

Table 4 Age-adjusted odds ratio and multivariate adjusted odds ratio with 95% confidence intervals for lifestyle factors in rs3757318

		Risk allele carriers(AA + AG) n = 397					non-risk allele carriers(GG) n = 530				
		Case n = 216/Control n = 181					Case n = 249/Control n = 281				
		n/n	OR ^a (95%CI)	p	OR ^b (95% CI)	p	n/n	OR ^a (95% CI)	p	OR ^c (95% CI)	p
Age (years)		54.23/53.30					55.28/53.76				
Menopausal status	Pre	124/101					154/170				
	Post	92/80					95/111				
Height (cm)	≤150	36/28	1.24 (0.66-2.34)	0.50	1.46 (0.68-3.16)	0.33	58/50	1.07 (0.65-1.77)	0.78	1.01 (0.60-1.69)	0.98
	151-155	62/63	Ref.		Ref.		84/80	Ref.		ref.	
	156-160	78/51	1.57 (0.96-260)	0.07	1.57 (0.86-2.90)	0.14	72/105	0.68 (0.44-1.05)	0.08	0.73 (0.47-1.15)	0.18
	>160	36/38	1.00 (0.55-1.80)	0.99	0.58 (0.26-1.24)	0.16	34/43	0.80 (0.46-1.39)	0.43	0.89 (0.50-1.59)	0.70
BMI(Kg/m ²)	<20	48/37	1.36 (0.77-2.40)	0.26	1.11 (0.54-2.29)	0.77	54/59	1.57 (0.95-2.59)	0.06	1.60 (0.95-2.69)	0.08
	20-21.9	59/60	Ref.		Ref.		54/90	Ref.		Ref.	
	22-23.9	47/35	1.35 (0.77-2.40)	0.24	1.57 (0.80-3.12)	0.19	57/66	1.41 (0.86-2.30)	0.40	1.29 (0.78-2.14)	0.32
	≥24	57/48	1.18 (0.69-2.01)	0.51	1.14 (0.60-2.17)	0.68	81/63	2.08 (1.29-3.37)	<0.01	1.89 (1.16-3.10)	0.01
Smoking status	Never	186/168					214/262				
	Current or former	25/11	2.15 (1.05-4.71)	0.04	2.73 (1.07-7.65)	0.04	34/17	2.82 (1.53-5.40)	<0.01	2.39 (1.27-4.65)	<0.01
Alcohol drinking	Never	114/90					124/127				
	Current or former	101/89	0.93 (0.62-1.39)	0.71	0.99 (0.60-1.65)	0.97	125/153	0.90 (0.63-1.28)	0.55	0.95 (0.65-1.38)	0.78
Alcohol intake (g/day)	0	114/90					124/127				
	<5	59/45	1.08 (0.67-1.76)	0.75	1.12 (0.61-2.04)	0.72	78/84	1.01 (0.67-1.51)	0.98	1.11 (0.72-1.70)	0.64
	5-10	27/27	0.81 (0.44-1.49)	0.50	0.88 (0.41-1.90)	0.75	25/35	0.79 (0.44-1.41)	0.43	0.89 (0.49-1.63)	0.71
	10>	13/16	0.65 (0.29-1.41)	0.27	0.78 (0.27-2.14)	0.63	22/29	0.82 (0.44-1.52)	0.54	0.66 (0.33-1.28)	0.22
Leisure-time	No	122/80					127/133				
Exercise	Yes	93/101	0.58 (0.39-0.87)	<0.01	0.78 (0.47-1.27)	0.32	119/146	0.82 (0.58-1.17)	0.27	0.84 (0.59-1.21)	0.35
Intensity of physical activity ^d (met/week)	0	122/81					126/137				
	>6.0	23/17	0.87 (0.44-1.76)	0.70	1.62 (0.68-4.03)	0.28	28/25	1.24 (0.68-2.27)	0.48	1.19 (0.64-2.25)	0.58
	6.0-11.9	21/25	0.55 (0.28-1.04)	0.07	0.58 (0.27-1.21)	0.15	23/34	0.68 (0.37-1.22)	0.20	0.69 (0.37-1.28)	0.24
	12.0-23.9	19/32	0.39 (0.20-0.73)	<0.01	0.73 (0.33-1.56)	0.41	29/48	0.63 (0.37-1.06)	0.08	0.62 (0.36-1.06)	0.08
	≥24.0	23/26	0.56 (0.29-1.06)	0.07	0.67 (0.31-1.42)	0.29	27/35	0.79 (0.45-1.39)	0.42	0.84 (0.47-1.50)	0.55
Age at menarche (year)	≤12	63/73					73/127				
	13	52/51					57/61				
	≤14	99/56	1.39 (0.82-2.35)	0.22	1.74 (0.90-3.37)	0.10	115/88	1.12 (0.70-1.81)	0.63	1.02 (0.62-1.68)	0.92

Table 4 Age-adjusted odds ratio and multivariate adjusted odds ratio with 95% confidence intervals for lifestyle factors in rs3757318 (Continued)

Parity	0	49/24	Ref.			Ref.			37/50	Ref.			Ref.		
	1-2	110/105	0.48	(0.27-0.84)	<0.01	0.55	(0.19-1.54)	0.25	132/160	0.98	(0.60-1.62)	0.95	1.19	(0.70-2.05)	0.52
	≥3	36/48	0.34	(0.17-0.65)	<0.01	0.35	(0.12-1.04)	0.06	65/58	1.36	(0.77-2.40)	0.29	1.74	(0.95-3.21)	0.07
Age at first childbirth (year)	<25	60/60	1.05	(0.64-1.71)	0.86	0.97	(0.56-1.66)	0.90	88/82	1.35	(0.89-2.05)	0.15	1.19	(0.77-1.84)	0.43
	25-29	72/77							88/110	Ref.			Ref.		
	≥30	34/19	1.96	(1.03-3.80)	0.04	1.82	(0.88-3.85)	0.11	29/31	1.17	(0.66-2.10)	0.59	1.27	(0.69-2.33)	0.45
Breastfeeding	No	65/38	Ref.			Ref.			59/65	Ref.			Ref.		
	Yes	150/143	0.60	(0.38-0.95)	0.03	0.93	(0.36-2.43)	0.89	183/211	0.91	(0.61-1.38)	0.67	1.07	(0.69-1.65)	0.77
Family history of Breast cancer	No	173/143	Ref.			Ref.			212/229	Ref.			Ref.		
	Yes	24/19	1.04	(0.55-2.00)	0.79	1.30	(0.56-3.07)	0.54	28/33	0.91	(0.53-1.57)	0.93	0.90	(0.51-1.58)	0.72
Education	High school or less	113/80	Ref.			Ref.			144/115	Ref.			Ref.		
	Two-year college	74/54	0.99	(0.62-1.57)	0.96	1.02	(0.58-1.79)	0.94	66/90	0.60	(0.40-0.91)	0.01	0.63	(0.42-0.96)	0.03
	University	27/45	0.43	(0.24-0.76)	<0.01	0.33	(0.16-0.67)	0.00	36/74	0.40	(0.25-0.64)	<0.01	0.45	(0.28-0.73)	<0.01

^aOR is adjusted for age.

^bMultivariate adjusted for smoking state, leisure-time exercise, party, age of first children, breastfeeding and education. ^cMultivariate adjusted for BMI, smoking state, and education. ^dIntensity of physical activity and education. Significant dates are showed in boldface. OR, odds ratio; CI, confidence interval; BMI, body mass index.

located 200 kb upstream of ESR1. The risk allele frequency of rs3757318 is 6.6% in Europeans (HapMap-CEU), 33% in Chinese (HapMap-HCB) and 25% in Japanese (HapMap-JTP) [19]. We found a 22% risk allele frequency, consistent with HapMap-JTP. Thus, the risk allele frequency for rs3757318 varies between Europeans and Asians. In an analysis of the association between rs2046210 and rs12662670 as a surrogate for rs3757318 and breast cancer risk, Heins et al. found that the per allele OR for rs3757318 was higher in Asians (1.29, 95% CI 1.19–1.41) than in Europeans (1.12, 95% CI 1.08–1.17) [31]. These results suggest that screening for the rs3757318 genotype may be important in Asian women.

We also found that SNPs associated with breast cancer differed with regard to menses state, with rs2046210 and rs3803662 associated with breast cancer risk in premenopausal women. rs3803662 lies 8 kb upstream of TNRC9 and was found to have a significant association with breast cancer risk by Easton et al. [12]. TNRC9 is located on chromosome 16q12 and consists of seven exons. The protein encoded by this gene is a member of the high mobility group box (HMG-box) family. TNRC9 is expressed in brain and breast tissue, and has a higher expression level in breast cancer compared to that in normal tissue [37]. The risk allele frequency of rs3803662 is 24% in Europeans (HapMap-CEU), 72% in Chinese (HapMap-HCB) and 60% in Japanese (HapMap-JTP) [19]. Thus, Asian populations have a higher risk allele frequency than Europeans. However, Chen et al. found that rs3803662 was significantly associated with breast cancer in Europeans [17], but that this relationship was unclear in Asians [38]. Among the breast cancer-associated SNPs found in the current study, rs2046210 and rs3757318 are located near ESR1 and are related to breast cancer risk in Asians. To examine whether lifestyle factors associated with breast cancer risk vary in risk allele and non-risk allele carriers, we performed a subgroup analysis. Leisure-time exercise were associated with a decreased breast cancer risk in rs2046210 risk allele carriers. Although low-penetrance susceptibility SNPs may confer only a small effect on breast cancer risk alone, the risk for development of breast cancer in a risk allele carrier is about 1.2–1.3 fold higher than that in non-carriers. However, our results suggest that risk allele carriers can reduce their breast cancer risk through exercise, whereas obesity and smoking may increase breast cancer risk in non-risk-allele carriers. An understanding of the mechanisms underlying the different lifestyle factors associated with breast cancer in rs2046210 and rs3757318 risk allele and non-risk allele carriers may clarify the effects of these SNPs located near ESR1. Examination of interactions between SNPs and lifestyle factors in a larger Japanese population is needed to confirm the current findings for SNPs, lifestyle factors and breast cancer.

Conclusions

This case–control study showed that rs2046210 and rs3757318 located near the ESR1 gene and rs3808662 located on TNRC9 are associated with breast cancer risk in Japanese women. Our results suggest that leisure-time exercise can reduce the breast cancer risk in rs2046210 risk allele carriers, whereas smoking and obesity may increase the breast cancer risk in non-risk allele carriers. Further studies are required to confirm the validity of the association of these SNPs and lifestyle factors with breast cancer risk in the Japanese population.

Abbreviations

SNPs: Single nucleotide polymorphisms; WCRF/AICR: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research; NIC: National Cancer Institute; GWAS: Genome-wide association studies; LD: Linkage disequilibrium; BMI: Body mass index; MET: Metabolic equivalent; OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; ERα: estrogen receptor α.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NT designed the study. TM carried out genotyping, performed statistical analysis, and wrote the manuscript with NT. KN participated in genotyping and statistical analysis. TN, TI, TM, TS, JM, HD, SI, HK, KK, YI and YO obtained informed consent from subjects, collected blood samples and data from subjects, and provided advice on the study. YK designed the study and served as an advisor. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Author details

¹Department of General Thoracic Surgery and Breast and Endocrinological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama-city, Okayama 700-8558, Japan. ²Department of Radiology, Okayama Saiseikai General Hospital, 1-17-18 Ifuku-cho, Okayama-city, Okayama 700-8511, Japan. ³Department of Breast Surgery, Okayama Rousai Hospital, 1-17-18 Chikkoumidorimachi, Okayama-city, Okayama 702-8055, Japan. ⁴Department of Breast Surgery, Kagawa Prefectural Cancer Detection Center, 587-1 Tougou-cho, Takamatu-city, Kagawa 761-8031, Japan. ⁵Department of Breast Surgery, Mizushima Kyodo Hospital, 1-1 Mizushima, Minamikasuga-cho Kurashiki-city, Okayama 712-8567, Japan. ⁶Department of Breast and Endocrinological Surgery, 5-4-16, Ban-cho, Takamatu-city, Kagawa 760-8557, Japan. ⁷Faculty of Medicine, Kinki University Hospital, 377-2 Ohnohigashi, Osakahayama-city, Osaka 589-8511, Japan.

Received: 26 July 2013 Accepted: 18 November 2013

Published: 1 December 2013

References

1. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, The Japan Cancer Surveillance Research Group: Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2007: a study of 21 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 2013, **43**:328–336.
2. Ministry of Health, Ministry of Health, Labour and Welfare: *Vital Statistics*; 2011. http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/kekka03.html#k3_2.
3. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR; 2007.
4. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Shairer C, Mulvihill JJ: Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for

- white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989, **81**:1879–1886.
5. *Breast Cancer Risk Assessment Tool*. <http://www.cancer.gov/bcrisktool/Default.aspx>.
 6. The Japanese Breast Cancer Society: *Clinical Practice Guidelines for Breast Cancer*. Tokyo: KANEHARA & Co., Ltd.; 2012.
 7. Hindorf LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA: **Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:9362–9367.
 8. Resource Council, Science and Technology Agency & the Government of Japan: *Standard Tables of Food Composition in Japan*. 5th edition. Tokyo: National Printing Bureau; 2005.
 9. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS: **Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities.** *Med Sci Sports Exerc* 2000, **32**(Suppl 9):498–504.
 10. Travis RC, Reeves GK, Green J, Bull D, Tipper SJ, Baker K, Beral V, Peto R, Bell J, Zelenika D, Lathrop M, Million Women Study Collaborators: **Gene-environment interactions in 7610 women with breast cancer: prospective evidence from the Million Women Study.** *Lancet* 2010, **375**:2143–2151.
 11. Turnbull C, Ahmed S, Morrison J, Pernet D, Renwick A, Maranian M, Seal S, Ghousaini M, Hines S, Healey CS, Hughes D, Warren-Perry M, Tapper W, Eccles D, Evans DG, Breast Cancer Susceptibility, Collaboration, Hoening M, Schutte M, van den Ouweland A, Houlston R, Ross G, Langford C, Pharoah PD, Stratton MR, Dunning AM, Rahman N, Easton DF: **Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci.** *Nat Genet* 2010, **42**:504–507.
 12. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, et al: **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** *Nature* 2007, **447**:1087–1093.
 13. Long J, Shu XO, Cai Q, Gao YT, Zheng Y, Li G, Li C, Gu K, Wen W, Xiang YB, Lu W, Zheng W: **Evaluation of breast cancer susceptibility loci in Chinese women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**:2357–2365.
 14. Qian B, Zheng H, Yu H, Chen K: **Genotypes and phenotypes of IGF-1 and IGFBP-3 in breast tumors among Chinese women.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **130**:217–226.
 15. Zheng W, Long J, Gao YT, Li C, Zheng Y, Xiang YB, Wen W, Levy S, Deming SL, Haines JL, Gu K, Fair AM, Cai Q, Lu W, Shu XO: **Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1.** *Nat Genet* 2009, **41**:324–328.
 16. Stacey SN, Sulem P, Zanon C, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Helgason A, Jonasdottir A, Besenbacher S, Kistic JP, Fackenthal JD, Huo D, Adebamowo C, Ogunrudan T, Olson JE, Fredericksen ZS, Wang X, Look MP, Sieuwerts AM, Martens P, Pajares I, Garcia-Prats MD, Ramon-Cajal JM, de Juan A, Panadero A, Ortega E, Aben KK, Vermeulen SH, Asadzadeh F, van Engelenburg KC, Margolin S, et al: **Ancestry-shift refinement mapping of the C6orf97-ESR1 breast cancer susceptibility locus.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1001029.
 17. Chen MB, Wu XY, Shen W, Wei MX, Li C, Cai B, Tao GQ, Lu PH: **Association between polymorphisms of trinucleotide repeat containing 9 gene and breast cancer risk: evidence from 62,005 subjects.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **126**:177–183.
 18. Hirakawa M, Tanaka T, Hashimoto Y, Kuroda M, Takagi T, Nakamura Y: **JSNP: a database of common gene variations in the Japanese population.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:158–162.
 19. *International HapMap Project*. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>.
 20. McPherson K, Steel CM, Dixon JM: **ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.** *BMJ* 2000, **321**:624–628.
 21. Nagata C, Hu YH, Shimizu H: **Effects of menstrual and reproductive factors on the risk of breast cancer: meta-analysis of case-control studies in Japan.** *Jpn J Cancer Res* 1995, **86**:910–915.
 22. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdie AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomaki K, Heikila P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, et al: **Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies.** *J Natl Cancer Inst* 2011, **103**:250–263.
 23. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G: **Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R43.
 24. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ: **Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis.** *J Natl Cancer Inst* 2013, **105**:515–525.
 25. Nagata C, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Wakai K, Inoue M, Tsugane S, Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan: **Tobacco smoking and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiological evidence in the Japanese population.** *Jpn J Clin Oncol* 2006, **36**:387–394.
 26. Kawai M, Kakugawa Y, Nishino Y, Hamanaka Y, Ohuchi N, Minami Y: **Anthropometric factors, physical activity, and breast cancer risk in relation to hormone receptor and menopausal status in Japanese women: a case-control study.** *Cancer Causes Control* 2013, **24**:1033–1044.
 27. Expert Consultation WHO: **Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies.** *Lancet* 2004, **363**:157–163.
 28. Suzuki S, Kojima M, Tokudome S, Mori M, Sakauchi F, Wakai K, Fujino Y, Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Tamakoshi A: **Obesity/weight gain and breast cancer risk: findings from the Japan collaborative cohort study for the evaluation of cancer risk.** *J Epidemiol* 2013, **23**:139–145.
 29. Hussain SK, Altieri A, Sundquist J, Hemminki K: **Influence of education level on breast cancer risk and survival in Sweden between 1990 and 2004.** *Int J Cancer* 2008, **122**:165–169.
 30. Hajian-Tilaki K, Kaveh-Ahangar T, Hajian-Tilaki E: **Is educational level associated with breast cancer risk in Iranian women?** *Breast Cancer* 2012, **19**:64–70.
 31. Ministry of Health, Labour and Welfare: *Summary of Comprehensive Survey of Living Conditions*; 2010. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa10/3-6.html>.
 32. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F: **Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region.** *Mol Endocrinol* 2001, **15**:2057–2063.
 33. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA: **International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors.** *Pharmacol Rev* 2006, **58**:773–781.
 34. Hein R, Maranian M, Hopper JL, Kapuscinski MK, Southey MC, Park DJ, Schmidt MK, Broeks A, Hogervorst FB, Bueno-de-Mesquit HB, Muir KR, Lophatananon A, Rattanamongkongul S, Puttawibul P, Fasching PA, Hein A, Ekici AB, Beckmann MW, Fletcher O, Johnson N, dos Santos SI, Peto J, Sawyer E, Tomlinson I, Kerin M, Miller N, Marmee F, Schneeweiss A, Sohn C, Burwinkel B, et al: **Comparison of 6q25 breast cancer hits from Asian and European Genome Wide Association Studies in the Breast Cancer Association Consortium (BCAC).** *PLoS One* 2012, **7**:e42380.
 35. Cai Q, Wen W, Qu S, Li G, Egan KM, Chen K, Deming SL, Shen H, Shen CY, Gammon MD, Blot WJ, Matsuo K, Haiman CA, Khoo US, Iwasaki M, Santella RM, Zhang L, Fair AM, Hu Z, Wu PE, Signorello LB, Titus-Ernstoff L, Tajima K, Henderson BE, Chan KY, Kasuga Y, Newcomb PA, Zheng H, Cui Y, Wang F, et al: **Replication and functional genomic analyses of the breast cancer susceptibility locus at 6q25.1 generalize its importance in women of Chinese, Japanese, and European ancestry.** *Cancer Res* 2011, **71**:1344–1355.
 36. Guo H, Ming J, Liu C, Li Z, Zhang N, Cheng H, Wang W, Shi W, Shen N, Zhao Q, Li D, Yi P, Wang L, Wang R, Xin Y, Zhao X, Nie X, Huang T: **A common polymorphism near the-ESR1 gene is associated with risk of breast cancer: evidence from a case-control study and a meta-analysis.** *PLoS One* 2012, **7**:e52445.
 37. Jones JO, Chin SF, Wong-Taylor LA, Leaford D, Ponder BA, Caldas C, Maia AT: **TOX3 Mutations in breast cancer.** *PLoS one* 2013, **8**:e74102.
 38. Liang J, Chen P, Hu Z, Shen H, Wang F, Chen L, Li M, Tang J, Wang H, Shen H: **Genetic variants in trinucleotide repeat-containing 9 (TNRC9) are associated with risk of estrogen receptor positive breast cancer in a Chinese population.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **124**:237–241.
- doi:10.1186/1471-2407-13-565
Cite this article as: Mizoo et al.: Effects of lifestyle and single nucleotide polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in Japanese women. *BMC Cancer* 2013 **13**:565.

がん手術療法の変遷・発展と手術患者のQOL

～乳がん手術療法を中心に～

土井原博義

岡山大学病院乳腺・内分泌外科

乳がんは、現在わが国では年間約 54,000 人の女性が罹患し、約 12,000 人が死亡すると報告されており、罹患率は 1990 年代前半より女性の癌罹患率で第 1 位、死亡率は第 5 位で、いずれも年々増加している疾患である(国立がん研究センターがん対策情報センター、<http://ganjoho.jp/public/index.html>)。その治療法には、手術療法、薬物療法、放射線療法などがあるが、単一の治療が施行されることは少なく、2 つあるいはすべてを組み合わせた集学的治療が中心である。

一方、がん患者の QOL は複数の次元、要素によって構成されているが、手術に関連したのは健康関連 QOL といわれているものが中心である。本稿では乳がん手術療法の変遷とともに、標準的な手術療法から整容性を求めた乳房再建術、低侵襲のセンチネルリンパ節生検と、健康関連 QOL との相関について解説する。

乳がん患者の QOL 評価のためのガイドライン

「quality of life : QOL」は「生活の質・生命の質」と翻訳されているが、その基本的な概念は WHO が提唱した健康の定義、すなわち「完全な肉体的、精神的および社会的福祉の状態であり、単に疾病または病弱の存在しないことではない」と考えられる。

がん患者の QOL は、一般に、①身体面、②精神/心理面、③役割/機能面、④社会面、⑤スピリチュアリティなどで構成されるが、乳がん手術においては基本的に患者の健康状態に起因することから、①～④のいわゆる健康関連 QOL について検討する必要がある。

また QOL の評価を行う際には、現在数々の調査票

が存在し、目的や評価項目によって使用する調査票が異なっている。現在わが国で使用できる乳がん患者用 QOL 調査票を表 1 に示す¹⁾。

乳がん手術療法の変遷 (図 1)

ハルステッド(Halsted, W.S.)が根治的乳房切除術(乳房切除+大・小胸筋切除+腋窩郭清: 胸筋合併乳房切除術)を報告したのは 1882 年のことで、この術式が乳がん手術の幕開けとなった。その後 1950 年代、1960 年代には胸骨傍や鎖骨上リンパ節も郭清するという拡大乳房切除術も行われたが、根治的乳房切除の手術成績を凌駕することはなく、また術後の醜形や QOL の低下を伴って受け入れられなかった。それに代わって行われるようになったのが非定型的乳房切除術(胸筋温存乳房切除術)で、Patey 法(乳房切除+小胸筋切除+腋窩郭清)と Auchincloss 法(乳房切除+腋窩郭清)が長期的な手術成績でハルステッド法と遜色ないにもかかわらず、美的改善が著しく、腕の運動、浮腫などの運動生理学的改善もみられたことから広く行われるようになり、現在でも標準手術方法として施行されている。

その次に登場したのが乳房温存療法で 1973 年にベロネシー(Veronesi, U.), 1976 年にフィッシャー(Fisher, B.)らにより乳房切除術との比較試験の結果、生存率に遜色なく、さらに整容性に優れた術式として広く許容されるようになった。これは乳がんの biology(生物学的)考えかたの変化、すなわち乳がん局所病説(Halstedian theory)から乳がん全身病説(alternative theory)への変化によることが大きい。Fisher ら²⁾による 20 年フォローでは、乳房切除術

表 1 わが国で使用できる乳がん患者用 QOL 調査表

調査票	目的	内容
1. QOL-ACD	薬物療法の際に QOL を適切に評価する	①活動性, ②身体状況, ③精神・心理状態, ④心理社会面, ⑤全体的 QOL
2. EORTC QLQ-BR23	国際的な臨床試験に参加する乳がん患者の QOL 評価	機能: ①容姿, ②性生活 症状: ①腕, ②乳房, ③有害反応 その他
3. EORTC QLQ-C30	国際的な臨床試験に参加する乳がん患者の QOL 評価	機能: ①身体, ②役割, ③認識, ④感情, ⑤社会 症状: ①疲労, ②嘔気・嘔吐, ③痛み, ④息苦しさ, ⑤不眠, ⑥食欲不振, ⑦便秘, ⑧下痢 その他
4. FACT-B	乳がん治療を受ける患者の主観的な健康感の測定	①身体的, ②社会的, ③精神的, ④機能的, ⑤乳癌関連項目
5. SF-36	患者の主観的健康度	①身体機能, ②身体機能不全による役割の制限, ③痛み, ④全体的な健康感, ⑥社会生活機能, ⑦精神状態の変化, ⑧心の状態
6. WHO/QOL-26	患者の主観的な幸福感, 異文化での国際比較	①身体領域, ②心理的領域, ③社会的関係, ④環境, ⑤全体的 QOL
7. HADS	身体疾患を有する患者で身体症の影響を受けずに抑うつや不安などの症状を評価する	①抑うつ, ②不安
8. POMS	気分を評価する	①緊張・不安, ②抑うつ・落ち込み, ③怒り・敵意, ④活気, ⑤疲労, ⑥混乱
9. STAI	状態不安と特性不安を測定する	①状態不安尺度(20項目), ②特性不安尺度(20項目)
10. GHQ	精神障害の発見と症状評価	①身体的症状, ②不安と不眠, ③社会的活動障害, ④うつ傾向
11. SDS	うつ病患者における重症度評価	①主感情, ②生理的随伴症状, ③心理的随伴症状



図 1 乳がん手術療法の変遷

と乳房温存療法において無再発生存率, 生存率は同等であると報告されている。現在のわが国での術式の変遷を示すが(図 2), 乳房温存療法が 60% を占めており, 手術療法の中心となっている³⁾。

乳房温存療法と QOL

2005 年の乳房温存療法ガイドライン⁴⁾の発表により, 適応は, ①腫瘍径 3 cm 以下(良好な整容性が保たれるので

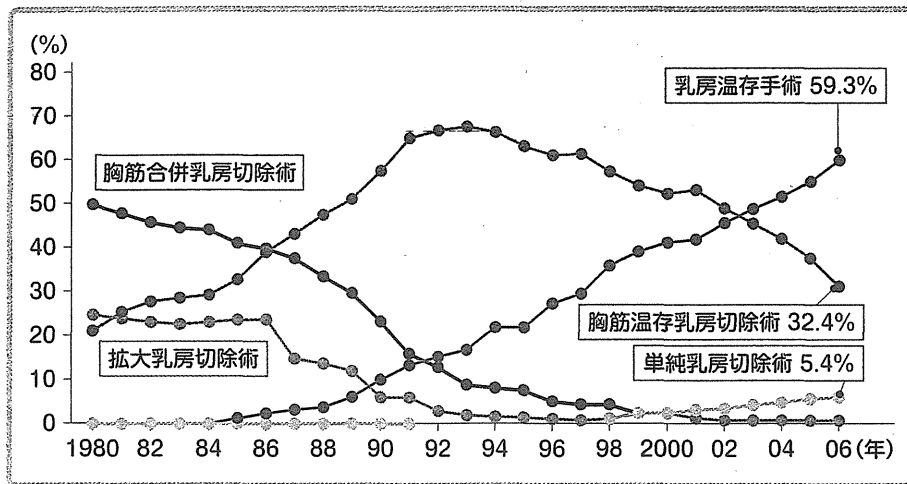


図2 わが国での術式の変遷

(Sonoo H, Noguchi S: Results of questionnaire survey on breast cancer surgery in Japan 2004-2006. Breast Cancer 15(1): 3-4, 2008 より引用)

あれば4 cm 以下), ②広範な乳管内進展を示す所見がない, ③多発病巣のないもの, ④放射線治療が可能であること, ⑤患者が乳房温存療法を希望することとなっている。

実際の術式は, 腫瘍辺縁から1~2 cm の安全域を取って切除する円状部分切除と, 乳房のほぼ4分の1を切除する扇状部分切除からなる。乳房温存療法と乳房切除術のQOLに関してはEngelら⁵⁾がEORTC QLQ-C30を用いて年齢も考慮した評価を行っているが, 乳房温存療法のほうが術後1年目, 2年目においてQOLスコアが有意に良好で, とくに美容面において差が大きくなっていった。また若年者では精神面(社会的, 感情的, 将来への不安)での差は少ないが, 身体面(機能, 性活動)では大きな差がみられるという結果であった。

グリーンといった色素を用いる色素法と, ^{99m}Tc フチン酸または^{99m}Tc スズコロイドなどの放射線核種を用いるラジオアイソトープ法がある。

センチネルリンパ節生検と腋窩リンパ節郭清のQOLを比較した報告は多数みられるが, いずれの報告もセンチネルリンパ節生検のほうが良好という結果である。Ohsumiら⁶⁾の報告によれば, 関節可動域, 上腕浮腫, 知覚異常, 疼痛など上肢・肩関節障害については明らかにセンチネルリンパ節生検のほうが良好であった。またEORTC QLQ-C30やSTAIなどを用いたQOLの評価でも, 同様に術後1年を経過してもセンチネルリンパ節生検のほうが不安, うつなど精神面においても良好であった。ただ, 時間の経過とともに差は小さくなっていく傾向がみられている。

センチネルリンパ節生検とQOL

腋窩リンパ節郭清の意義は, ①病期の決定, ②治療方針の決定, ③腋窩リンパ節再発の予防(局所コントロール)と考えられている。また腋窩郭清により, 上肢の浮腫, 疼痛, 知覚鈍麻や挙上障害などの合併症が少なからず起こりうる。したがって不要なリンパ節郭清を省略するために考えられたのが, センチネルリンパ節生検である。

実際の同定方法は, インジゴカルミンやインドシアニン

乳房再建術とQOL

乳がん手術症例の約40%は乳房切除術を受けているが, 女性のシンボルともいわれる乳房を失うことによる精神的なダメージははかり知れないものがあり, 術後のQOLに大きな影響がある。そこで施行されるようになったのが乳房再建術で, これには再建時期によって一期再建(乳房切除術と同時に進行), 二期再建(乳房切除後期間を置いて進行)の方法があり, また再建の方法によって自家組織(広背

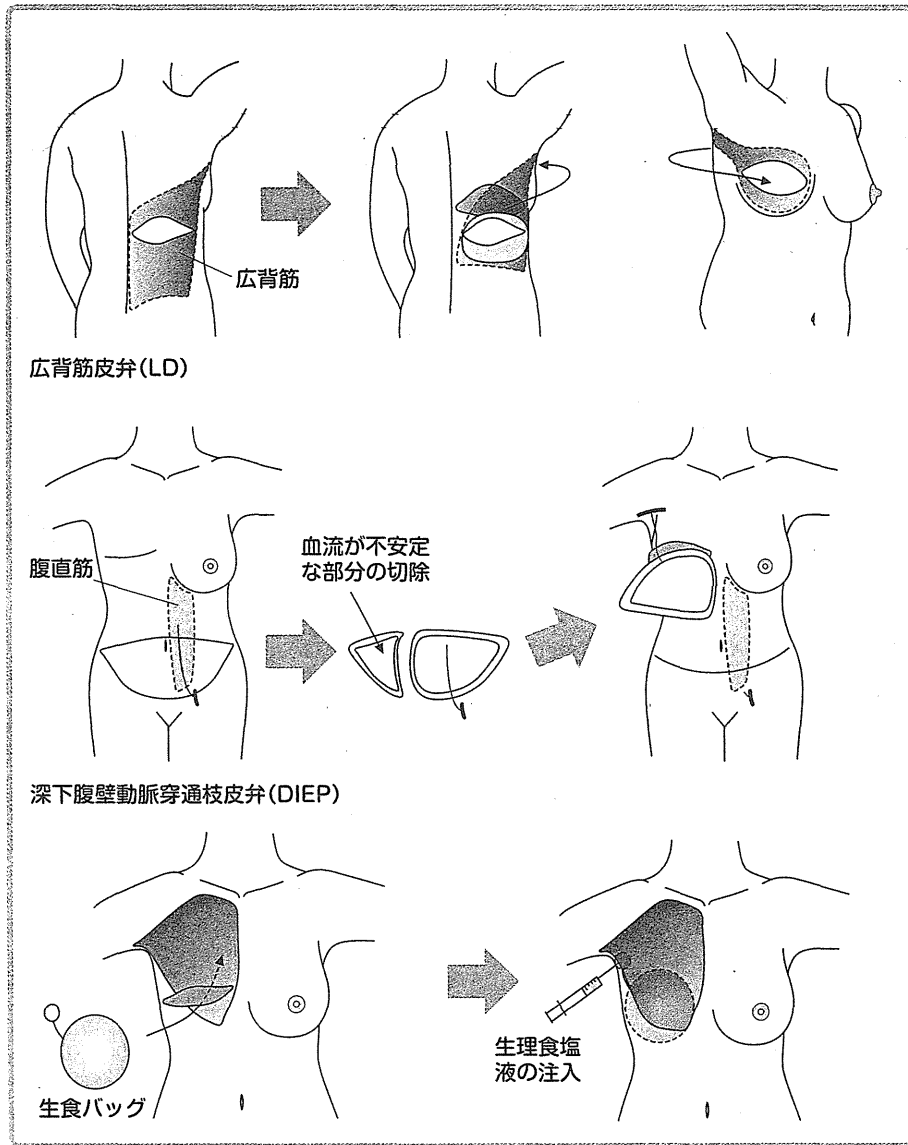


図3 ●乳房再建方法

筋皮弁、腹直筋皮弁、腹壁脂肪弁など)を用いる方法と、人工乳房(生食バッグやシリコンインプラント)を用いる方法がある(図3)。

ボディイメージの面からの比較では、多くの報告で乳房再建術のほうが乳房切除術に比し良好となっているが、Leeら⁷⁾のQOLに関する報告ではSF-36, EORTC QLQ-C30, FACT-Bなどの調査票を用いた比較において、両者に差はみられなかった。ただ、乳房再建症例のQOL評価は術後の観察研究であり、選択バイアスがかかっているた

め術前からのQOL評価が必要であると述べている。

まとめ

乳がん手術療法について歴史的変遷および手術手技と健康関連QOLの相関について報告した。乳がんの手術療法は乳房切除から乳房温存療法、腋窩リンパ節郭清からセンチネルリンパ節生検と大きく縮小化されてきているが、い

ずれも生存率に差がないというエビデンスに基づいている。さらに術式の縮小化で乳がん患者のQOLは明らかに向上してきた。また乳房再建術に関するQOLは乳房切除術と差がないという評価が多いが、整容性は明らかに良好であり、推進される術式と考えられる。

乳がん治療は乳腺外科医だけでなく、看護師、薬剤師、理学療法士といったコメディカルとの協働、いわゆるチーム医療が患者・家族の満足度を上げるのに不可欠である。QOLを向上し良好に保つためにも、さらなるチーム医療の推進が必要であろう。

●文 献

- 1) 日本乳癌学会編：乳癌患者のQOL評価研究のためのガイドライン(主任研究者：下妻晃二郎)，日本乳癌学会，2002
- 2) Fisher B et al: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy

plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Engl J Med 347(16): 1233-1241, 2002

- 3) Sonoo H, Noguchi S: Results of questionnaire survey on breast cancer surgery in Japan 2004-2006. Breast Cancer 15(1): 3-4, 2008
- 4) 標準的な乳房温存療法の実施要項の研究班編：乳房温存療法ガイドライン(医療者向け)，金原出版，東京，2005
- 5) Engel J et al: Quality of life following breast-conserving therapy or mastectomy: results of a 5-year prospective study. Breast J 10(3): 223-231, 2004
- 6) Ohsumi S et al: Quality of life of breast cancer patients and types of surgery for breast cancer-current status and unresolved issues. Breast Cancer 14(1): 66-73, 2007
- 7) Lee C, Sunu C, Pignone M: Patient-reported outcomes of breast reconstruction after mastectomy: a systematic review. J Am Coll Surg 209(1): 123-133, 2009

南江堂
Book Guide

現場で使える

抗がん剤安全管理
クイックブック

編集 国立がん研究センター中央病院薬剤部

新書判・160頁 2009.5. 定価2,940円(本体+税5%)



代表的な処方，医薬品情報，注射剤の取扱いと調製などを1～2頁ずつにまとめたコンパクトなクイックブック!

中央病院が運用する管理方法も掲載

特集

分子標的治療

乳癌と分子標的薬

土井原博義

岡山大学病院 乳腺・内分泌外科

キーワード：乳癌, 分子標的薬, 抗HER2療法, mTOR阻害剤, 抗VEGF抗体

Breast cancer and molecular targeted drugs

Hiroyoshi Doihara

Department of Breast and Endocrine Surgery, Okayama University Hospital

緒言

乳癌は現在本邦では年間約57,000人の女性が罹患し(女性14人に1人), 12,000人が死亡すると報告されており, 罹患率は1990年代前半より女性の癌罹患率で第1位, 死亡率は第5位でいずれも年々増加している疾患である(<http://ganjoho.jp/public/index.html> 2013年9月閲覧). その治療法には手術療法, 薬物療法, 放射線療法などがあるが, 単一の治療が施行されることは少なく, 2つあるいはすべてを組み合わせた集学的治療が中心である. 特に薬物療法の進歩は目覚ましく, 近年内分泌療法, 化学療法, 分子標的治療などにおいて新規薬剤の承認や作用機序の異なる薬剤の併用療法など多数の臨床試験結果が報告されている.

今回, 乳癌における分子標的薬剤に主眼を置いて現在使用可能な薬剤の開発経過や臨床試験結果とともに将来認可される可能性のある薬剤についても現況を報告する.

乳癌における腫瘍バイオロジーに基づいた治療

以前の乳癌に対する術前術後の補助療法は, 主に患者自身の状況や腫瘍の病理学的因子が重要視されていた. すなわち, 年齢, 閉経状況, 腫瘍径, リンパ節転移の有無, 組織型, 脈管侵襲の有無, 遠隔転移の有無, 遠隔転移臓器などによって使用薬剤, レジメンが決定されていた. しかし2009年, 早期乳癌に対する世界的な補助療法の標準治療を決定する St. Gallen 国際乳癌カンファレンスにおいて病理学的因子を重視するので

はなく, 腫瘍のバイオロジー(生物学的性状)に基づいた治療を行うということが決定された¹⁾. すなわち, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) の発現の有無によって治療法や治療薬剤が決められるようになった. さらに2011年の St. Gallen 国際乳癌カンファレンスでは腫瘍の増殖能をみる Ki-67が生物学的性状をみる因子の1つに追加された²⁾. 表1に分類と治療法を示すが, 基本的にホルモンレセプター(ERまたはPgR)が陽性であれば内分泌療法, HER2陽性であれば抗HER2療法は必須でホルモンレセプター陰性あるいはKi-67高値であれば化学療法を追加するというものである. 今回は分子標的薬に主眼を置いて抗HER2薬(トラスツズマブ, ラパチニブ, ペルツズマブ, T-DM1, neratinib), 抗vascular endothelial growth factor (VEGF)抗体薬であるベバシズマブ, mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害剤であるエベロリムス, poly ADP-ribose polymerase (PARP)阻害剤について概説する.

抗HER2療法

HER2遺伝子がコードするHER2蛋白は細胞膜に局在する受容体でチロシンキナーゼ活性を有し, 上皮細胞の増殖と分化に関わっている. 乳癌の20~25%でHER2の遺伝子増幅あるいは蛋白の過剰発現が認められており, 陽性患者は予後不良である.

1. HER2の判定法

HER2蛋白の過剰発現にはimmunohistochemistry (IHC)法, ELISA法, ウエスタンブロット法などがあり, 遺伝子増幅の測定にはfluorescence in situ hybridization (FISH)法, chromogenic in situ hybridization (CISH)法, silver-enhanced in situ

平成25年9月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話: 086-235-7265 FAX: 086-235-7269
E-mail: hdoihara@md.okayama-u.ac.jp

表1 生物学的性状による分類 (intrinsic subtype) と乳癌薬物療法

Type	ER	PgR	HER2	Ki-67	治療
ルミナルA	+	+	-	low	内分泌療法
ルミナルB (HER2 negative)	+	+	-	high	内分泌療法+抗がん剤
ルミナルB (HER2 positive)	+	+	+	any	内分泌療法+抗がん剤+抗HER2療法
HER2 タイプ	-	-	+	any	抗がん剤+抗HER2療法
トリプルネガティブ ≡basal like	-	-	-	any	抗がん剤

ER: estrogen receptor, 1%以上が陽性, PgR: progesterone receptor, 20%以上が陽性
 HER2: Human epidermal growth factor receptor-2, 30%以上が陽性
 Ki-67: 15%以上が陽性 (施設による)

hybridization (SISH) 法, ductal color in situ hybridization (DISH) 法がある。一般的には針生検ないし手術摘出標本の原因巣または転移巣から IHC 法と FISH 法が用いられる。ASCO/CAP のガイドライン³⁾による HER2 の判定方法は IHC 法では 0/1+ (陰性), 2+ (equivocal), 3+ (陽性: 強い完全な細胞膜が30%以上の癌細胞に観察される) の4段階で判定し, 2+においては FISH 法を行い, 遺伝子増幅をみる。FISH 法は HER2 遺伝子コピー数/CEP17 コピー数の比 > 2.2, または HER2 遺伝子コピー数の平均値が核1個当たり > 6 としている。IHC3+ および FISH2.2倍以上を HER2 陽性とし, 抗 HER2 療法の適応としている。

2. トラスツズマブ

トラスツズマブは米国ジェネンテック社が開発した HER2 の細胞外領域に選択的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。その作用機序は①免疫システムの活性化, すなわち腫瘍細胞表面の HER2 受容体に特異的に結合し, 抗体依存性細胞障害作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) を発揮する, ② HER2 シグナルの伝達抑制, チロシンキナーゼ活性を抑制することによる腫瘍増殖抑制やアポトーシス誘導が考えられている。1992年より HER2 蛋白過剰産生のある転移乳癌を対象に米国で臨床試験が開始され, 1998年米国食品医薬局 (FDA) に承認された。本邦では1996年第 I 相試験が開始され, 2001年転移乳癌の治療薬として承認され, さらに原発性乳癌に対する術後補助療法のグローバルスタディを経て2008年に術後補助化学療法についても適応追加が承認された。海外で施行された第 III 相 pivotal study (H0648試験)

は⁴⁾HER2陽性転移乳癌に対して1st line でトラスツズマブ+化学療法の併用と化学療法単独を比較した試験である。主要評価項目は無増悪期間, 安全性, 副次評価項目は奏効率, 奏効期間, 治療成功期間, 全生存期間でトラスツズマブ+化学療法の無増悪生存期間中央値は7.4ヵ月, 化学療法単独群4.6ヵ月で併用群の方が有意に長く ($P < 0.001$), また全生存期間中央値では併用群25.1ヵ月, 単独群20.3ヵ月で同様に併用群の方が有意に良好であった ($P < 0.046$) (図1)。国内第 I 相試験では主要評価項目が安全性, 最大耐量, 副次評価項目が抗腫瘍効果, 薬物動態で18例について行われたが, 奏効率は11.1%, 安全性は Grade 3 で発熱1例, 消化器疾患1例, 骨痛1例という結果で特に大きな問題はみられなかった⁵⁾。術後補助療法としては HERA, NSABP B-31, N9831, BCIRG 006試験などがあり, その中で代表的なのが HERA 試験でこれは HER2陽性早期乳癌に対して標準的な補助化学療法を施行後, 観察群, トラスツズマブ1年投与群, 2年投与群の3群に割り付けした第 III 相国際共同試験である (図2)。主要評価項目である無病生存率において3年経過観察にて1年投与群80.6%, 観察群74.3%で有意に1年投与群の方が良好であった ($P < 0.0001$) (図3)。さらに生存率においてもそれぞれ92.4%, 89.7%と1年投与群の方が良好であった ($P = 0.0115$)⁶⁾。上記4試験の比較解析結果を示すが, 無病生存率においていずれもトラスツズマブ群で有意に良好であった (図4)⁷⁾。なお2013年 Goldhirsch ら⁸⁾の報告では1年投与群と2年投与群において生存率に差は無く, 2年投与群に心不全が多い傾向にあった。また短期投与の有効性, 安全

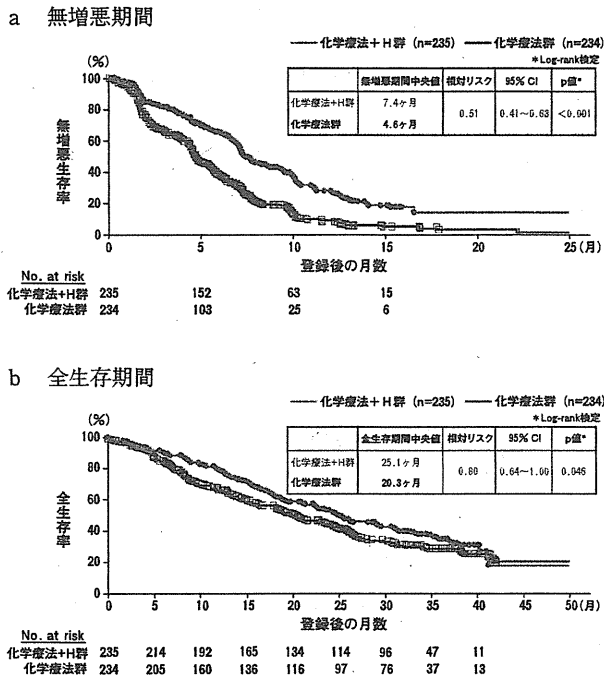


図1 H0648試験
化学療法+トラスツズマブと化学療法のみと比較試験で併用したほうが有意に良好であった。a：無増悪期間，b：全生存率。
(文献4を改編)

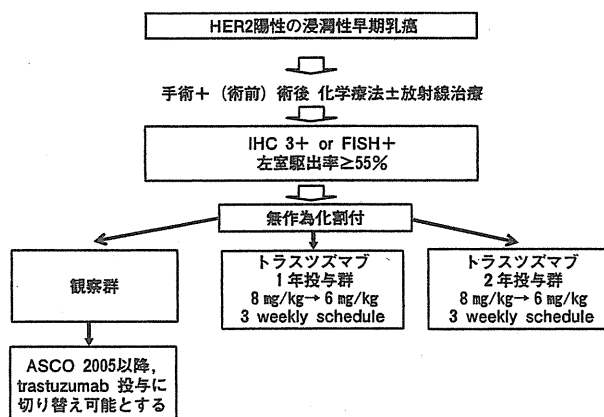


図2 HERA試験のデザイン
HER2陽性乳癌に対して標準的な治療が終了後、観察群：トラスツズマブ1年投与群：トラスツズマブ2年投与群に割り付けする試験である。

性を検証する PHARE trial では6ヵ月投与と1年投与の非劣性試験が行われたが⁹⁾、非劣性は証明されなかったため現在1年投与が標準となっている。副作用はHERA試験に登録された1,678例についてみると全体の35.8%にみられ、主なものは初回投与時の infusion

無病生存率 (ITT 解析)

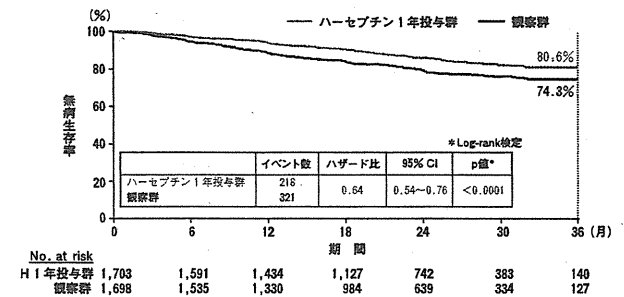


図3 HERA試験結果

無病生存率においてトラスツズマブ1年投与群は観察群に比し、有意に良好であった。(文献6を改編)

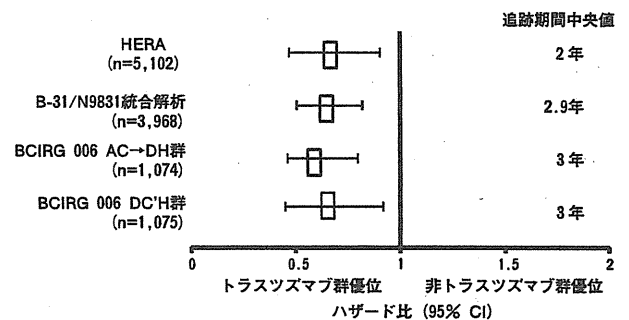


図4 トラスツズマブの各術後補助療法の試験における生存率の比較

HERA試験，NSABP B31/N9831，BCIRG 006のいずれの試験においてもトラスツズマブ治療群の方が有意に良好であった。
(文献7を改編)

reactionとして悪寒4.5%，頭痛3.6%，発熱3.5%，また心障害として左室駆出率の低下が3.0%にみられた。心不全の合併も報告されており、本剤投与時は定期的な心エコーを行う必要がある。特にアンシラサイクリン系薬剤投与例では心障害の発生頻度が上昇することが報告されており、併用は要注意である。その他、頻度は低いが、アナフィラキシー様症状、間質性肺炎、肝障害、腎障害などの重篤な症状も報告されている。

トラスツズマブは乳癌領域において最初に承認されたHER2陽性例に対する分子標的薬で進行再発乳癌においては1st lineで使用すべき薬剤であり、補助療法では腫瘍径1.1cm以上の症例に対して化学療法の併用のもとに1年間投与するのが標準治療となっている。また腫瘍径0.6~1.0cmにおいてもベネフィットと毒性を考慮し、検討すべきとされている。

3. ラパチニブ

ラパチニブはチロシンキナーゼ阻害剤でHER1 (ErbB1) と HER2 (ErbB2) に対して選択的に阻害作用を示す経口分子標的薬である。低分子構造を有するラパチニブは細胞膜内で epidermal growth factor receptor (EGFR) および HER2受容体のチロシンキナーゼ結合部位に可逆的に結合し、チロシンキナーゼの活性および自己リン酸化を阻害する。その結果 Akt および Erk のリン酸化阻害やシグナル伝達が抑制され、アポトーシスの誘導や細胞増殖の抑制が引き起こされる (図5)。米国にて2001年より臨床試験が開始されたが、in vitro の試験データからカベシタビンとの併用療法で相乗効果が示された結果、海外第Ⅲ相試験 (EGF100151) が2004年より実施された。本試験はHER2過剰発現し、アンスラサイクリン、タキサン、トラスツズマブによる前治療歴を有する進行再発乳癌を対象にラパチニブとカベシタビン併用療法とカベシタビン単独療法に割り付けした試験で主要評価項目は増悪までの期間 (TTP)、副次評価項目は全生存期間、奏効率、臨床的有用率、安全性などである。TTP 中央値は併用群163例で8.4ヵ月、単独群161例で4.4ヵ月であり、有意差がみられたが ($P=0.00032$, ハザード比0.51) (図6), 全生存期間では併用群67.7週, 単独群66.6週と差はなかった ($P=0.117$, ハザード比0.78)¹⁰。このデータをもとに米国ではHER2過剰発現が確認された手術不能または再発乳癌に対してカベシタビンとの併用という条件で2007年承認された。本邦でもラパチニブ、カベシタビン併用による第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験

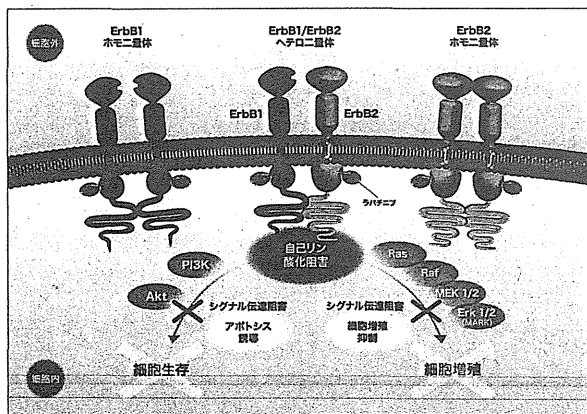


図5 ラパチニブの作用機序

ラパチニブは細胞膜内で EGFR および HER2 受容体のチロシンキナーゼ結合部位に可逆的に結合し、その活性および自己リン酸化を阻害する。(Tykerb 製品情報概要より)

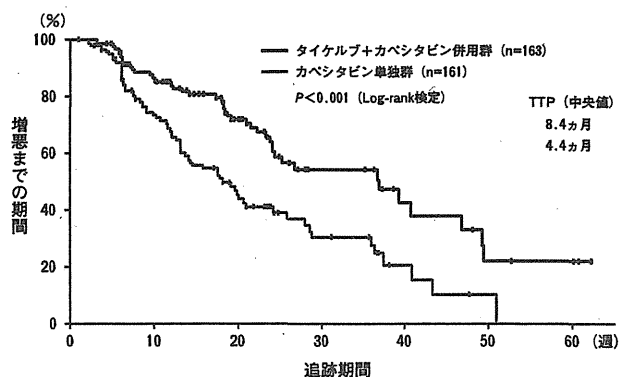


図6 EGF100151試験

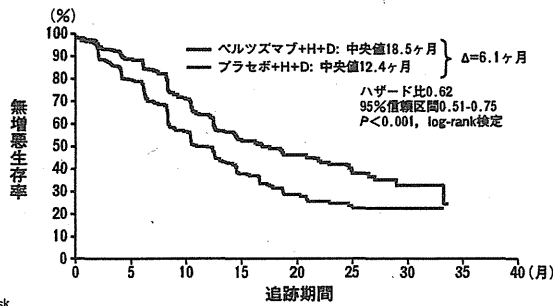
腫瘍増悪までの期間 (TTP) においてカベシタビン単剤よりラパチニブを併用したほうが良好であった。(文献10を改編)

(EGF109749試験) が行われた結果、2009年に米国と同様な症例に対してカベシタビンとの併用療法で承認された。ラパチニブによる主な副作用は下痢73%, 発疹 (ざ瘡様皮膚炎を含む) 67%, 口内炎35%であった。重篤な副作用としては肝機能障害, 間質性肺炎患, 心障害, 下痢およびQT 間隔の延長が報告されている。

ラパチニブはまだ術後補助療法の適応はなく、臨床試験の結果から HER2陽性進行再発乳癌の 2nd line 以降で投与されるべき薬剤である。

4. ベルツズマブ

ベルツズマブはHER2細胞外ドメインのサブドメインⅡに結合するヒト化モノクローナル抗体である。HER2とリガンドによって活性化される他のHER受容体, 特にHER3との二量体化を妨げることにより, HER2のシグナル伝達の遮断やADCC活性により, 抗腫瘍活性を引き起こす。トラスツズマブ failure となった進行再発乳癌を対象にトラスツズマブとベルツズマブを併用した第Ⅱ相試験では奏効率24.2%であった¹¹。またベルツズマブ+トラスツズマブ+ドセタキセル (ベルツズマブ群) とベルツズマブ+トラスツズマブ+プラセボ (対照群) を比較した第Ⅲ相試験 (CLEOPATRA 試験) では¹²808例が登録され, 主要評価項目である無増悪生存期間中央値においてベルツズマブ群18.5ヵ月, 対照群12.4ヵ月で有意にベルツズマブ群が良好であった (ハザード比0.62, $P < 0.001$)。副次的評価項目である全生存率はハザード比0.64, $P = 0.005$ でベルツズマブ群が良好, 奏効率はベルツズマブ群80.2%, 対照群69.3%で有意にベルツズマブ群が良好であった ($P = 0.001$) (図7)。副作用は下痢, 発疹, 粘膜の炎症, 発熱性好中球減少, 皮膚乾燥の発現



No. at risk	0	5	10	15	20	25	30	35	40
ベルツズマブ+H+D	402	345	267	139	83	32	10	0	0
プラセボ+H+D	406	311	209	93	42	17	7	0	0

H: トラスツズマブ D: ドセタキセル

図7 CLEOPATRA 試験

トラスツズマブ+ドセタキセルにベルツズマブかプラセボを投与する比較試験でベルツズマブを投与する方が無増悪生存率においてプラセボ群より有意に良好であった。(文献12を改編)

率がベルツズマブ群に多かったが、重要な副作用である左室収縮機能障害は対照群8.3%、ベルツズマブ群4.4%で対照群の方が高率であった。このデータをもとにFDAは2012年6月進行再発乳癌の1st line治療としてベルツズマブ+トラスツズマブ+ドセタキセルの併用に限り、承認した。本邦でも2013年6月進行再発乳癌が適応でベルツズマブ+トラスツズマブ+化学療法併用ということ承認された。

今後進行再発乳癌の1st line治療としてトラスツズマブ+化学療法に加えてベルツズマブ併用が主流となると予想されるが、非常に高額な治療であり、費用対効果の検討も今後重要なポイントであろう。

5. T-DM1

T-DM1はトラスツズマブと微小管重合阻害作用のある化学療法剤である maytansine derivate (DM1) を linker により結合させた薬剤である。トラスツズマブ、ラパチニブ既治療の110例を対象に行われた第II相試験では奏効率32%¹³⁾、トラスツズマブ既治療の112例を対象に行われた第II相試験では奏効率25%であった¹⁴⁾。またHER2陽性進行再発乳癌に対してT-DM1とラパチニブ+カベシタピンを比較する第III相試験(EMILIA試験)¹⁵⁾では主要評価項目である無増悪生存期間において中央値がT-DM1 9.6ヵ月、ラパチニブ+カベシタピン6.4ヵ月で有意にT-DM1群で良好であった($P < 0.0001$) (図8)。副次評価項目である全生存率($P = 0.0005$)、奏効率(43.6 : 30.8%, $P = 0.0002$)でも同様にT-DM1群の方が良好であるという結果であった。副作用は下痢、嘔吐がラパチニブ+カベシタピンに多かったが、肝機能障害、血小板減少

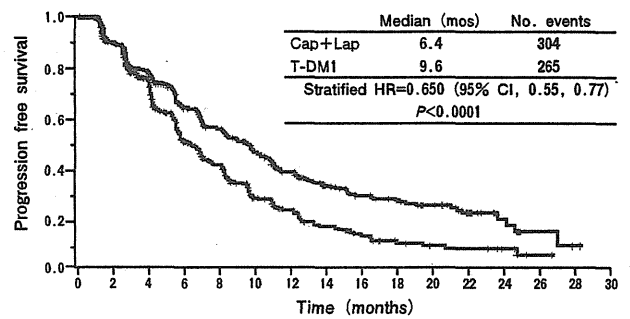


図8 EMILIA 試験

T-DM1とカベシタピン+ラパチニブを比較した試験で無増悪生存率においてT-DMの方が有意に良好であった。(文献15を改編)

がT-DM1群に多くみられた。特に血小板減少はT-DM1群でGrade 3以上が12.8%にみられ、要注意と思われる。FDAでは2013年2月に承認、本邦でも近々承認予定である。

本邦ではT-DM1を含めて抗HER2療法薬として4剤が使用可能になるが、現在T-DM1+ベルツズマブ、T-DM1+プラセボ、トラスツズマブ+タキサンを比較する第III試験(MARIANNE試験)が進行中である。この結果をもとにHER2陽性進行再発乳癌における今後の1st lineおよびそれ以降の使用基準が明らかになるとと思われる。

6. Neratinib

NeratinibはHER1(EGFR)、HER2、HER4の細胞内チロシンキナーゼドメインを標的としてチロシンキナーゼ活性を不可逆的に阻害する薬剤である。136例が登録された第II相試験ではトラスツズマブ既治療例の無増悪生存期間中央値は22.3週、奏効率24%、未治療例では39.6週、56%であった¹⁶⁾。現在neratinib単剤とラパチニブ+カベシタピンの第II相比較試験が進行中で今後期待される薬剤である。

抗VEGF抗体(ベバシズマブ)

ベバシズマブはマウス抗VEGF(vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子)モノクローナル抗体をもとにヒト化した、抗VEGFモノクローナル抗体である。VEGFは血管新生の調節因子で多くの癌において発現が亢進しており、増殖、転移に関与している。ベバシズマブはVEGFと選択的に結合し、VEGFR-1、VEGFR-2との結合を阻害し、VEGFによるシグナル伝達を遮断し、血管新生を抑制するという作用機序であ

る。米国では2004年2月転移性結腸・直腸癌で承認されているが、本邦では2007年4月進行・再発結腸・直腸癌、2009年11月には進行・再発非小細胞肺癌で承認、2011年9月に進行再発乳癌において承認された。代表的臨床試験が転移・再発乳癌患者722例を対象に1st lineで行われたパクリタキセル+パシズマブとパクリタキセル単剤の第Ⅲ相比較試験 (E2100試験) である¹⁷⁾。主要評価項目である無増悪期間において中央値が併用群11.3ヵ月、単剤群5.8ヵ月と有意差がみられた ($P < 0.0001$, ハザード比0.483) (図9)。奏効率でも49.8%と22.2%で有意に併用群が良好であったが、全生存率においては中央値26.5ヵ月と24.8ヵ月で差はみられなかった ($P = 0.1374$)。ドセタキセル+パシズマブの比較試験 (AVADO試験) やカベシタピン、タキサン+パシズマブの比較試験 (Ribbon-1試験) でも同様にパシズマブ併用群で無増悪期間の延長、奏効率の上昇が確認されたが、いずれの試験でも全生存率に有意差はみられなかった。本邦での第Ⅱ相試験 (JO19901試験)¹⁸⁾ はパシズマブとパクリタキセルの併用試験で行われ、122例が登録された。無増悪期間は中央値12.9ヵ月、奏効率73.5%と良好な結果であった。主な副作用はGrade 3以上で好中球減少42.5%、白血球減少26.7%、末梢性ニューロパシー25.8%、高血圧16.7%となっていた。高血圧に伴うと思われる鼻出血は70.8%にみられている。さらに重大な副作用としてショック、アナフィラキシー様症状・infusion reaction (蕁麻疹、呼吸困難、口唇浮腫など) 1.8%、消化管穿孔0.9%、瘻孔0.3%、創傷治癒遅延0.5%、出血 (消化管出血、肺出血、脳出血など) 19.0%などが報告されている。

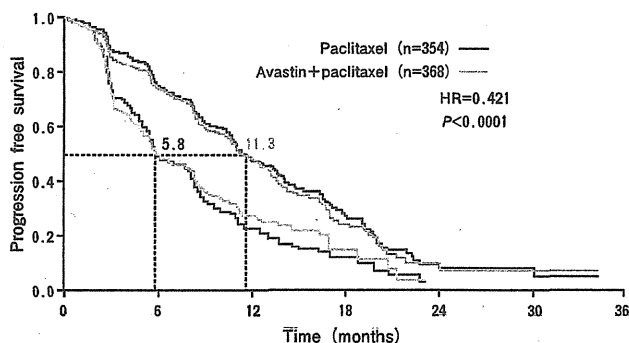


図9 E2100試験
パクリタキセルとパクリタキセル+パシズマブを比較した試験で無増悪生存率において併用群の方が良好であった。(文献17を改編)

mTOR 阻害剤 (エベロリムス)

mTOR (mammalian target of rapamycin) は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /AKT の下流に位置する重要な細胞内増殖シグナル伝達分子で細胞増殖、代謝活性、血管新生を誘導する調節因子である。mTOR 阻害剤は cyclinD1 を介した細胞増殖抑制作用、glut-1 を介した代謝活性抑制作用に加え、hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を抑え、VEGF 産生を低下させ、血管新生を抑制する作用がある。臨床試験ではアロマターゼ阻害剤抵抗性閉経後ホルモン受容体陽性転移乳癌に対してタモキシフェン+エベロリムスとタモキシフェンを比較した TAMRAD 試験¹⁹⁾ において腫瘍増悪までの期間は併用群8.6ヵ月、単剤群4.5ヵ月と併用群において有意に良好であった ($P = 0.002$, ハザード比0.54)。全生存率も同様に併用群で有意に良好であった ($P = 0.007$, ハザード比0.44)。また非ステロイドアロマターゼ阻害剤抵抗性となった閉経後ER陽性HER2陰性転移乳癌724人に対してエグゼメスタン+エベロリムスとエグゼメスタン+プラセボで比較した第Ⅲ相比較試験 (BOLERO-2試験)²⁰⁾ では、無増悪期間中央値においてエベロリムス群11.0ヵ月、プラセボ群4.1ヵ月で併用群で有意な延長を認めた ($P < 10^{-16}$) (図10)。奏効率は12.0%と1.3% ($P < 0.0001$)、臨床的有効率50.5%と25.5% ($P < 0.0001$) とともに併用群が有意であった。主な副作用はGrade 3以上で口内炎8%、倦怠感5%、下痢3%、非感染性肺臓炎3%、高血糖6%であった。ただ免疫抑制作用があり、B型肝炎キャリア患者におけるウイルス再活性化による劇症肝炎について注意を払う必要がある。

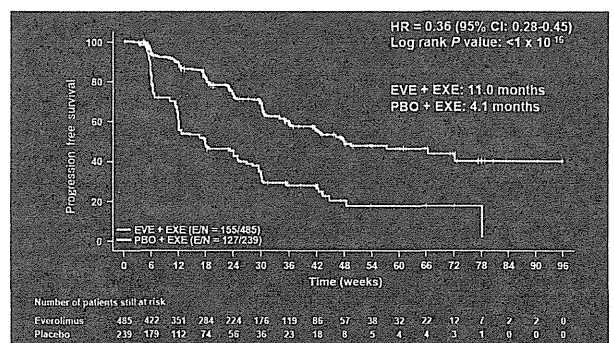


図10 BOLERO-2試験
エベロリムス (EVE) +エグゼメスタン (EXE) とエグゼメスタン+プラセボ (PBO) での比較試験で無増悪生存率において併用群の方が有意に良好であった。(文献20を改編)

Poly ADP-ribose polymerase (PARP) 阻害剤

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC)、すなわち ER 陰性、PgR 陰性、HER2陰性乳癌は BRCA1遺伝子変異を有することが多く、治療抵抗性で予後不良である。PARP は BRCA とともに DNA 修復における重要な役割を担っており、いずれかが機能していれば DNA の修復が可能である。DNA 障害性の抗癌剤と PARP 阻害剤の併用により BRCA 機能が低下した腫瘍細胞では修復機構が働かないため選択的に抑制されることになる。このような理論的背景をもとに PARP 阻害剤の開発が進められている。転移性 TNBC を対象に行われた第Ⅱ相試験では、ゲムシタピン+カルボプラチンに PARP1阻害剤である iniparib を加えることで無増悪期間、生存率が改善することが示唆されたが²¹⁾、第Ⅲ試験では再現されなかった。TNBC に対する有効な治療法はなく、PARP 阻害剤の新薬を含め今後の臨床試験結果が待ち望まれている状況である。

おわりに

乳癌における分子標的薬は抗 HER2療法剤を中心に多数開発が進められている。多くの薬剤で無増悪生存率や奏効率の改善がみられているが、全生存率の改善に結びついている薬剤はわずかである。副作用の面では infusion reaction、皮疹、下痢などの特徴的なものがあるが、通常の化学療法剤とは異なり、分子標的薬そのものによる嘔気・嘔吐、脱毛、白血球減少などはほとんどみられない。従って比較的使用しやすい薬剤であるが、いずれも高価であり、費用対効果すなわち増分費用効果比 (ICER: incremental cost-effectiveness ratio) や quality-adjusted life year (QALY) の面からの検討も必要であろう。

文 献

- 1) Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol* (2009) 20, 1319-1329.
- 2) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B: Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* (2011) 22, 1736-1747.
- 3) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, et al.: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* (2007) 131, 18-43.
- 4) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* (2001) 344, 783-792.
- 5) Tokuda Y, Watanabe T, Omuro Y, Ando M, Katsumata N, Okumura A, Ohta M, Fujii H, Sasaki Y, Niwa T, Tajima T: Dose escalation and pharmacokinetic study of a humanized anti-HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Br J Cancer* (1999) 81, 1419-1425.
- 6) Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, et al.: 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* (2007) 369, 29-36.
- 7) Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R: Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER2-positive early breast cancer. *Oncologist* (2006) S4-12.
- 8) Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, Jackisch C, Cameron D, Weber HA, Heinzmann D, Lago LD, McFadden E, et al.: 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* (2013), 382, 1021-1028.
- 9) Pivot X, Romieu G, Debled M, Pierga JY, Kerbrat P, Bachelot T, Lortholary A, Espié M, Fumoleau P, Serin D, Jacquin JP, Jouannaud C, et al.: 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2013) 14, 741-748.
- 10) Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, et al.: Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* (2006) 355, 2733-2743.
- 11) Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L: Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that

- progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* (2010) 28, 1138-1144.
- 12) Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, et al. : CLEOPATRA Study Group : Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2012) 366, 109-119.
 - 13) Krop I : 32nd annual San Antonio Breast Cancer Symposium. (2009) abstr. P5090.
 - 14) Burris HA 3rd, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S, Amler L, Zheng M, et al. : Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol* (2011) 29, 398-405.
 - 15) Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, et al. : EMILIA Study Group : Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* (2012) 367, 1783-1791.
 - 16) Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, Jiang Z, Paridaens R, Tan AR, Awada A, Ranade A, Jiao S, Schwartz G, Abbas R, Powell C, Neratinib, et al. : Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* (2010) 28, 1301-1307.
 - 17) Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE : Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2007) 357, 2666-2676.
 - 18) Aogi K, Masuda N, Ohno S, Oda T, Iwata H, Kashiwaba M, Fujiwara Y, Kamigaki S, Ito Y, Ueno T, Takashima S : First-line bevacizumab in combination with weekly paclitaxel for metastatic breast cancer : efficacy and safety results from a large, open-label, single-arm Japanese study. *Breast Cancer Res Treat* (2011) 129, 829-838.
 - 19) Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, Ray-Coquard I, Ferrero JM, Freyer G, Abadie-Lacourtoisie S, Eymard JC, Debled M, Spaëth D, Legouffe E, Allouache D, et al. : Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors : a GINECO study. *J Clin Oncol* (2012) 30, 2718-2724.
 - 20) Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, et al. : Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* (2012) 366, 520-529.
 - 21) O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C : Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* (2011) 364, 205-214.

Probiotic Beverage with Soy Isoflavone Consumption for Breast Cancer Prevention: A Case-control Study

Masakazu Toi, Saya Hirota, Ai Tomotaki, Nobuaki Sato, Yasuo Hozumi, Keisei Anan, Takeshi Nagashima, Yutaka Tokuda, Norikazu Masuda, Shozo Ohsumi, Shinji Ohno, Masato Takahashi, Hironori Hayashi, Seiichiro Yamamoto and Yasuo Ohashi*

Department of Biostatistics, School of Public Health, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongou, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan

Abstract: The purpose of this study is to evaluate how beverages containing *Lactobacillus casei* Shirota (BLS) and soy isoflavone consumption since adolescence affected the incidence of breast cancer. In a population-based case-control study, three hundred and six cases with breast cancer and 662 controls aged 40 to 55 were matched for age and residential area and included in the analyses. Diet, lifestyle and other breast cancer risk factors were investigated using the self-administered questionnaire and interview. Odds ratios (ORs) of BLS and soy isoflavone consumption for breast cancer incidence were independently and jointly estimated using a conditional logistic regression. The ORs of BLS consumption (\geq four times a week against $<$ four times a week) was 0.65 and statistically significant ($p = 0.048$). The analysis of association between soy consumption and breast cancer incidence showed the more the isoflavone consumption is, the lower the odds of breast cancer becomes. Adjusted ORs for breast cancer in the second, the third and the fourth quartiles of soy consumption against the first quartile were 0.76, 0.53 and 0.48, respectively (trend test, $p = 0.0002$). The BLS-isoflavone interaction was not statistically significant; however, a biological interaction was suggested. Regular consumption of BLS and isoflavones since adolescence was inversely associated with the incidence of breast cancer in Japanese women.

Keywords: Breast cancer, *Lactobacillus casei* Shirota, probiotic beverage, soy isoflavones.

1. INTRODUCTION

The breast cancer incidence in Japan had been lower compared to the Western countries; however, rapid increase of the incidence was observed in the past 10 to 15 years as in other Asian countries [1]. The number of new breast cancer cases in Japanese women surpassed that of stomach cancer to become the most frequent of all cancers in 1994. An estimated 45700 women were newly diagnosed with breast cancer in 2003 (an estimated 36500 with stomach cancer) [2]. One of the likely causes of the rapid increase in Japan is the increased estrogen exposure [3], one of the important breast cancer risk factors, which is due to delayed first delivery and decreased number of child births. However, only about 40% of the increase can be explained by age of menarche, age of menopause, age of having the first child, and number of births. Changes in the traditional Japanese lifestyle and increase of obesity are possible contributing factors [4].

Beverages containing *Lactobacillus casei* Shirota (BLS, Yakult®, Yakult Honsha, Co. Ltd., Tokyo, Japan) have been sold in Japan since 1935. According to the manufacturer's data, 84% of BLS were sold through a unique personal home and office delivery system in 1985, and the product took up

an estimated 50% or more of the Japanese fermented dairy product market in 1970s and 1980s.

A Japanese case-control study showed regular consumption of BLS was inversely associated with occurrence of bladder cancer [5]. *Lactobacillus casei* Shirota was shown to prevent recurrence of colon polyp in a randomized trial [6] and to prevent recurrence of superficial bladder cancer in two randomized trials [7, 8]. The cancer preventive effect of BLS may be explained by potentiation of natural killer (NK) cell activation by *Lactobacillus casei* Shirota and NK cell-mediated antitumor activity [9].

The association between soy consumption and occurrence of breast cancer has been evaluated in a number of epidemiological studies. Studies in Japan showed that soy consumption was inversely associated with occurrence of breast cancer in a cohort study by Yamamoto and colleagues [10], and Hirose [11] reported the same association in a hospital-based case-control study. A meta-analysis conducted by Wu and colleagues [12] also showed an inverse association when the analysis included only studies conducted in Asian countries where soy consumption is high.

The mechanism of soy to prevent breast cancer may be ascribed to estrogenic and anti-estrogenic actions of isoflavones such as genistein and daidzein contained in soy. In a nested case-control study conducted along with the Japanese cohort study [13], an inverse association between serum isoflavone level and occurrence of breast cancer was reported. Intestinal flora is known to affect the isoflavone me-

*Address correspondence to this author at the Professor, Department of Biostatistics, School of Public Health, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongou, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan; Tel: +81-3-5841-3518; Fax: +81-3-3814-2779; E-mail: ohashi@epistat.m.u-tokyo.ac.jp

tabolism, especially the metabolism of an isoflavone phytoestrogen daidzein [14].

On the other hand, consumption of BLS was shown to affect the intestinal flora in a randomized double-blind study [15], suggesting BLS consumption may modify the preventive effect of soy isoflavones against breast cancer.

Based on these findings, we evaluated the role of probiotic beverages in breast cancer prevention in Japanese women with implication of soy isoflavone consumption in a population-based case-control study. The study is to explore the cause of the recent rapid increase of breast cancer in Japan and the possibility of breast cancer prevention by lifestyle modification.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study Setting and Participants

This population-based case-control study took place in 14 areas in Japan. The catchment areas were selected so that both rural and urban areas were covered. Cases were defined as Japanese women aged 40 to 55 at the time of consent, who had undergone operation for the International Union against Cancer Tumor Node Metastasis (UICC-TNM) Stage 0 or I unilateral or bilateral primary breast cancer at one of 14 study centers within one year prior to participation. Women who had breast cancer of UICC-TNM Stage II or higher and those with other types of cancer were excluded.

Controls were Japanese women living in the catchment areas aged between 40 and 55 without past or present breast cancer. Women aged 40 to 55 were first picked out from the catchment areas based on the Basic Resident Register, and potential controls were randomly selected. Once a case was included in the study, controls matched to the case for age (the range of target age was divided into two-year brackets) and residential area were randomly selected from the pool of candidate controls and invited to participate. Invitation letters were sent until two controls were selected for a case.

The study was approved by the institutional review board of all study centers. Cases and controls were recruited between October 9, 2007 and March 31, 2009. Informed consent was obtained from all cases and controls enrolled in the study.

2.2. Procedures

A self-administered questionnaire survey and interviews were conducted. To avoid recall biases, participants were asked about their past BLS and soy consumption in interviews. Frequency and duration of BLS consumption and frequency and amount of soy (six items including miso-soup and tofu) consumption during three predetermined time periods; around the age 10 to 12, around the age 20, and 10 to 15 years prior to the study; were asked in the questionnaire. We conducted a self-administered questionnaire survey to ask about their diet (including alcohol consumption), exercise, medical history, and family history during the year before their breast cancer diagnosis to cases and during the year before the survey to controls. We used a self-administered food frequency questionnaire created based on the food frequency questionnaire developed by the Japan National Can-

cer Center (JNCC) [16], of which validity has been confirmed in the previous study showing the effect of soy consumption in the prevention of breast cancer [10].

Cases and matched controls were interviewed by the same trained interviewer who was blinded to the case/control status. A set of self-administered questionnaire forms was handed to each participant at the time of consent. Completed questionnaire forms were kept by participants until the interview and checked by interviewers for omission.

2.3. Exposure Assessment

BLS and isoflavone consumption in the three predetermined time periods was averaged for the purpose of analysis. BLS consumption was classified into regular consumption (≥ 4 times a week) and no consumption (< 4 times a week). Isoflavone consumption was calculated based on the frequency and the amount of the six food items and classified into quartiles according to the daily consumption in the control group: > 43.75 mg/day (the fourth quartile), 28.81 to 43.75 mg/day (the third quartile), 18.76 to 28.81 mg/day (the second quartile), and < 18.76 mg/day (the first quartile).

2.4. Statistical Analysis

Based on a hypothesized OR of 0.55 and a 15% prevalence of exposure to BLS in the control group, the target sample size was calculated to be 355 for cases and 710 for controls to achieve a 80% power with a 5% two-sided type I error. We calculated ORs and 95% confidence intervals (CIs) using a conditional logistic regression model. P-values for potential dose-response of soy isoflavone consumption on breast cancer were calculated based on the same regression model using linear scores. We also performed a subgroup analysis of association between BLS consumption and breast cancer occurrence according to menopausal status.

Cases and controls were matched for age and area of residence for one analysis and for area of residence alone for a separate analysis. Robustness of the results was also examined in a sensitivity analysis using an unconditional logistic regression model, which adjusted the matching variables as covariates. All p-values were two-sided.

Education, physical activity level, history of benign mammary tumor, family history of breast cancer, past/current use of female sex hormones before menopause, age at menarche, number of childbirth, breastfeeding experience, birth weight, BMI at the age 20, smoking status, and current energy intake were taken into account as potential confounders.

We used the SAS LOGISTIC procedure (version 9.1; SAS Institute, Cary, NC) for all analyses.

2.5. Role of the Funding Source

The sponsor organized the study group under one of the projects of Comprehensive Support Project for Oncology Research (CSPOR) [17, 18]. The independent ethics committee and the epidemiology committee of CSPOR approved the study protocol. The funding source of the study, Yakult Honsha Co. Ltd., was not involved in the study design, data collection, data analysis, data interpretation or writing of the

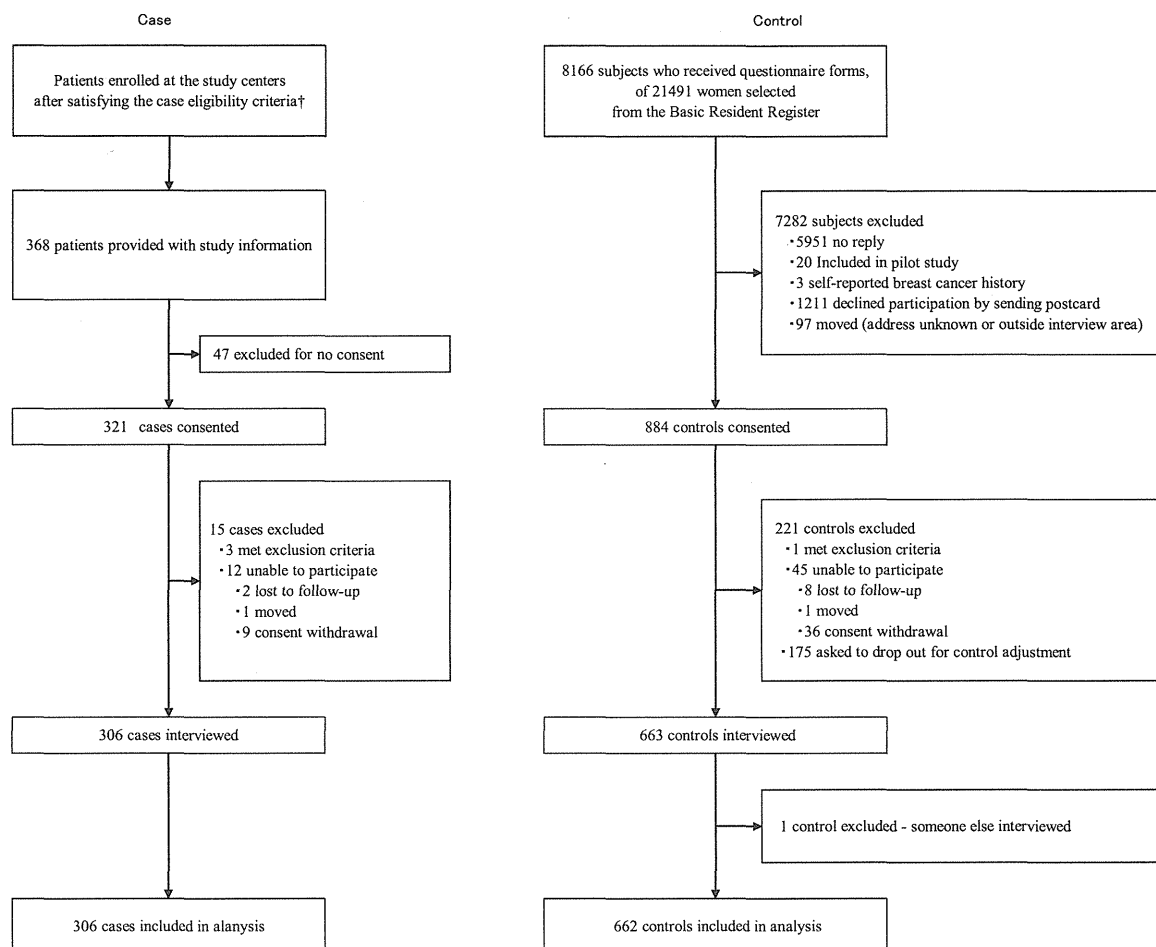


Fig. (1). Study profile.

†: Data for the number patients screened are not available.

study reports. The corresponding author had full access to all the study data and had final responsibility for the decision to submit the study report for publication.

3. RESULTS

(Fig. 1) presents a flow chart of the case and control recruitment process. One control was excluded because we later found out her mother had filled out the questionnaire forms and had been interviewed. Baseline characteristics of 968 participants, including two cases and 32 controls not matched for age due to some adjustment in the sampling procedure, are shown in (Table 1). Statuses of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor in cases are shown in (Table 2).

Crude ORs (matched for age and area of residence) and adjusted ORs (matched for area of residence and adjusted for the age and other confounding factors) for breast cancer in women who had consumed BLS \geq four times per week against those who had consumed $<$ four times per week were 0.66 (95% CI, 0.43–1.02; $p = 0.061$) and 0.65 (95% CI,

0.42–1.00; $p = 0.048$), respectively. (Table 3) Crude ORs for isoflavone consumption in the second, the third and the fourth quartiles against the first quartile were 0.74 (95% CI, 0.49–1.10), 0.58 (0.38–0.88) and 0.52 (0.34–0.79), respectively. (Trend test, $p = 0.0012$) Adjusted ORs were 0.76 (0.52–1.13), 0.53 (0.35–0.81) and 0.48 (0.31–0.73), respectively (trend test, $p = 0.0002$; Table 3).

We present the results of adjusted analysis based on a model in which participants were matched for residential area and age and categorized into the age brackets of 40s and 50s. Categorical age was used as an explanatory variable. The number of participants included in the analysis was maximized with this model. The results were mostly comparable to those of a logistic regression analysis in which the matching factors were adjusted as covariates.

Significant breast cancer risk factors used for adjustment included above high school-level education (adjusted ORs, 0.61 for the BLS analysis and 0.63 for the isoflavone analysis), benign tumor (adjusted ORs, 3.0 and 3.2), and family history of breast cancer (adjusted ORs, 2.1 and 2.2).