR+/HER2-/Ki67-)が46%、Luminal B (HR+/HER2-/Ki67+, or HR+/HER+)が21%、HER2-enriched (HR-/HER2+)19%、TNBC (HR-/HER2-)が14%であった。Disease-free survivalでは、Luminal Aが統計学的有意に延長し(図6A)、Overall Survivalでは、TNBが有意に短い結果となった。Cox単変量解析によると、D

isease-free survivalの延長に相関する因子として、エストロゲン受容体陽性、Ki67低値、組織グレードの低いもの、NSAS criteriaがeligibleのものが挙げられ、Cox多変量解析では、Ki67低値、NSAS criteriaが残った。

II, III期、原発性乳がん474例（術前化学療法症例）の解析においては、TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)の発現量 (score) とJBCRGの判定基準におけるpCRとの間には強い相関を認めた (P=0.008)。

又、特に、TNBにおいては、他の亜型と比較して、TIL scoreとapoptosis indexとpCRとの間には強い相関を認める傾向があった。

TNB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30000probe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。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%)。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18B)。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。

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	22
	T2	37
	T3	15
	T4	1
腋窩リンパ節転移数	1 個	45
	1-3個	30
	≥4個	49
術式	全摘術	26
	部分切除術	45
組織学的グレード	Grade 1-2	17
	Grade 3	58
術後補助化学療法の種類	アンスラサイクリン系薬剤、又はタキサン系薬剤	45
	アンスラサイクリン系薬剤のみ	20
	タキサン系薬剤のみ	7
	フッ化ピリミジン系薬剤	3

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。

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	40	53
loss	40	
expression	35	
HER1	44	59
over-expression	44	
low/null	31	
HER3	47	63
expression	47	
low/null	28	
HER4 (細胞膜)	31	41
expression	31	
low/null	44	
HER4 (細胞質)	46	61
expression	46	
low/null	29	

pAKT及びpERK1/2に相関する因子

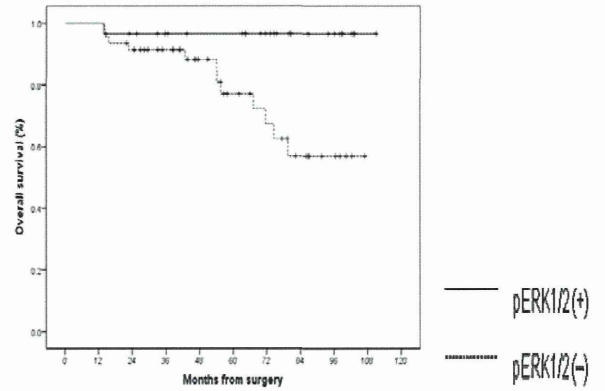
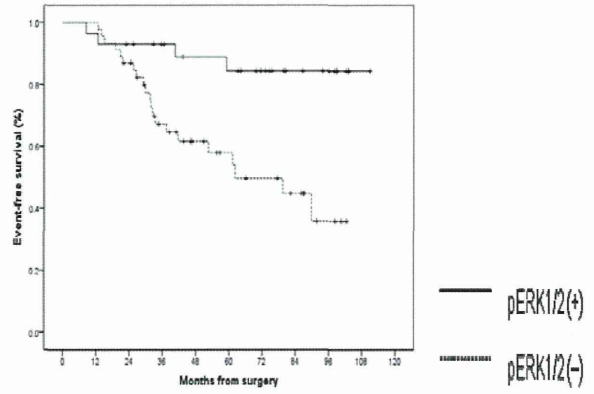
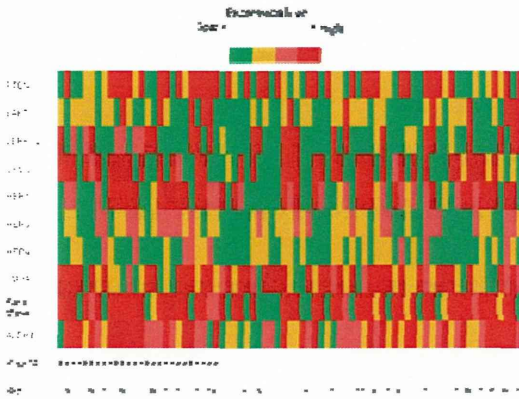
対象症例のTNB組織を用いたがん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無と、リン酸化AKT (pAKT) 及びリン酸化ERK1/2 (ERK1/2) との相関について検討した。

pAKT及びpERK1/2に相関する因子

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	
<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

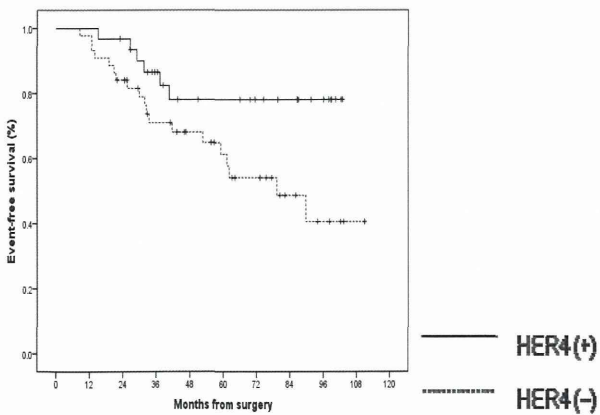
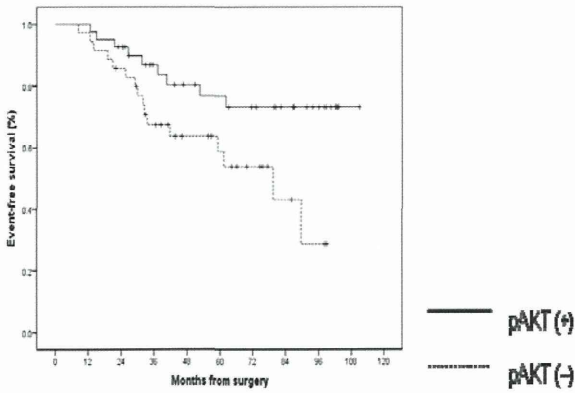
がん関連タンパク質の発現量と遺伝子変異の有無の結果をマップにしたものを図1に示す。



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。