

表1. H22年度日本乳癌学会班研究

研究課題：「我が国における遺伝性乳がん・卵巣がん患者及び未発症者への対策に関する研究」

班長	中村 清吾	昭和大学医学部乳腺外科
班員	高橋 将人	北海道がんセンター乳腺外科
	戸崎 光宏	亀田メディカルセンター乳腺科
	中山 貴寛	大阪大学大学院医学系研究科乳腺・内分泌外科
	野水 整	星総合病院外科
	三木 義男	がん研究会癌研究所遺伝子診断研究部
	村上 茂	広島市立安佐市民病院外科
	村上 好恵	首都大学東京健康福祉学部看護学科
班研究協力者		
	青木 大輔	慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
	新井 正美	がん研有明病院遺伝子診療部
	有賀 智之	都立駒込病院外科
	岩瀬 拓士	がん研有明病院乳腺センター
	大住 省三	四国がんセンター乳腺・内分泌外科
	清水 忠夫	東京女子医科大学東医療センター乳腺科
	西村誠一郎	がん研有明病院乳腺センター (現 静岡県立静岡がんセンター乳腺外科)
	馬場 信一	相良病院乳腺外科
	平沢 晃	慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
	藤森 実	東京医科大学茨城医療センター乳腺科
	森 美樹	昭和大学医学部乳腺外科
	山内 英子	聖路加国際病院乳腺外科
	四元 淳子	昭和大学病院プレストセンター

表2. HBOC 遺伝子検査の対象者(2011NCCN)

<ul style="list-style-type: none"> <li>●家系内に <i>BRCA1/2</i> の病的遺伝子変異が確認されている</li> <li>●本人の乳癌歴+以下の条件のうち一つ以上             <ul style="list-style-type: none"> <li>・45歳以下での乳癌診断</li> <li>・本人が50歳以下の乳癌かつ50歳以下の近親者乳癌、かつもしくは年齢問わず：近親者の卵巣癌または卵管癌、腹膜癌</li> <li>・本人の50歳未満での最初の原発癌を含む2個以上の原発乳癌</li> <li>・本人が60歳未満での <i>triple negative</i> 乳癌</li> <li>・本人が50歳未満での乳癌、かつ二度近親者内に2人以上の女性乳癌患者、もしくはどちらかの家系に45歳未満での女性乳癌患者</li> <li>・年齢を問わない乳癌(本人)、かつ三度近親者内に2人以上の乳癌、または卵巣卵管癌、または腹膜癌</li> <li>・三度近親者内の男性乳癌</li> <li>・遺伝子変異率の高い民族の出身(例えばアッシュケナージ)</li> </ul> </li> <li>●本人が卵巣癌、または卵管癌、または腹膜癌</li> <li>●本人が男性乳癌</li> <li>●本人が乳癌、もしくは卵巣癌(年齢問わず)、かつ三度近親者内に2人以上の臓癌(年齢問わず)</li> <li>●本人が臓癌(年齢問わず)、かつ三度近親者内に2人以上の乳癌、もしくは臓癌(年齢問わず)</li> <li>●家族歴のみ             <ul style="list-style-type: none"> <li>・二度近親者内に上記のいずれかが該当する</li> <li>・三度近親者内に乳癌、もしくは卵巣癌、または卵管癌、または腹膜癌、かつ50歳以下の乳癌、もしくは卵巣癌</li> </ul> </li> </ul>
--

subtype(Luminal A/B, HER2, Basal)にて分類して治療法を選択する傾向が定着する中、*BRCA1/2*も例外ではない。日本乳癌学会の班研究の結果では、*BRCA1*陽性乳癌の62%がTN乳癌で、明らかに通常乳癌とは異なる組織型であった(図2)。一方、*BRCA2*ではほぼ通常乳癌と同様の分布を示した。また、*BRCA1*陽

性乳癌では、DCISが見つかる割合が*BRCA2*陽性乳癌に比べて低く、NG3で悪性度が高く、solid-tubular patternを呈する浸潤性乳管癌が多かった(図3)。さらに罹患年齢分布を図4に示すが、通常乳癌に比べて、*BRCA1,2*ともに若年発症の傾向があるものの、*BRCA1*の方がより若年発症の傾向が強かった。この

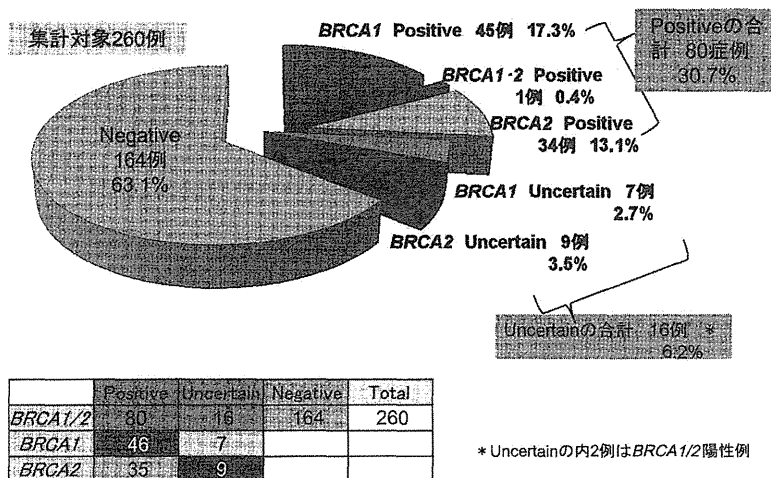


図1. 日本乳癌学会 HBOC 班研究における日本人における BRCA1/2 遺伝子の変異検出

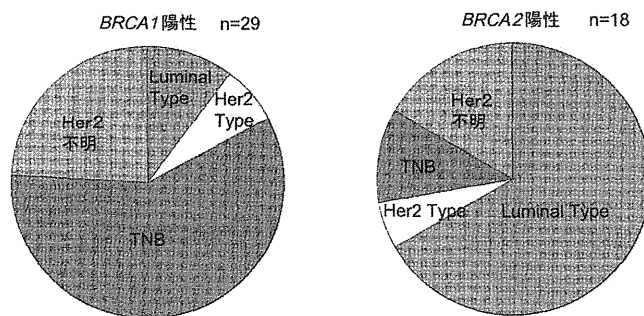


図2. BRCA1/2変異陽性例における乳癌のタイプ

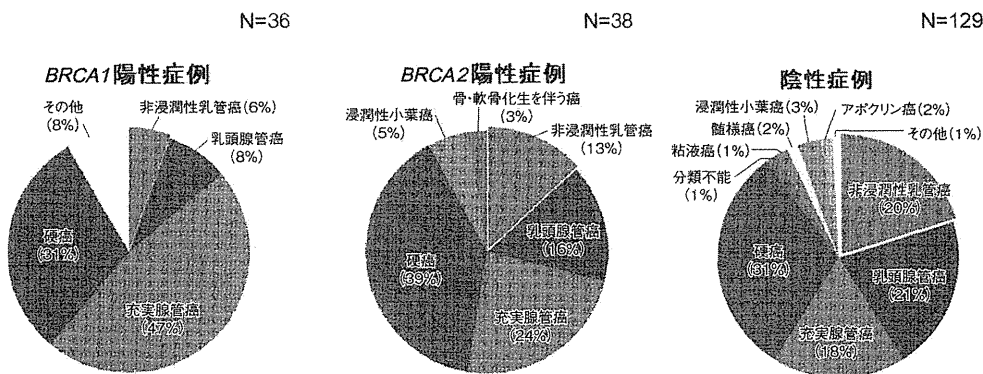


図3. BRCA1/2の変異と乳癌の組織型

結果からも、NCCNのガイドラインにおいて、18歳から視触診、25歳からマンモグラフィ検診を組み込んでいる妥当性が伺われる。一方、若年者は、高濃度乳房である可能性が高く、マンモグラフィでの見逃し率が問題となっていた。2004年に、カナダのWarnerらは、BRCA1/2未発症陽性者236名に対して、半年に1回の視触診およびMRI、マンモグラフィ、超音波検査の3つのモダリティを同時に用いて、年1回の検診を施行(期間1~3年)したところ、22名の乳癌が見つかり、16人浸潤癌、6人非浸潤癌であった。3年以内

に約10%に乳癌を発症しており、きわめて発症リスクが高いことを示すと同時に、マンモグラフィと超音波検査の感度がそれぞれ36%、33%であったのに比べ、MRIは77%の高い感度を示した<sup>9)</sup>。これらを含め、乳癌ハイリスク症例に対する検診のシステムティックレビューでは、マンモグラフィとMRIを併用した検診で、94%の感度と77%の特異度が示されている<sup>9-13)</sup>。そこで、米国では、生涯発症確率が20%を超える女性に対してはMRIによる検診が勧められている。わが国でも、2012年に日本乳癌検診学会において乳房MRI

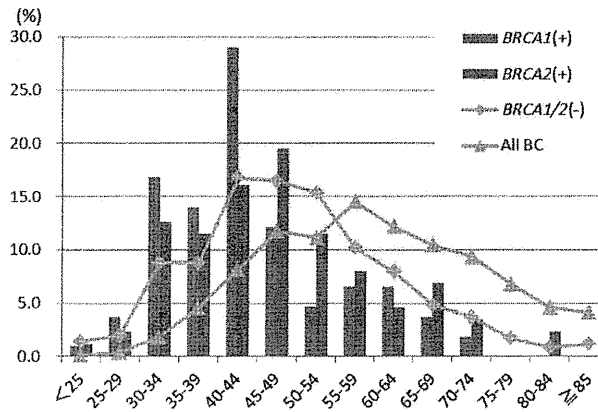


図4. BRCA1/2 mutation and breast cancer incidence by age

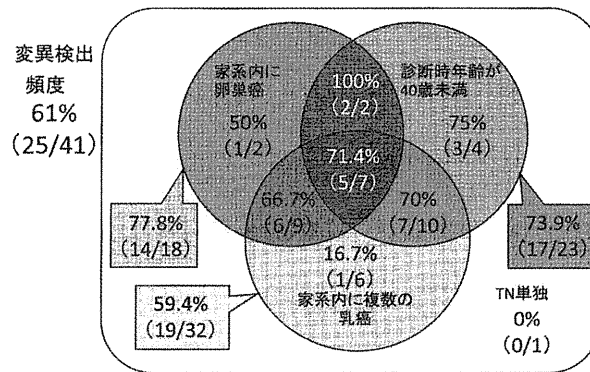


図5. Triple negative 乳癌(TNB)41例の背景因子と BRCA1/2 の変異検出数

スクリーニングのガイドラインが策定された。

### 3. Triple Negative 乳癌について

NCCN ガイドラインにおいて、60歳以下の TN 乳癌は単独でも HBOC を疑う因子となっている。前述の如く、TN 乳癌は BRCA1 陽性乳癌の62%を占め、さらに40歳未満発症、あるいは家系内に卵巣癌患者を有する、あるいは複数の乳癌患者を認める、といった条件を併せ持つと、かなりの高率で BRCA1 陽性乳癌が発見される(図5)。特に、L63X という変異部位は、今回の調査研究で10家系に認められ、日本人での創始者変異の可能性がある(表3)。また、BRCA1 陽性の TN 乳癌は白金製剤の感受性が高く、PARP1阻害剤が有効な可能性があり、現在さまざまな治験が行われている。また、一部に、Taxan 系薬剤に耐性を示すことがある。したがって、通常タイプの乳癌とは異なる薬物療法を選択することも考慮に入れなければならない。

また、増殖能が高く、急速増大するケースがあり、中間期乳癌として発見されることもある。したがって、MRI を年1回や超音波検査を年2回等、上手に組み合わせた検診プログラムが望ましい。

表3. Mutations detected in more than two families

BRCA1		BRCA2	
L63X	10	5804del4	4
Q934X	2	R2318X	4
3561delG	2	I2675V	2
		S1882X	2
Total number	46	Total number	35

### 4. ハイリスク検診に期待される新たな画像診断

前述の如く、乳癌ハイリスクに対する検診手段として、欧米では MRI スクリーニングが推奨されている。しかしながら、MRI は設備投資もかかり、1回当たりの検査費用が高額である。また、疑陽性率が高いことも難点である。そこで、欧米では造影マンモグラフィ(CESM:contrast enhanced spectral mammography)という新たな検査法が開発され、ハイリスク検診への応用が期待されている<sup>10)</sup>。CESM は、ヨード造影剤を経静脈的に注入し、2分経過後に約5分かけて通常の撮影ポジションにて両側乳房を二方向ずつ撮影し、造影剤注入前後の画像をデジタル処理にて瞬時にサブトラクションするというものである。したがって、背景

乳腺の density が取り除かれ、病変がより明瞭に観察される。

その他、PEM(positron emission mammography)という、PET(positron emission tomography)と同様の原理を用い、さらにマンモグラフィを撮影するときと同様に専用のディテクターが組み込まれた圧迫版で乳房をはさんだ状態で撮像するものである。したがって、5 mm 以下の病変の同定が難しい PET に比べ、1.6mm 程度までの解像度が得られる。また、MRI に比べ、乳腺症や月経周期の影響を受けず、疑陽性率が低いことが特徴である<sup>15)</sup>。その一方、30歳未満の BRCA 1/2 陽性保因者では、マンモグラフィ検診ですら被曝による発癌リスクが懸念されているので、若年者には不向きである。

さらには、一般に普及している超音波検査も、フローイメージングやエラストグラフィを用いることで、良悪性鑑別における精度が上がり、ハイリスク検診における位置づけを再検討することが必要である。

#### さいごに

本領域は、BRCA 検査に始まり、MRI 検診、卵巣卵管や乳房のリスク低減切除手術、人工乳房による再建手術等、保健適用ではないことが、欧米に比べて著しく診療水準の遅滞をもたらした。したがって、まず BRCA 検査を手始めに、先進医療に組み込むことで、わが国としてのデータを集め、効用が明確化されたものから順次保険適用への道を開くことが肝要である。

#### 【文 献】

- 1) Ford D, Easton DF, Stratton M, J et al: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 62 : 676-689, 1998
- 2) Tereschenko IV, Basham VM, Ponder BA, et al: BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer. *Hum Mutat*, 19 : 184, 2002
- 3) Diez O, Osorio A, Duran M, et al: Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat*, 22 : 301-312, 2003
- 4) Sugano K, Nakamura S, Ando J, et al: Cross-sectional analysis of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer. *Cancer Science*, 99 : 1967-1976, 2008
- 5) Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, et al: The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 19 : 86, 2009
- 6) Fostira F, Tsitlaidou M, Papadimitriou C, et al: Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res Treat*, 134 : 353-362, 2012
- 7) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™). National Comprehensive Cancer Network  
[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf)
- 8) Warner E, Plewes DB, Hill KA, et al: Surveillance of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with magnetic resonance imaging, ultrasound, mammography, and clinical breast examination. *JAMA*, 292 : 1317-1325, 2004
- 9) Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, et al: Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med*, 351 : 427-437, 2004
- 10) Stoutjesdijk MJ, Boetes C, Jager GJ, et al: Magnetic resonance imaging and mammography in women with a hereditary risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93 : 1095-1102, 2001
- 11) Leach MO, Boggis CR, Dixon AK, et al: Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS). *Lancet*, 9473 : 1769-1778, 2005
- 12) Warner E, Messersmith H, Causer P, et al: Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer. *Ann Intern Med*, 48 : 671-679, 2008
- 13) Saslow E, Boetes C, Burke B, et al: American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an Adjunct to Mammography. *Cancer J Clin*, 57 : 75-89, 2007
- 14) Jochelson MS, Dershaw DD, Sung JS, et al: Bilateral contrast-enhanced dual-energy digital mammography: feasibility and comparison with conventional digital mammography and MR imaging in women with known breast carcinoma. *Radiology*, 266 : 743-51, 2013
- 15) Kalles V, Zografos GC, Provatopoulou X, et al: The current status of positron emission mammography in breast cancer diagnosis. *Breast Cancer*, 20 : 123-130, 2013

---

---

## シンポジウム

---

---

### 3. 診療ガイドラインの社会的意義と問題点

#### 1) ガイドライン概観

～ガイドライン作成のコンセプトと社会的意義をどう考えるか～

#### (1) 乳癌診療ガイドライン—Web化によるメリットと今後の展望—

中村 清吾

**Key words** : 診療ガイドライン, EBM, NCCNガイドライン

#### 1. これまでの診療ガイドラインの特徴と問題点

乳癌診療ガイドライン策定にあたっての基本的な作業工程は、図1に示す如く、まず、臨床家がしばしば遭遇するような診療上の疑問をClinical question (CQ)として掲げることから始まる。次に、各CQに基づく文献を図書館の司書の方と連携して検索（関連する一連の文献の中から、ハイレベルエビデンス或いは临床上重要と思われる論文を漏れなく検索）し、参考とすべき論文を取捨選択する。さらにそれらを鵜呑みにすることなく、一つ一つを批判的に吟味して推奨グレードと推奨文ならびに解説を加えたものが基本形となっている。したがって、標準

治療の骨子と、その背景にあるエビデンスを学ぶには最適のツールである。また、推奨文を作成するうえで採用した論文は、エビデンスレベルが一目瞭然にわかるように構造化抄録という統一フォーマットにしたがってアブストラクトを作っている(図2)。これは、EBMを重視した作成手順で、EBM教育で有名なMcMaster大学等があるカナダのオンタリオ州で作成されているものに近く、Canadian style guidelineとも称される。2004年に、薬物療法のガイドラインが、金原出版より出版され、その翌年に、残りの4分野(外科療法、放射線療法、検診・診断、予防・疫学)のガイドラインが刊行された。そして、次の年には、5分野すべてを対象に、患者向けにガイドラインをわかり易く解説した「乳癌ガイドラインの患者向け解説」を出版し、患者教育

---

昭和大学外科学講座乳腺外科学部門

110th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine: Symposium: 3. Social Impacts and Controversial Points of Clinical Practice Guidelines; 1) Overview of Guidelines: Concepts of making clinical practice guidelines and discussion on their social impacts, (1) Breast cancer practice guideline.

Seigo Nakamura : Division of Breast Surgical Oncology, Department of Surgery, Showa University School of Medicine, Japan.

本講演は、平成25年4月14日(日)東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

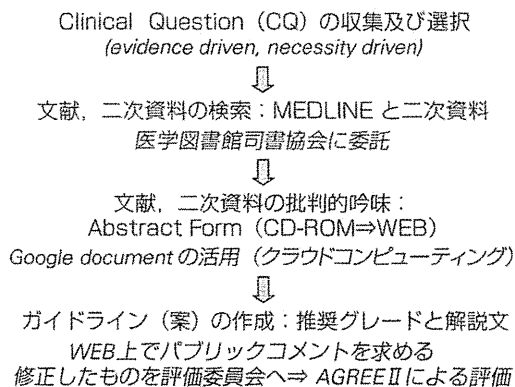


図 1. ガイドラインの作成手順 2011

や啓蒙に役立てるようにし、3年間で一巡する仕組みとなった。これまで7年間で、全分野が少なくとも2回の改訂がおこなわれ、2010年には、薬物療法の3度目の改訂がなされた。

しかし、①改訂は3年に1回のため、実診療とのギャップが生ずる②5分冊化されており、日常診療の流れの中で使ううえで、使いにくい③本の場合には、ページ数の制限もあり、分冊化が必要となる、といった問題点が指摘されており、特に、日進月歩の薬物療法の領域では、3年の間に標準治療の概念が大きく変わることもあり、抜本的な改善が必要であった。そこで、これらの問題点を一気に解決する手段として、Web化を進めることとなった。

## 2. Web化の特徴

Web版の最大の利点は、速報性にある。本の形で出す場合、その制作工程や、印刷の都合上、どんなに頑張っても年1回の改訂がせいぜいであるが、Web版は、原型さえ出来てしまえば、修正作業の多くは、作成者側で随時可能となり、随時一斉配信ができる。ページ数を気にする必要がないため、網羅性のある内容とすることが可能である。また、コンピュータならではの、豊富な検索機能が利用できるため、これまでの5分野を統合した利用が漸く実現できた(図3)。

今回のWeb版では、NCCNのガイドライン日本語版とリンクし、フローチャートの分岐部に相当するCQがある場合は、その内容を瞬時に参照できるようにした。こうすることで、日米ガイドラインの相違点がわかり、特に早期に保険承認や適応拡大を要望すべき課題が明確化することを期待した。

また、Web版では、これまでの5分野ごとに作成したCQによる検索の他、キーワード入力により、関連CQ一覧を表示させ、その中から、自分が知りたいCQを参照するという方法を取り入れた他、NCCNガイドライン側から、アルゴリズムの分岐点となる根拠のCQにリンクし、その背景にある根拠を深く理解するといった使い方も可能とした。また、使用された論文は構造化抄録を参照でき、その概要やエビデンスレベル、特に主な結果を記憶に留めるのに役立つ。さらに、もっと深く理解したい場合は、PubMedにもリンクしているので、関連論文の検索や、論文そのものを入手する場合に有用である。

## 3. ガイドライン活用のポイント

まず、ガイドラインを理解するうえで、もっとも重要な点は、推奨グレードの意味するところである。表に日本乳がんガイドラインで採用している推奨グレードの定義を示す。

2009年までは、A、B、C、Dの4段階であったが、ハイレベルエビデンスがないCQの場合、専門家のコンセンサスがどの程度得られているかを示すために、2010年からは、グレードCをC1とC2に分けた。さらに、C1、C2に区分する際に、作成委員によるVotingを採用し、過半数の賛成が得られた場合をC1とした(表)。なお、このVotingに際しては、予め提出されている日本乳癌学会が定めたCOIに該当するCQが抵触する場合は、自主的に外れてもらうようにした。

作成されたガイドラインは、AGREE(Appraisal of Guidelines for Research & Evaluation) IIとい

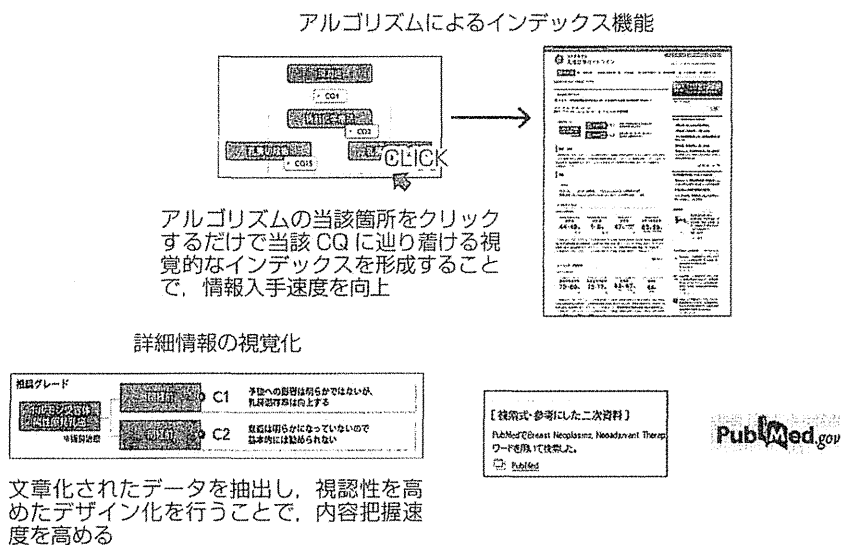


図 2. Webの作成コンセプト：情報把握速度の向上

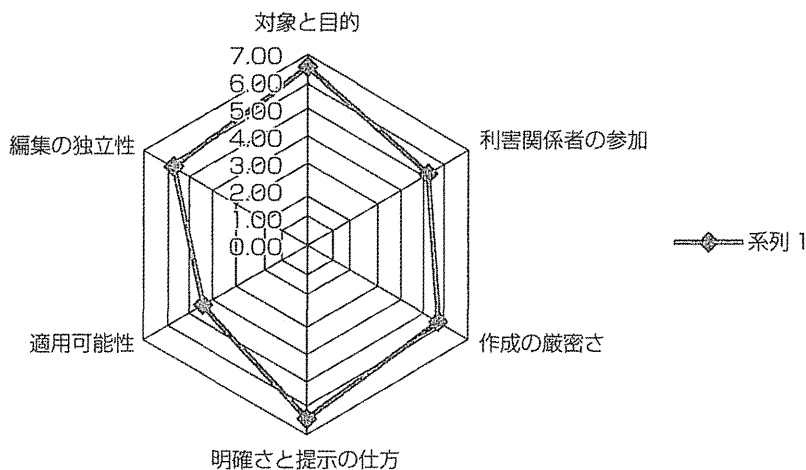


図 3. AGREE II による評価

うガイドラインの質的評価をするためのツールを用いて、別途独立して定められた評価委員会では、図 4 のような報告書が作成された。

また、日本乳癌学会規約委員会が作成した用語集にもリンクし、現時点でコンセンサスの得られている正しい表記が検索可能である。

#### 4. ガイドライン活用の実際

WEB版ガイドラインの活用法を具体的な症例をもとに紹介する。例えば、妊娠 20 週の女性が、5.4 cm という進行乳癌を呈して来院したと仮定する。妊娠期乳癌は、稀であり、その時々標準治療を確認することは大変重要である。例えば、WEB版では、右上に、フリーワード検索という

表. 乳癌診療ガイドライン推奨グレードの変更点

推奨グレード 2007年版	
A	十分なエビデンスがあり、推奨内容を日常臨床で積極的に実践するように推奨する
B	エビデンスがあり、推奨内容を日常臨床で実践するように推奨する
C	エビデンスは十分とはいえないので、日常臨床で実践する際は十分な注意を必要とする
D	患者に害悪、不利益が及ぶ可能性があるというエビデンスがあるので、日常臨床では実践しないよう推奨する

↓

推奨グレード 2010年版	
A	十分な科学的根拠があり、積極的に実践するように推奨する
B	科学的根拠があり、実践するように推奨する
C1	十分な科学的根拠はないが、細心の注意のもと行うことを考慮してもよい
C2	科学的根拠は十分とはいえず、実践することは基本的に勧められない
D	患者に不利益が及ぶ可能性があるという科学的根拠があるので、実践しないように推奨する

論文名	Ovarian ablation in Early Cancer : Overview.....
エビデンスレベル	1a
著者	EBCTCG
論文名、発行年、掲載ページ	Lancet 1996 : 348 : 1189-96
目的	早期乳癌に対する卵巣機能抑制の効果は.....
実施機関	EBCTCG
研究期間	1980-1995
対象患者	12のランダム化比較試験に登録された50歳未満の早期乳癌患者
介入	12のランダム化比較試験における、卵巣機能抑制群と無治療群のメタアナリシス(1995時点)
主たる評価項目	15年生存率、無病生存率
結果	卵巣機能抑制 対 無治療 : 52.4% : 46.1% 2p=0.001.....
結論	卵巣機能抑制は、有意に15年生存率を高め.....
評価者	向井博文
コメント	12のランダム化比較試験をもとにしたメタアナリシスでは、卵巣切除を含む卵巣機能抑制は....

図4. 構造化抄録の例

カラムがあり、ここに「妊娠期乳癌」というキーワードを入れて検索してみる。すると、図5の如く、「妊娠期乳癌」という言葉が使われているCQの一覧が表示される。従来の書籍では、「薬物療法」「手術療法」等5分冊となっていたため、それぞれの本の索引から検索しなければならなかったが、今回のWEB版では、「妊娠期乳癌」と

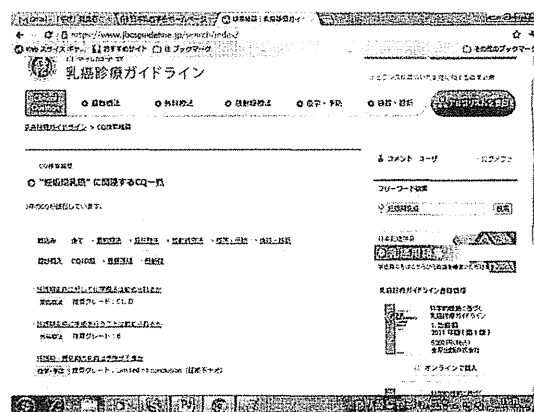


図5. Web版診療ガイドラインにおけるCQの検索例

いうキーワードで一括検索が瞬時に可能となった。よく、妊娠期には化学療法は禁忌ではないかと誤解する向きがあるが、妊娠中期以降では、FACやPacritaxelなどを、投与することが可能であることが記載されている。手術に関しても妊娠中期以降であれば同様である。予防・疫学のガイドラインでは、Stageを合わせて比較すると、その予後は通常の乳癌と同様ではないかというエビデンスも紹介されている。また、本ガイドラインは、日本乳癌学会規約委員会で作られた用語集ともリンクしており、論文を記載する際、正しい用語を確認する等の場面でも、大変便利である。この他、前述の如く、参考文献の構造化



QIの結果をガイドライン策定に反映

- ・ 診療ガイドラインのカバー範囲（日本乳癌学会推奨グレード）
- Option 50%の患者（C1）
- Guideline 60-95%の患者（B）
- Standard 95%以上の患者（A）

Eddy DM. JAMA. 263: 3077.1990. 改変

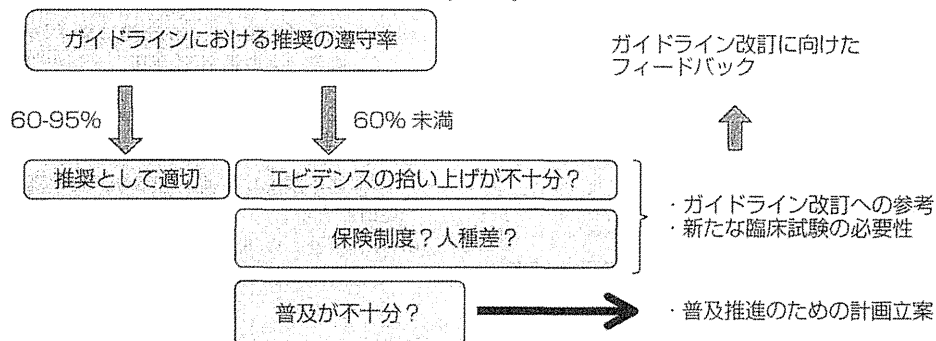


図 6. 診療ガイドラインとQIの関係

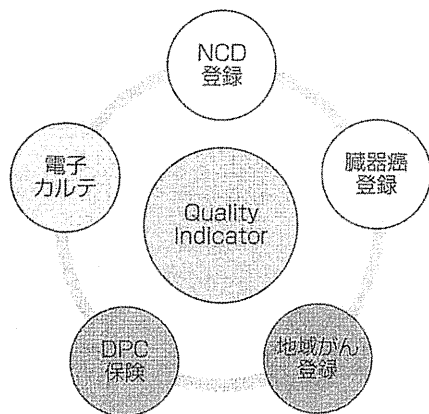


図 7. 癌診療の質を測る指標の統合

抄録を参照したり、PubMed検索とのリンクもできるようなっている。さらに、NCCNの日本語版のフローチャートともリンクしているため、日常診療の流れから、該当CQを検索したり、海外の標準治療との相違を見比べることも可能である。

## 5. Quality Indicatorの設定と定期的な算出に向けて

日本乳癌学会では、診療ガイドラインが医療の質の向上に寄与しているか否かを把握するために、診療ガイドラインの中で、推奨レベルがAないしはBに相当するものが、どの程度遵守されているかを把握し、病院間の相違を公開（病院名は非公開）することで、年余を経てばらつきは是正につながることを期待した活動（QI小委員会）が始まった。第一段階として、CQの中から、QIに相応しいものを抽出し、それが、乳癌登録のデータから自動抽出ができるか否かの検討を行った(図6)。このことは、推奨グレードの見直しや、CQそのものの設定の是非を検討するうえでも役に立つ。

また、乳癌登録として設定した入力項目の改訂にも有用である。さらに、この作業を通じて、日本で行われている様々な登録システムにおける重複入力などの無駄を省き、連携を図ることの必要性を痛感した(図7)。

## さいごに

診療ガイドラインのWeb化により, 閲覧性の向上, 情報検索の効率化が図られた. 今後は, 診療ガイドラインの順守率をもとに, QI値を定期的に算出及び公開し, 医療の質の向上につなげるようにしていきたい.

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 中村清吾; 講演料 (アストラゼネカ, エーザイ, グラクソスミスクライン, 大鵬薬品工業, 中外製薬, ファイザー), 研究費・助成金 (協和発酵キリン, 日本癌治療学会), 寄付金 (アストラゼネカ, エー

## 参考文献

- 1) <https://www.jbcsguideline.jp/>
- 2) 日本乳癌学会編: 科学的根拠に基づく乳癌診療ガイドライン治療編 2011年版. 金原出版, 2011.
- 3) 日本乳癌学会編: 科学的根拠に基づく乳癌診療ガイドライン疫学・診断編 2011年版. 金原出版, 2011.
- 4) 中村清吾: がん診療における医療の質の評価. 昭和医学会雑誌 72: 203-208, 2012.
- 5) 中村清吾: 乳癌の治療戦略: 概論 (ガイドラインのアルゴリズム解説). 乳癌 (第2版) 日本臨床. 70: 489-492, 2012.
- 6) 中村清吾: Web化された乳癌診療ガイドラインの使い方. Cancer Board乳癌 4: 193-196, 2011.

## 術前化学療法（NAC）前 cN0 乳癌に対する NAC 後センチネルリンパ節生検（SNB）の成績

演題番号：OJ-473

桑山 隆志<sup>1,2,4</sup> 山内 英子<sup>2</sup> 矢形 寛<sup>2</sup> 吉田 敦<sup>2</sup> 林 直輝<sup>2</sup>  
鈴木 高祐<sup>3</sup> 中村 清吾<sup>4</sup>

1. 東京医科歯科大学 乳腺外科
2. 聖路加国際病院 乳腺外科
3. 聖路加国際病院 病理診断科
4. 昭和大学 乳腺外科

---

NAC 施行前 cN0 症例において NAC 施行前に SNB にてリンパ節転移を認めなければ腋窩郭清を省略可能とされている。しかしながら NAC 後に SNB において、SNB で転移を認めなければ腋窩郭清が省略可能という evidence は乏しい。今回我々は 2004 年 7 月より 2007 年 5 月の間に当院で手術を施行された NAC 前 cN0 乳癌に対する SNB の成績について報告する。症例は 107 例で平均観察期間は 65 か月であった。センチネルリンパ節の同定率は 99.1%、摘出されたリンパ節は平均 2.0 個であった。同時期に行われた NAC 非施行例と比較して、同定率は同等であった。センチネルリンパ節への転移は 20 例に認められた。センチネルリンパ節に転移を認めなかったが、周囲リンパ節の転移を認めた症例が 2 例であった。転移が認められた全例に腋窩郭清を行っている。観察期間中転移を認めなかった症例で同時遠隔転移を伴わない腋窩リンパ節再発は 1 例（0.9%）のみに認められた。そのほかセンチネルリンパ節に転移を認めた症例 2 例に腋窩リンパ節再発が認められた。NAC 非施行例と同等であり、NAC 施行前 cN0 症例において NAC 後の SNB による腋窩郭清の省略は可能であると考えられる。

## ER(+),HER2(-)、腋窩リンパ節転移陽性乳癌における Ki67 値とリンパ球浸潤の検討

演題番号：OJ-324

沢田 晃暢<sup>1</sup> 内田 諭子<sup>1</sup> 三輪 教子<sup>1</sup> 繁永 礼奈<sup>1</sup> 大山 宗士<sup>1</sup>  
鈴木 研也<sup>1</sup> 榎戸 克年<sup>1</sup> 広田 由子<sup>1</sup> 廣瀬 正典<sup>1</sup> 明石 定子<sup>1</sup>  
中村 清吾<sup>1</sup>

### 1. 昭和大学病院ブレストセンター

---

(背景) LuminalA 乳癌の腋窩リンパ節転移有無で Ki67 値の基準を決定した。さらに Ki67 に代わる代替マーカーを探索すべく、リンパ球浸潤 (tumor infiltrating lymphocyte) に注目した。(方法) リンパ球浸潤を3つに分類することにより、腋窩リンパ節転移症例の Ki67 値と比較検討を行った。1) 2009年6月からの乳癌手術症例 286例を臨床病理学的に検討した。2) 2010年6月からの症例にはリンパ球浸潤(167例)を追加検討した。

(結果) 286例中 ER(+),HER2(-)が213例であった。腋窩リンパ節転移陽性症例が70例で、Ki67 $\geq$ 15%が48例であった。また腋窩転移陰性症例が143例で、Ki67<15%が86例であった。腋窩転移有無の2群間と Ki67 を15%で分けた2群間での有意差は P=0.001であった。次にリンパ球浸潤に関しては、ER(+),HER2(-)の119例中、リンパ球浸潤を (few,moderate)と (marked) の2群に分類し、腋窩リンパ節陽性34例、陰性85例の2群間と比較した。P=0.01, odds 比が2.889とリンパ節転移に独立した影響が認められた。(まとめ) 腋窩リンパ節転移症例を予後不良因子と捉えた場合、LuminalA においてリンパ球浸潤が独立した予後因子と考えられる。

# A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese

Kazuma Kiyotani<sup>1</sup>, Taisei Mushiroda<sup>1</sup>, Tatsuhiko Tsunoda<sup>2</sup>, Takashi Morizono<sup>2</sup>, Naoya Hosono<sup>3</sup>, Michiaki Kubo<sup>3</sup>, Yusuke Tanigawara<sup>4</sup>, Chiyo K. Imamura<sup>4</sup>, David A. Flockhart<sup>5</sup>, Fuminori Aki<sup>6</sup>, Koichi Hirata<sup>7</sup>, Yuichi Takatsuka<sup>8</sup>, Minoru Okazaki<sup>9</sup>, Shozo Ohsumi<sup>10</sup>, Takashi Yamakawa<sup>11</sup>, Mitsunori Sasa<sup>12</sup>, Yusuke Nakamura<sup>1,13,\*</sup> and Hitoshi Zembutsu<sup>13</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Pharmacogenetics, <sup>2</sup>Laboratory for Medical Informatics and <sup>3</sup>Laboratory for Genotyping Development, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama 230-0045, Japan, <sup>4</sup>Department of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan, <sup>5</sup>Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA, <sup>6</sup>Department of Surgery, Itoh Surgery and Breast Clinic, Kochi 780-0085, Japan, <sup>7</sup>1st Department of Surgery, Sapporo Medical University, Sapporo 060-8543, Japan, <sup>8</sup>Department of Breast Surgery, Kansai Rosai Hospital, Hyogo 060-0006, Japan, <sup>9</sup>Department of Surgery, Sapporo Breast Surgical Clinic, Sapporo 060-0006, Japan, <sup>10</sup>Department of Breast Oncology, Shikoku Cancer Center, Ehime 791-0280, Japan, <sup>11</sup>Department of Surgery, Yamakawa Breast Clinic, Kochi 780-8081, Japan, <sup>12</sup>Department of Surgery, Tokushima Breast Care Clinic, Tokushima 770-0052, Japan and <sup>13</sup>Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

Received September 24, 2011; Revised November 26, 2011; Accepted December 12, 2011

Although many association studies of polymorphisms in candidate genes with the clinical outcomes of breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy have been reported, genetic factors determining individual response to tamoxifen are not fully understood. To identify genetic polymorphisms associated with clinical outcomes of patients with tamoxifen treatment, we conducted a genome-wide association study (GWAS). We studied 462 Japanese patients with hormone receptor-positive, invasive breast cancer receiving adjuvant tamoxifen therapy. Of them, 240 patients were analyzed by genome-wide genotyping using the Illumina Human610-Quad BeadChips, and two independent sets of 105 and 117 cases were used for replication studies. In the GWAS, we detected significant associations with recurrence-free survival at 15 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on nine chromosomal loci (1p31, 1q41, 5q33, 7p11, 10q22, 12q13, 13q22, 18q12 and 19p13) that satisfied a genome-wide significant threshold ( $\log\text{-rank } P = 2.87 \times 10^{-9} - 9.41 \times 10^{-8}$ ). Among them, rs10509373 in *C10orf11* gene on 10q22 was significantly associated with recurrence-free survival in the replication study ( $\log\text{-rank } P = 2.02 \times 10^{-4}$ ) and a combined analysis indicated a strong association of this SNP with recurrence-free survival in breast cancer patients treated with tamoxifen ( $\log\text{-rank } P = 1.26 \times 10^{-10}$ ). Hazard ratio per C allele of rs10509373 was 4.51 [95% confidence interval (CI), 2.72–7.51;  $P = 6.29 \times 10^{-9}$ ]. In a combined analysis of rs10509373 genotype with previously identified genetic makers, *CYP2D6* and *ABCC2*, the number of risk alleles of these three genes had cumulative effects on recurrence-free survival among 345 patients receiving tamoxifen monotherapy ( $\log\text{-rank } P = 2.28 \times 10^{-12}$ ).

\*To whom correspondence should be addressed at: Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Tel: +81 354495372; Fax: +81 354495433; Email: yusuke@ims.u-tokyo.ac.jp

© The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.  
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

## In conclusion, we identified a novel locus associated with recurrence-free survival in Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy.

### INTRODUCTION

Tamoxifen has been the gold standard for endocrine treatment of patients with estrogen receptor (ER)-positive breast cancers. However, 30–50% of patients with adjuvant tamoxifen therapy experience relapse and subsequently die of the disease (1,2), indicating individual differences in responsiveness to tamoxifen.

Tamoxifen is metabolized to the highly active metabolites, 4-hydroxytamoxifen and 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifen (endoxifen). It is reported that these metabolites are the active therapeutic moieties, having 100-fold greater affinity to ER and 30–100-fold greater potency in suppressing estrogen-dependent cell proliferation than those of tamoxifen (3–5). Inter-individual differences in the formation and elimination of these active metabolites could be one of the important factors affecting variability in the response to tamoxifen. Most previous reports focused on the genes involved in the pharmacokinetics of tamoxifen and its metabolites seek genetic variations which determine the individual response to tamoxifen. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*), which is the key enzyme responsible for the generation of endoxifen, is thought to be the most promising predictor of plasma concentration of endoxifen and clinical efficacy of tamoxifen in breast cancer patients (6–14). Schroth *et al.* (15) recently reported outstanding results in 1325 breast cancer patients, providing sufficiently powered evidence for an association between *CYP2D6* genotype and clinical outcomes in patients treated with tamoxifen in the adjuvant setting. Besides *CYP2D6*, several genes, such as *CYP2C19*, *CYP3A5*, sulfotransferase 1A1 (*SULT1A1*), UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (*UGT2B15*) and ATP-binding cassette sub-family C member 2 (*ABCC2*), were reported as possible candidates associated with the clinical outcomes of tamoxifen therapy (7,10,14,16); however, associations of these candidate genes have not yet been sufficiently validated. Therefore, individual differences in responsiveness to tamoxifen still remain, even if the effects of genetic polymorphisms of *CYP2D6* were considered, suggesting the existence of other genetic factor(s).

In this study, to identify responsible loci for the clinical outcomes of tamoxifen therapy, we performed a genome-wide association study (GWAS) by genotyping over 610 000 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and identified the novel locus containing chromosome 10 open-reading frame 11 (*C10orf11*) gene associated with recurrence-free survival in the breast cancer patients treated with tamoxifen.

### RESULTS

#### Patient characteristics

We recruited 462 Japanese patients with breast cancer receiving adjuvant tamoxifen therapy. Table 1 summarizes the characteristics of all of these patients who were pathologically

diagnosed to have a hormone receptor-positive, invasive breast cancer. Their median age at the time of surgery was 51 years old (range, 27–84 years), the median follow-up period was 6.8 years (range, 0.6–23.5 years) and the median tamoxifen treatment period was 4.8 years (range, 0.6–6.3 years). Among the characteristics listed in Table 1, tumor size and nodal status showed significant associations with the recurrence-free survival [ $P = 0.000215$ ; hazard ratio (HR), 1.71; 95% confidence interval (CI), 1.29–2.27; and  $P = 0.0138$ ; HR, 1.83; 95% CI, 1.14–3.09, respectively] in the Cox proportional hazards analysis, whereas the other factors were not associated with recurrence-free survival (Supplementary Material, Table S1).

#### Genome-wide association and replication studies

We conducted a GWAS of recurrence-free survival of 240 Japanese patients with breast cancer who received tamoxifen monotherapy using Illumina Human610-Quad BeadChips. After the standard quality control, association analysis was performed for 470 796 SNPs by the trend log-rank test. We generated a quantile–quantile plot (Supplementary Material, Fig. S1) and obtained the genomic control inflation factor ( $\lambda_{GC}$ ) of 1.023, indicating a low possibility of false-positive associations resulting from population stratification. We detected significant associations with recurrence-free survival at 15 SNPs in nine genetic regions (1p31, 1q41, 5q33, 7p11, 10q22, 12q13, 13q22, 18q12 and 19p13) that satisfied a genome-wide significant threshold of  $P < 1.06 \times 10^{-7}$  (Fig. 1). To further validate the results of GWAS, we carried out a replication study using an independent 105 breast cancer patients. We genotyped 9 of the 15 SNPs because 6 of them were highly linked to another SNP ( $r^2 > 0.80$ ; Supplementary Material, Table S2). We found that rs10509373 in *C10orf11* gene on 10q22 was significantly associated with recurrence-free survival in the replication stage (log-rank  $P = 4.18 \times 10^{-4}$ ; Table 2 and Fig. 2). The associations of the other SNPs were not replicated (Supplementary Material, Table S2). Furthermore, a combined result of the GWAS and first replication study strongly suggested an association of this locus with recurrence-free survival in breast cancer patients treated with tamoxifen (log-rank  $P = 2.19 \times 10^{-10}$ ). We also genotyped rs10509373 using additional 117 samples, which include the patients receiving tamoxifen after chemotherapy and observed a significant association (log-rank  $P = 1.86 \times 10^{-2}$ ). A combined  $P$ -value of all samples was  $2.19 \times 10^{-10}$ , suggesting the significant association with recurrence-free survival in breast cancer patients treated with tamoxifen (Fig. 2 and Supplementary Material, Table S3). In Cox proportional hazards analysis, *C10orf11* genotype (rs10509373) was an independent indicator of the recurrence-free survival after adjustment for tumor size and nodal status ( $P = 6.28 \times 10^{-8}$ ; Table 2). The adjusted HRs of rs10509373

**Table 1.** Characteristics of patients

Characteristic	No. of patients (%) GWAS	First replication	Second replication	Total
No.	240	105	117	462
Age at surgery (years)				
Median	51	50	48	51
Range	31–83	35–84	27–71	27–84
Follow-up (years)				
Median	7.2	5.2	6.2	6.8
Range	1.1–23.5	0.6–19.3	1.0–15.5	0.6–23.5
Tamoxifen treatment (years)				
Median	4.9	4.0	4.7	4.8
Range	1.0–6.1	0.6–6.0	0.7–6.3	0.6–6.3
Menopausal status				
Pre-menopause	101 (42.1)	40 (38.1)	75 (64.1)	216 (46.8)
Post-menopause	131 (54.6)	40 (38.1)	35 (29.9)	206 (44.6)
Unknown	8 (3.3)	25 (23.8)	7 (6.0)	40 (8.7)
Tumor size (cm)				
≤2	138 (57.5)	57 (54.3)	48 (41.0)	243 (52.6)
2.1–5	92 (38.3)	34 (32.4)	56 (47.9)	182 (39.4)
>5	1 (0.4)	2 (1.9)	12 (10.3)	15 (3.2)
Unknown	9 (3.8)	12 (11.4)	1 (0.9)	22 (4.8)
Nodal status				
Negative	193 (80.4)	88 (83.8)	74 (63.2)	355 (76.8)
Positive	44 (18.3)	13 (12.4)	41 (35.0)	98 (21.2)
Unknown	3 (1.3)	4 (3.8)	2 (1.7)	9 (1.9)
ER status				
Positive	173 (72.1)	87 (82.9)	98 (83.8)	358 (77.5)
Negative	24 (10.0)	2 (1.9)	12 (10.3)	38 (8.2)
Unknown	43 (17.9)	16 (15.2)	7 (6.0)	66 (14.3)
PR status				
Positive	167 (69.6)	77 (73.3)	87 (74.4)	331 (71.6)
Negative	28 (11.7)	11 (10.5)	22 (18.8)	61 (13.2)
Unknown	45 (18.8)	17 (16.2)	8 (6.8)	70 (15.2)
Her-2				
Positive <sup>a</sup>	3 (1.3)	5 (4.8)	6 (5.1)	14 (3.0)
Negative	82 (34.2)	28 (26.7)	60 (51.3)	170 (36.8)
Unknown	155 (64.6)	72 (68.6)	51 (43.6)	278 (60.2)
Treatment				
Tamoxifen alone	240 (100.0)	105 (100.0)	0 (0.0)	345 (76.7)
Tamoxifen + AC or EC	0 (0.0)	0 (0.0)	41 (35.0)	41 (8.9)
Tamoxifen + CMF	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (27.4)	32 (6.9)
Tamoxifen + other chemotherapies	0 (0.0)	0 (0.0)	44 (37.6)	44 (9.5)
Events				
No event	210 (87.5)	89 (84.8)	98 (83.4)	397 (85.9)
Locoregional events	9 (3.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (1.9)
Distant metastasis events	12 (5.0)	15 (14.3)	17 (14.6)	44 (9.5)
Contralateral breast events	9 (3.8)	1 (1.0)	2 (1.7)	12 (2.6)

AC, adriamycin + cyclophosphamide; EC, epirubicin + cyclophosphamide; CMF, cyclophosphamide + methotrexate + 5-fluorouracil.

<sup>a</sup>Score of 3+ in immunohistochemistry.

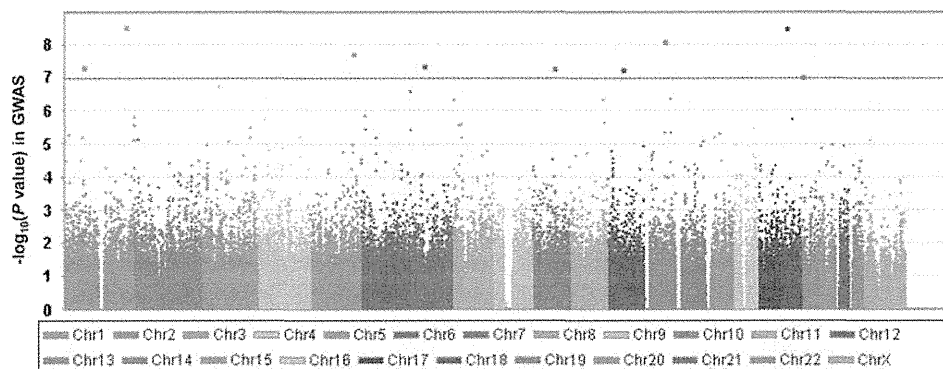
C allele was 4.51 (95% CI, 2.72–7.51), suggesting that C allele was a risk allele for breast cancer recurrence.

To further identify SNPs associated with recurrence-free survival in patients receiving tamoxifen therapy, we genotyped 130 tag SNPs for fine mapping on chromosome 10q22 (Chr. 10: 77.35–78.70 Mb) where the most significant association with the recurrence-free survival was observed (Fig. 3 and Supplementary Material, Table S4). Although no SNPs showed a stronger association than the landmark SNP, rs10509373, fine mapping of this region indicated that a 172-kb linkage disequilibrium (LD) block (77.67–77.84 Mb) including *C10orf11* was likely to contain the genetic variant(s)

associated with recurrence-free survival in patients receiving tamoxifen therapy.

#### Combination analysis with previously identified gene loci

As we previously identified significant associations of *CYP2D6* and *ABCC2* rs3740065 genotypes with recurrence-free survival in patients treated with tamoxifen among the patients receiving tamoxifen monotherapy (Supplementary Material, Table S5) (7), we investigated a combined effect of *C10orf11* genotype in addition to *CYP2D6* and *ABCC2* genotypes on the recurrence-free survival by classifying the 345



**Figure 1.** Results of the GWAS. Manhattan plot showing the  $-\log_{10}$ -transformed  $P$ -value of SNPs in the GWAS for 240 Japanese patients with breast cancer receiving tamoxifen monotherapy. The red line indicates the genome-wide significance level ( $P = 1.06 \times 10^{-7}$ ).

**Table 2.** Association analysis of rs10509373 in *C10orf11* with recurrence-free survival in breast cancer patients receiving tamoxifen therapy

SNP	Chr	Chr location <sup>a</sup>	Allele (risk)	Study set	Risk allele frequency	Event No	Log-rank $P$	Univariate		Multivariate <sup>b</sup>	
								HR (95% CI) <sup>c</sup>	$P$ -value	HR (95% CI) <sup>c</sup>	$P$ value
rs10509373	10	77827578	T/C (C)	GWAS	0.117	0.021	$5.19 \times 10^{-8}$	7.70 (3.25–18.22)	$3.41 \times 10^{-6}$	9.64 (3.85–24.12)	$1.29 \times 10^{-6}$
				First replication	0.094	0.017	$4.18 \times 10^{-4}$	7.93 (2.06–30.58)	$2.65 \times 10^{-3}$	5.96 (1.49–23.86)	$1.17 \times 10^{-2}$
				GWAS + first replication	0.109	0.020	$2.19 \times 10^{-10}$	7.34 (3.58–14.98)	$4.90 \times 10^{-8}$	9.18 (1.39–22.62)	$6.07 \times 10^{-9}$
				Second replication	0.132	0.036	$1.86 \times 10^{-2}$	2.72 (1.13–6.53)	$2.53 \times 10^{-2}$	2.92 (1.14–7.49)	$2.55 \times 10^{-2}$
				Combined replications	0.114	0.027	$2.02 \times 10^{-4}$	3.21 (1.65–6.22)	$5.67 \times 10^{-4}$	3.20 (1.53–6.69)	$1.97 \times 10^{-3}$
Combined all	0.115	0.024	$1.26 \times 10^{-10}$	4.51 (2.72–7.51)	$6.29 \times 10^{-9}$	4.53 (2.62–7.83)	$6.28 \times 10^{-8}$				

Chr, chromosome; CI, confidence interval; GWAS, genome-wide association study.

<sup>a</sup>Based on NCBI 36 genome assembly.

<sup>b</sup>Adjusted for tumor size and nodal status.

<sup>c</sup>HR per one allele.

patients into 6 groups (0, 1, 2, 3, 4 and 5 risk allele groups) according to the number of risk alleles of the three genes. Kaplan–Meier analysis revealed the number of risk alleles of these three genes to have cumulative effects on recurrence-free survival (log-rank  $P = 2.24 \times 10^{-12}$ ; Fig. 4). In the Cox proportional hazards analysis of 345 patients, the *CYP2D6* and *ABCC2* genotypes showed similar associations with recurrence-free survival to those in previous analysis of 282 patients ( $P = 1.99 \times 10^{-4}$  and  $8.51 \times 10^{-4}$ , respectively; Supplementary Material, Table S6) (7). In the multivariate analysis, rs10509373 in *C10orf11* still showed a significant association even after adjustment of *CYP2D6* and *ABCC2* genotypes in addition to tumor size and nodal status ( $P = 4.74 \times 10^{-7}$ ; Supplementary Material, Table S6), indicating that rs10509373 is an independent risk factor of breast cancer recurrence. Furthermore, combined analysis of *C10orf11*, *CYP2D6* and *ABCC2* revealed that genotypes of the three genes have cumulative effects on recurrence-free survival ( $P = 2.28 \times 10^{-12}$ ), and adjusted HR for risk of recurrence computed for patients carrying three or more risk alleles increased from 6.51-fold (three risk alleles) to 119.51-fold (five risk alleles) compared with those carrying one risk allele (Supplementary Material, Table S6). In the subgroup

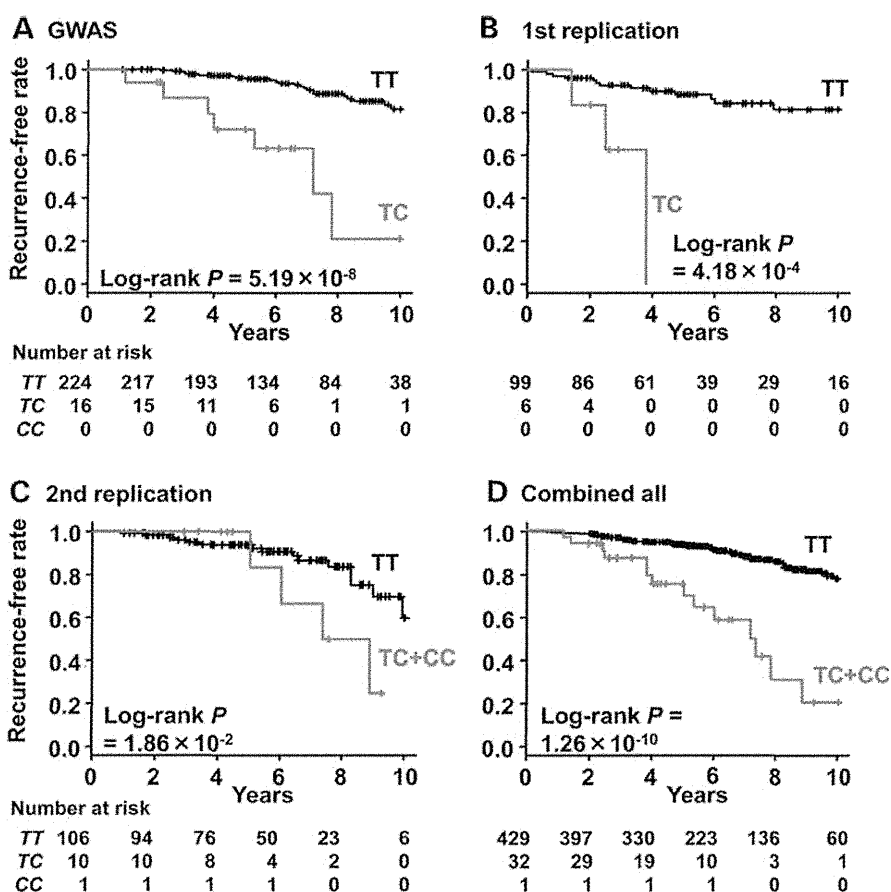
analysis of menopausal status, we identified the significant associations in both subgroups of pre- and postmenopausal patients, although the stronger association was observed in postmenopausal group than in the premenopausal patients (Supplementary Material, Table S7).

## DISCUSSION

This study represents the first GWAS which attempts to identify genetic variants associated with clinical outcomes of tamoxifen therapy and successfully revealed that a marker SNP, rs10509373, on chromosome 10q22 was significantly associated with recurrence-free survival in 462 Japanese patients with breast cancer receiving tamoxifen monotherapy. Furthermore, combined analysis of this SNP with previously identified predictors, *CYP2D6* and *ABCC2*, revealed that the number of risk alleles of the three genes have cumulative effects on recurrence-free survival in tamoxifen-treated breast cancer patients.

The most significantly associated SNP in this study, rs10509373 (combined  $P = 1.26 \times 10^{-10}$ ), is located in a 172-kb LD block which contains the 3' region of *C10orf11*

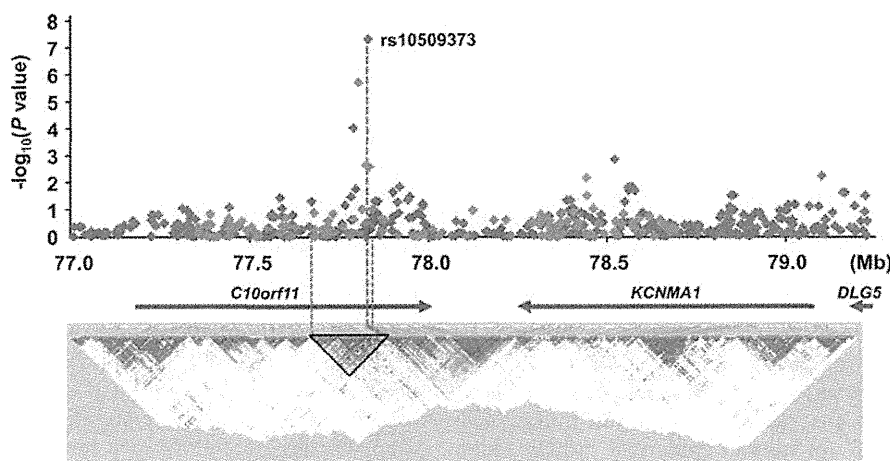




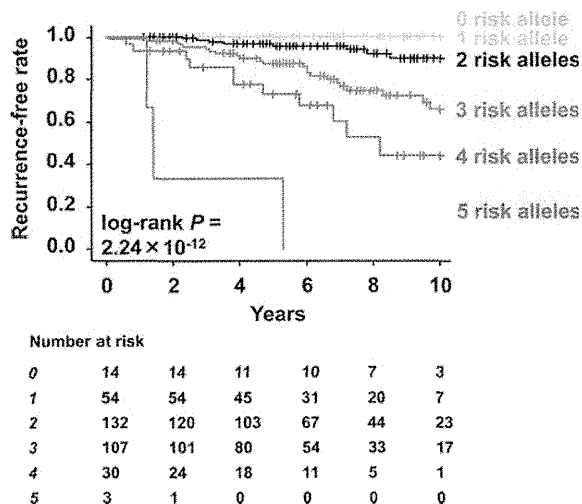
**Figure 2.** Kaplan–Meier estimates of recurrence-free survival for *C10orf11* rs10509373 genotype in 240 patients genotyped in the genome-wide association study (A), in 105 patients genotyped in the first replication study (B), in 117 patients genotyped in the second replication study (C) and in 462 patients in the combination analysis (D).

gene. The fine mapping of this region indicated that a peak association was located in intron 5 of *C10orf11* gene, suggesting that *C10orf11* is likely to be a causative gene to determine the clinical outcomes of breast cancer patients treated with tamoxifen. Because no associated SNPs were found in exon region by re-sequencing of *C10orf11* (Supplementary Material, Table S8), a genetic variant(s) within this LD block might alter *C10orf11* transcriptional activity. *C10orf11* protein, comprising 198 amino acids, is predicted to contain leucine-rich repeat domain and to have the capacity of protein binding in the SMART database (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), although no report has clarified its function. It is reported that *C10orf11* region overlaps with ultraconserved elements (UCEs), perfectly constrained elements between the human, mouse and rat genomes (17–19). Their functional roles have not been completely elucidated yet; however, UCEs are thought to possess some essential functional properties. It is reported that paired box 2, encoded by *PAX2* gene on 10q24, which regulates *ERBB2* transcription and is involved in acquiring tamoxifen resistance (20), and special AT-rich sequence-binding protein-1 encoded by *SATB1* gene on 3p23, which delineates epigenetic modification and is associated with breast tumor growth and metastasis (21), are located in the UCE-rich regions (17). We further

examined the association of pharmacokinetic data with *C10orf11* genotype; however, no significant difference was observed between *C10orf11* genotype and plasma levels of endoxifen and 4-hydroxytamoxifen in 98 breast cancer patients taking 20 mg/day tamoxifen (Supplementary Material, Fig. S2). According to our gene expression database (in-house), the *C10orf11* transcript is expressed in breast cancer cells in clinical tissues. We examined the effects of rs10509373 on the expression levels of *C10orf11* in peripheral blood mononuclear cells and brain using a public database SNPExpress (22). However, no significant associations were observed ( $P = 0.63$  and  $0.93$ , respectively) possibly because of the quite low expression of *C10orf11* in these tissues. The association of *C10orf11* genotype was significant in the second replication samples, which include the patients receiving tamoxifen alone after chemotherapy (Table 2); however, neither *CYP2D6* nor *ABCC2* genotypes were significantly associated with clinical outcomes in the second replication samples as shown in our previous study (Supplementary Material, Table S5) (23). These lines of evidence might suggest that *C10orf11* is involved in acquiring tamoxifen resistance or determining the characteristics of breast cancer, although further functional analysis will be needed to clarify the biological mechanisms which could have effects on the



**Figure 3.** Association mapping and LD map of 10q22. Blue diamond dots represent  $-\log_{10}$ -transformed  $P$ -values of SNPs genotyped by Illumina Human610-Quad BeadChips in the GWAS, and red diamond dots show  $-\log_{10}$ -transformed  $P$ -values of the SNPs of fine mapping. Arrows indicate the position of known genes. The  $D'$ -based LD map ( $MAF \geq 0.10$ ) is drawn using genotype data of 240 patients with breast cancer enrolled in the GWAS.



**Figure 4.** Combined effects of *C10orf11*, *CYP2D6* and *ABCC2* genotypes on clinical outcomes of tamoxifen monotherapy. Kaplan–Meier estimates of recurrence-free survival rate for combined effects of *C10orf11* rs10509373, *CYP2D6* and *ABCC2* rs3740065 genotypes. The 345 patients receiving tamoxifen monotherapy were classified into six groups (0, 1, 2, 3, 4 and 5 risk allele groups) based on the number of risk alleles of these three genes.

clinical outcomes of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy.

Several research groups focused on the genes involved in the pharmacokinetics of tamoxifen or its metabolites have investigated genetic variants of *CYP2C19*, *CYP3A5*, *UGT2B15* and *SULT1A1* as candidate genes associated with clinical outcomes of tamoxifen therapy (7,10,14,16). In our GWAS, no SNP in these candidate genes showed significant association with recurrence-free survival in patients treated with tamoxifen ( $\log\text{-rank } P = 3.14 \times 10^{-2} - 9.90 \times 10^{-1}$ ). According to the previous reports, the effect sizes of the above candidate genes were not so large, indicating that the sample size used in our study might not have enough power to detect associations of the SNPs with the tamoxifen efficacy.

Another group hypothesized that non-genomic steroid signaling and cross-talk with growth factor signaling pathways may contribute to the clinical outcomes of the patients treated with tamoxifen and reported that *TC21* promoter polymorphism was significantly associated with an unfavorable tamoxifen treatment outcome; however, no significant association was observed at SNPs in *TC21* gene in our GWAS ( $\log\text{-rank } P = 1.19 \times 10^{-1} - 9.98 \times 10^{-1}$ ) (24). The  $P$ -values of the SNPs in the *ESR1*, *ESR2* and *PGR* genes, which encode ER $\alpha$ , ER $\beta$  and progesterone receptor (PR), respectively, ranged from  $1.33 \times 10^{-2}$  to  $9.88 \times 10^{-1}$ , indicating no significant association.

In conclusion, our GWAS using 462 Japanese patients with breast cancer identified a new locus, containing the *C10orf11* gene, associated with the clinical outcomes of breast cancer patients treated with tamoxifen. These findings provide new insights into personalized selection of hormonal therapy for the patients with breast cancer. However, large-scale replication study and further functional analysis are required to verify our results and to clarify their biological mechanisms which have effects on the clinical outcomes of patients receiving tamoxifen therapy.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A total of 462 patients with primary breast cancer (including the 282 patients reported previously (6,7)) were recruited at Shikoku\*10 collaborative group (Tokushima Breast Care Clinic, Yamakawa Breast Clinic, Shikoku Cancer Center, Kochi University Hospital, and Itoh Surgery and Breast Clinic), Kansai Rosai Hospital, Sapporo Breast Surgical Clinic and Sapporo Medical University Hospital. Of them, 240 patients who were recruited from September 2007 to September 2008 were used for a GWAS analysis, and the remaining 105 patients who were recruited from October 2008 to January 2010 were analyzed in a first replication study. All patients were Japanese women pathologically diagnosed with

ER-positive and/or PR-positive, invasive breast cancer who received adjuvant tamoxifen monotherapy without any other treatments after surgical treatment between 1986 and 2008. In addition, we analyzed 117 patients who had been treated with tamoxifen monotherapy after receiving chemotherapy as the second replication set (23). Data on primary breast cancer diagnosis or recurrence were confirmed from patients' medical record. Patients without recurrence were censored at the date of the last consultation. Recurrence-free survival time was defined as the time from surgical treatment to diagnosis of the recurrence of a breast cancer (locoregional, distant metastasis and contralateral breast events) or death. Patients received tamoxifen 20 mg/day for 5 years; tamoxifen was stopped at the time a recurrence was identified. ER and PR status were evaluated by enzyme immunoassay or immunohistochemistry. The cut-off for human epidermal growth factor receptor 2 overexpression was defined as 3+ immunohistochemical staining (25). Nodal status was determined according to the International Union against Cancer tumor-node-metastasis classification. This study was approved by the Institutional Review Board in the Institute of Medical Science, The University of Tokyo (Tokyo, Japan), and written informed consent was obtained from all patients.

### Genotyping and quality control

Genomic DNA was extracted from peripheral blood ( $n = 424$ ) or frozen breast tissue ( $n = 38$ ) using Qiagen DNA Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). In the GWAS, 240 patients were genotyped using the Illumina Human610-Quad Bead-Chip (Illumina, San Diego, CA, USA). Quality control of SNPs was achieved by excluding SNPs with low call rate (<99%) and SNPs with Hardy–Weinberg equilibrium  $P$ -value  $< 1.0 \times 10^{-6}$ . SNPs with a minor allele frequency (MAF)  $< 0.01$  were also excluded from further analysis. A total of 470 796 SNPs passed the filters and were further analyzed. We used multiplex polymerase chain reaction-based Invader Assay (Third Wave Technologies, Madison, WI, USA) on ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the replication study and fine mapping (26). For fine mapping, tag SNPs were selected from the HapMap phase II JPT data (<http://www.hapmap.org/>) (27) with the following criteria: a pairwise  $r^2 > 0.80$  and an MAF  $\geq 0.01$  using Haploview software (28).

Genotyping of *CYP2D6* and *ABCC2* rs3740065 was performed using real-time Invader (Third Wave Technologies) and TaqMan assays (Applied Biosystems) as described previously (7,29,30). To evaluate the effects of *CYP2D6* alleles, we defined all of the decreased and null alleles (including \*4, \*5, \*10, \*14, \*21 and \*41, and gene-duplication alleles, \*10–\*10 and \*36–\*36) as allele 'V', and alleles of \*1 and duplicated \*1–\*1 as allele 'wt' as described previously (7).

### Statistical analysis

Recurrence-free survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. Statistical significance of a relationship between clinical outcomes and genetic polymorphism was assessed by the trend log-rank test. The value of  $\lambda_{GC}$  was calculated from the median of the trend log-rank test

statistics (31). Cox proportional hazards analysis was used to identify significant prognostic clinical factors and to test for an independent contribution of genetic factors to recurrence-free survival. To examine potential confounding, age was treated as a continuous variable, tumor size was treated as an ordinal variable, and the other covariates were treated as categorical variables. Genotypes were analyzed by assigning an ordinal score to each genotype (0 for homozygous non-risk alleles, 1 for heterozygous risk alleles and 2 for homozygous risk alleles). Combination effects were investigated by adding up the number of risk alleles of *CYP2D6*, *ABCC2* and *C10orf11* genes. All polymorphisms evaluated in this study were tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium with the use of a  $\chi^2$ -test. Statistical tests provided two-sided  $P$ -values, and a significance level of  $P < 0.05$  was used. We used a significance level of  $P < 1.06 \times 10^{-7}$  (0.05 of 470 796) in the GWAS and  $5.56 \times 10^{-3}$  (0.05 of 9) in the replication study to adjust multiple testing by the strict Bonferroni correction. Statistical analyses were carried out using SPSS (version 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA) and the R statistical environment version 2.9.2 (<http://www.r-project.org/>).

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to all the study participants. We thank Yuka Kikuchi, Aiko Ohno, Shoko Higuchi and Kumi Matsuda for technical assistance. We thank all other members and staff for their contribution to the sample collection and the completion of our study.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

### FUNDING

This work was supported mainly by a Grant-in-Aid for Leading Project of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (to Y.N.). This work was also supported in part by Grant-in-Aids for Young Scientists (B) (22790179) of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (to K.K.), the Kobayashi Institute for Innovative Cancer Chemotherapy (to K.K.), the Japan Research Foundation for Clinical Pharmacology (to K.K.), and the Takeda Science Foundation (to K.K.).

### REFERENCES

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, **365**, 1687–1717.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (1998) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*, **351**, 1451–1467.
3. Borgna, J.L. and Rochefort, H. (1981) Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed *in vivo* and bound to estrogen receptor in target tissues. *J. Biol. Chem.*, **256**, 859–868.

4. Lien, E.A., Solheim, E., Lea, O.A., Lundgren, S., Kvinnsland, S. and Ueland, P.M. (1989) Distribution of 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res.*, **49**, 2175–2183.
5. Johnson, M.D., Zuo, H., Lee, K.H., Trebley, J.P., Rae, J.M., Weatherman, R.V., Desta, Z., Flockhart, D.A. and Skaar, T.C. (2004) Pharmacological characterization of 4-hydroxy-*N*-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.*, **85**, 151–159.
6. Kiyotani, K., Mushiroda, T., Sasa, M., Bando, Y., Sumitomo, I., Hosono, N., Kubo, M., Nakamura, Y. and Zembutsu, H. (2008) Impact of *CYP2D6\*10* on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci.*, **99**, 995–999.
7. Kiyotani, K., Mushiroda, T., Imamura, C.K., Hosono, N., Tsunoda, T., Kubo, M., Tanigawara, Y., Flockhart, D.A., Desta, Z., Skaar, T.C. *et al.* (2010) Significant effect of polymorphisms in *CYP2D6* and *ABCC2* on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, **28**, 1287–1293.
8. Goetz, M.P., Rae, J.M., Suman, V.J., Safgren, S.L., Ames, M.M., Visscher, D.W., Reynolds, C., Couch, F.J., Lingle, W.L., Flockhart, D.A. *et al.* (2005) Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 9312–9318.
9. Goetz, M.P., Knox, S.K., Suman, V.J., Rae, J.M., Safgren, S.L., Ames, M.M., Visscher, D.W., Reynolds, C., Couch, F.J., Lingle, W.L. *et al.* (2007) The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.*, **101**, 113–121.
10. Schroth, W., Antoniadou, L., Fritz, P., Schwab, M., Muerdter, T., Zanger, U.M., Simon, W., Eichelbaum, M. and Brauch, H. (2007) Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient *CYP2D6* and *CYP2C19* genotypes. *J. Clin. Oncol.*, **25**, 5187–5193.
11. Lim, H.S., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.E., Jang, I.J. and Ro, J. (2007) Clinical implications of *CYP2D6* genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **25**, 3837–3845.
12. Xu, Y., Sun, Y., Yao, L., Shi, L., Wu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T. *et al.* (2008) Association between *CYP2D6\*10* genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Ann. Oncol.*, **19**, 1423–1429.
13. Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K.H., Skaar, T., Storniolo, A.M., Li, L., Araba, A. *et al.* (2005) *CYP2D6* genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J. Natl Cancer Inst.*, **97**, 30–39.
14. Gjerde, J., Geisler, J., Lundgren, S., Ekse, D., Varhaug, J.E., Mellgren, G., Steen, V.M. and Lien, E.A. (2010) Associations between tamoxifen, estrogens, and FSH serum levels during steady state tamoxifen treatment of postmenopausal women with breast cancer. *BMC Cancer*, **10**, 313.
15. Schroth, W., Goetz, M.P., Hamann, U., Fasching, P.A., Schmidt, M., Winter, S., Fritz, P., Simon, W., Suman, V.J., Ames, M.M. *et al.* (2009) Association between *CYP2D6* polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *J. Am. Med. Assoc.*, **302**, 1429–1436.
16. Wegman, P., Elingarami, S., Carstensen, J., Stal, O., Nordenskjold, B. and Wingren, S. (2007) Genetic variants of *CYP3A5*, *CYP2D6*, *SULT1A1*, *UGT2B15* and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **9**, R7.
17. Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W.J., Mattick, J.S. and Haussler, D. (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, **304**, 1321–1325.
18. Deloukas, P., Earthrrowl, M.E., Grafham, D.V., Rubenfield, M., French, L., Steward, C.A., Sims, S.K., Jones, M.C., Searle, S., Scott, C. *et al.* (2004) The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature*, **429**, 375–381.
19. Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C. *et al.* (2006) Ancient noncoding elements conserved in the human genome. *Science*, **314**, 1892.
20. Hurtado, A., Holmes, K.A., Geistlinger, T.R., Hutcheson, I.R., Nicholson, R.I., Brown, M., Jiang, J., Howat, W.J., Ali, S. and Carroll, J.S. (2008) Regulation of *ERBB2* by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*, **456**, 663–666.
21. Han, H.J., Russo, J., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T. (2008) *SATB1* reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature*, **452**, 187–193.
22. Heinzen, E.L., Ge, D., Cronin, K.D., Maia, J.M., Shianna, K.V., Gabriel, W.N., Welsh-Bohmer, K.A., Hulet, C.M., Denny, T.N. and Goldstein, D.B. (2008) Tissue-specific genetic control of splicing: implications for the study of complex traits. *PLoS Biol.*, **6**, e1.
23. Kiyotani, K., Mushiroda, T., Hosono, N., Tsunoda, T., Kubo, M., Aki, F., Okazaki, Y., Hirata, K., Takatsuka, Y., Okazaki, M. *et al.* (2010) Lessons for pharmacogenomics studies: association study between *CYP2D6* genotype and tamoxifen response. *Pharmacogenet. Genomics*, **20**, 565–568.
24. Rokavec, M., Schroth, W., Amaral, S.M., Fritz, P., Antoniadou, L., Glavac, D., Simon, W., Schwab, M., Eichelbaum, M. and Brauch, H. (2008) A polymorphism in the *TC21* promoter associates with an unfavorable tamoxifen treatment outcome in breast cancer. *Cancer Res.*, **68**, 9799–9808.
25. Moeder, C.B., Giltman, J.M., Harigopal, M., Molinaro, A., Robinson, A., Gelmon, K., Huntsman, D., Camp, R.L. and Rimm, D.L. (2007) Quantitative justification of the change from 10% to 30% for human epidermal growth factor receptor 2 scoring in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: tumor heterogeneity in breast cancer and its implications for tissue microarray based assessment of outcome. *J. Clin. Oncol.*, **25**, 5418–5425.
26. Ohnishi, Y., Tanaka, T., Ozaki, K., Yamada, R., Suzuki, H. and Nakamura, Y. (2001) A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J. Hum. Genet.*, **46**, 471–477.
27. Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M. *et al.* (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, **449**, 851–861.
28. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, **21**, 263–265.
29. Hosono, N., Kato, M., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Takata, S., Sato, H., Amitani, H., Tsuchiya, Y., Yamazaki, K., Tsunoda, T. *et al.* (2009) *CYP2D6* genotyping for functional-gene dosage analysis by allele copy number detection. *Clin. Chem.*, **55**, 1546–1554.
30. Kiyotani, K., Mushiroda, T., Kubo, M., Zembutsu, H., Sugiyama, Y. and Nakamura, Y. (2008) Association of genetic polymorphisms in *SLCO1B3* and *ABCC2* with docetaxel-induced leukopenia. *Cancer Sci.*, **99**, 967–972.
31. Devlin, B. and Roeder, K. (1999) Genomic control for association studies. *Biometrics*, **55**, 997–1004.