

Table 2

Summary of the GWA and replication study results for the seven genome-wide significant loci

Nyholt et al.

Chr	SNP	Position	RA	OA	GWA												
					QIMRHCS		OX		BBJ		Meta-analysis		Replication		Total		
					RAF _{case}	RAF _{control}	RAF _{case}	RAF _{control}	RAF _{case}	RAF _{control}	P _{all}	P _{stageB}	RAF _{case}	RAF _{control}	P	P _{all}	P _{stageB}
1	rs7521902	22490724	A	C	0.265	0.236	0.259	0.238	0.570	0.514	4.6×10^{-8}	2.3×10^{-9}	0.568	0.521	6.5×10^{-5}	3.2×10^{-11}	7.6×10^{-13}
2	rs13394619*	11727507	G	A	0.538	0.514	0.551	0.521	0.485	0.449	6.1×10^{-8}	7.0×10^{-8}	0.489	0.455	3.5×10^{-2}	6.1×10^{-9}	6.7×10^{-9}
2	rs4141819	67864675	C	T	0.331	0.298	0.343	0.309	0.226	0.203	4.0×10^{-7}	6.5×10^{-8}	0.220	0.203	5.1×10^{-2}	8.5×10^{-8}	4.1×10^{-8}
6	rs7739264	19785588	T	C	0.545	0.512	0.556	0.515	0.772	0.742	1.3×10^{-7}	5.8×10^{-8}	0.778	0.744	6.9×10^{-4}	3.6×10^{-10}	2.1×10^{-10}
7	rs12700667	25901639	A	G	0.769	0.730	0.776	0.744	0.221	0.189	9.3×10^{-10}	3.8×10^{-11}	0.197	0.191	2.6×10^{-1}	3.6×10^{-9}	1.1×10^{-9}
9	rs1537377	22169700	C	T	0.424	0.395	0.436	0.401	0.410	0.379	2.5×10^{-6}	1.0×10^{-8}	0.402	0.359	1.3×10^{-4}	2.4×10^{-9}	5.8×10^{-12}
12	rs10859871	95711876	C	T	0.332	0.299	0.332	0.295	0.373	0.328	5.5×10^{-9}	3.7×10^{-7}	0.377	0.328	1.1×10^{-5}	5.1×10^{-13}	2.6×10^{-11}

Chr = Chromosome, Position = GRCh37 (hg19) bp position, RA = risk allele, OA = other allele, RAF = risk allele frequency

* = GWA meta-analysis and total P values for rs13394619 include results published in Adachi et al (2010), consisting of $P = 6.1 \times 10^{-4}$ (RAF_{case} = 0.517, RAF_{control} = 0.414) and $P = 1.0 \times 10^{-2}$ (RAF_{case} = 0.488, RAF_{control} = 0.429) obtained in their 500K and 6.0 case-control cohorts, respectively. P_{all} includes all available endometriosis cases. P_{stageB} excludes unknown and minimal (rAFS I-II) endometriosis stage cases where detailed stage data was available.

Nat Genet Author manuscript; available in PMC 2012 December 20.

ORIGINAL ARTICLE

A genome-wide association study identifies a genetic variant in the *SIAH2* locus associated with hormonal receptor-positive breast cancer in Japanese

Seham Elgazzar¹, Hitoshi Zembutsu¹, Atsushi Takahashi², Michiaki Kubo³, Fuminori Aki⁴, Koichi Hirata⁵, Yuichi Takatsuka⁶, Minoru Okazaki⁷, Shozo Ohsumi⁸, Takashi Yamakawa⁹, Mitsunori Sasa¹⁰, Toyomasa Katagiri¹¹, Yoshio Miki¹² and Yusuke Nakamura¹

In Japan, breast cancer is the most common cancer among women and the second leading cause of cancer death among women worldwide. To identify genetic variants associated with the disease susceptibility, we performed a genome-wide association study (GWAS) using a total of 1086 Japanese female patients with hormonal receptor-positive (HRP) breast cancer and 1816 female controls. We selected 33 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) with suggestive associations in GWAS (P -value of $<1 \times 10^{-4}$) as well as 4 SNPs that were previously implicated their association with breast cancer for further replication by an independent set of 1653 cases and 2797 controls. We identified significant association of the disease with a SNP rs6788895 (P_{combined} of 9.43×10^{-8} with odds ratio (OR) of 1.22) in the *SIAH2* (intron of seven in absentia homolog 2) gene on chromosome 3q25.1 where the involvement in estrogen-dependent diseases was suggested. In addition, rs3750817 in intron 2 of the *fibroblast growth factor receptor 2* gene, which was reported to be associated with breast cancer susceptibility, was significantly replicated with P_{combined} of 8.47×10^{-8} with OR = 1.22. Our results suggest a novel susceptibility locus on chromosome 3q25.1 for a HRP breast cancer.

Journal of Human Genetics advance online publication, 6 September 2012; doi:10.1038/jhg.2012.108

Keywords: breast cancer in the Japanese population; *FGFR2* gene; GWAS; hormonal receptor-positive breast cancer; *SIAH2* gene; 3q25.1 locus; 10q26 locus

INTRODUCTION

Nearly 70% of breast cancer is known to be hormone dependent, as estrogen and progesterone have key roles both in the development and progression of the disease.^{1,2} The exposures to higher level and/or for longer period of estrogen such as early menarche, late menopause, late age at first pregnancy, nulliparity, postmenopausal obesity and high serum estrogen level in postmenopausal women is considered to be risk factors for breast cancer.^{3–5} Furthermore, progestin, synthetic progesterone, was shown to markedly increase the risk of breast cancer in postmenopausal women when this hormonal therapy was provided for > 10 years.⁶ In Japan, breast cancer is the most common cancer among women and its incidence has been doubled in both pre and postmenopausal women in the last 20 years, mainly as an estrogen receptor positive subgroup.⁷ Although hormone therapy and radiotherapy are effective, cancer cells often become resistant to these

treatments; nearly half of estrogen receptor positive breast cancer patients at an advanced stage suffer from recurrence^{8–10} and only one third of hormonal receptor positive (HRP) patients with metastatic disease respond to radiotherapy.¹¹ Therefore, new therapeutic options for the disease are eagerly awaited.

The aim of this study is to identify the genetic factors susceptible to HRP breast cancer in the Japanese population and should facilitate the development of novel approaches to prevent and/or treat breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Characteristics of study subjects are shown in Table 1. Most of the breast cancer cases and all the controls in this study were registered in the BioBank Japan, which begun in 2003 with the goal of collecting DNA and serum

¹Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Laboratory for Statistical Analysis, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan; ³Laboratory for Genotyping Development, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan; ⁴Department of Surgery, Itoh Surgery and Breast Clinic, Kochi, Japan; ⁵First Department of Surgery, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan; ⁶Department of Breast Surgery, Kansai Rosai Hospital, Hyogo, Japan; ⁷Department of Surgery, Sapporo Breast Surgical Clinic, Sapporo, Japan; ⁸Department of Breast Oncology, Shikoku Cancer Center, Ehime, Japan; ⁹Department of Surgery, Yamakawa Breast Clinic, Kochi, Japan; ¹⁰Department of Surgery, Tokushima Breast Care Clinic, Tokushima, Japan; ¹¹Division of Genome Medicine, Institute for Genome Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan and ¹²Genome Center, The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan
Correspondence: Dr Y Nakamura, 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.
E mail: yusuke@ims.u.tokyo.ac.jp

Received 3 April 2012; revised 5 August 2012; accepted 8 August 2012

Table 1 Characterization of samples used in hormonal receptor-positive breast cancer

	GWAS	Replication
<i>Case</i>		
Number of subjects	1086	1653
Mean age at interview (\pm s.d.)	66.7 (18.5)	60.7 (9.3)
Mean age of menarche	12.4	12.2
Mean age of menopause	48.3	47.9
Cases with DCIS	52	207
Cases with invasion	1034	1446
Body mass index prime	1.08	1.03
Platform	Illumina HumanHap 610K	Invader assay
Source	BioBank Japan Collaborative hospitals ^a	BioBank Japan Collaborative hospitals ^a
<i>Control</i>		
Number of subjects	1816	2797
Mean age at interview (\pm s.d.)	61.3 (12.6)	65.9 (13.2)
Body mass index prime	1.06	1.02
Platform	Illumina HumanHap 610K	Illumina HumanHap 610K
Source	BioBank Japan	BioBank Japan
Diseases in control ^b	MRC healthy volunteer Hepatitis B Keloid Drug eruption Pulmonary tuberculosis Peripheral artery disease Arrhythmias Stroke Myocardial infarction	Rheumatoid arthritis Amyotrophic lateral sclerosis Liver cirrhosis

Abbreviations: DCIS, ductal carcinoma in situ; GWAS, genome-wide association study.

^aTokushima Breast Care Clinic, Yamakawa Breast Clinic, Shikoku Cancer Center, and Itoh Surgery and Breast Clinic, Kansai Rosai Hospital, Sapporo Breast Surgical Clinic and Sapporo Medical University Hospital.

^bThe control groups from BioBank Japan consisted of female individuals without cancer also without any disease related to breast cancer.

samples, along with clinical information from 300 000 individuals who were diagnosed to have any of 47 different diseases from a collaborative network of 66 hospitals in Japan. All cases were diagnosed to have a HRP breast cancer by the following examinations: examination of breast tissue (biopsy or cytology), estrogen receptor and progesterone receptor positivities were evaluated by immunohistochemistry. For the genome wide association study (GWAS) study, 1086 subjects with HRP breast cancer had been selected as cases (Table 1); 846 samples were collected from the BioBank Japan and the remaining 240 samples were collected from collaborative hospitals. Controls for the GWAS consisted of 1816 females including 231 healthy volunteers from the Midosuji Rotary Club, Osaka, Japan. In addition, we also used genome wide screening data of 1585 female samples for 8 diseases registered in the BioBank Japan (Table 1). In the replication stage, 1547 cases were obtained from BioBank Japan and 105 cases from the collaborative hospitals. In all, 2797 female controls were registered in BioBank Japan and were genotyped in GWAS for other diseases (Table 1).

For re sequencing analysis, we selected 2266 cases with HRP breast cancer from the BioBank Japan. We used 497 female controls with 4 diseases (hepatitis B, keloid, drug eruption and pulmonary tuberculosis) from the BioBank Japan as well as 231 healthy volunteers from the Midosuji Rotary

Club, Osaka, Japan. All participating subjects provided written informed consent to participate in the study in accordance with the process approved by Ethical Committee at each of the Institute of Medical Science of the University of Tokyo and the Center for Genomic Medicine of RIKEN.

SNP genotyping

For the first stage, we genotyped 1086 female individuals with HRP breast cancer and 1816 female controls using the Illumina HumanHap 610 Genotyping BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA). We applied our single nucleotide polymorphism (SNP) quality control standard (call rate of ≥ 0.99 in both cases and controls, and Hardy Weinberg equilibrium test of $P < 1.0 \times 10^{-6}$ in controls). A total of 453 627 SNPs on autosomal chromosomes and 10 525 SNPs on X chromosome passed the quality control filters and were further analyzed. All control samples for the replication stage were genotyped using the Illumina HumanHap 610 BeadChip (female samples of three diseases as controls). All cluster plots were checked by visual inspection by trained personnel, and SNPs with ambiguous calls were excluded. For cases in the replication study, we used the multiplex PCR based Invader assay (Third Wave Technologies).¹² In addition, 22 variations resulted from re sequencing analysis were selected and genotyped in 2266 cases and 728 female controls also using the multiplex PCR based Invader assay (Third Wave Technologies, Madison, WI, USA).

Statistical analysis

Associations of SNPs were tested by employing the Cochran Armitage trend test in both the GWA and replication stages. For the combined study, the simple combined method was applied. In the replication analyses, significance level was applied to be P value of $< 1.35 \times 10^{-3}$ (calculated as $0.05/37$) by Bonferroni correction. Odds ratios (ORs) and confidence intervals were calculated using the non susceptible allele as a reference. Heterogeneity between the GWAS and replication sets was examined using the Breslow Day test. The genomic inflation factor (λ_{GC}) was calculated from the median of the Cochran Armitage trend test statistics. The quantile quantile plot of the logarithms of the genome wide P values was generated by the 'snpMatrix' package in R program v2.10.0 (see URLs), and the Manhattan plot was generated using Haploview v4.1 (see URLs). Haplotype analysis was performed by the use of Haploview v4.1 by considering genotyped SNPs located within 500 kb upstream or downstream of the marker SNP. *In silico* prediction of functional consequences of SNP was done by the use of the SNP info web server (see URLs). (Haploview software was used to analyze linkage disequilibrium (LD) values, visualize haplotype.)

Imputation

Imputation was performed by referring to the genotype data of Japanese (JPT) individuals as deposited in the Phase II HapMap database using MACH v1.0 (see URLs). Genotypes of SNPs that are located in the genomic region within 500 kb upstream or downstream of the marker SNP (the SNP that showed the strongest association with HRP breast cancer) were imputed. In the process of imputation, 50 Markov chain iterations were implemented. Imputed SNPs with an imputation quality score of $r^2 < 0.3$ were excluded from the subsequent analysis.

Re sequencing analysis

Initially, we carried out SNP discovery by using DNA samples of 96 cases with HRP breast cancer. We designed 98 sets of primers (Supplementary Table 1) using the genomic sequence information from UCSC Genome Bioinformatics data base (NM 005067) to amplify the 22 353 bps (two exons, one intron, 5' UTR and 3' UTR) of the genomic region corresponding to the *SIAH2* (intron of seven in *absentia* homolog 2) gene. For each of the 96 DNA samples, PCRs were performed by using GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We performed direct sequencing of the PCR products with the 96 capillary 3730 \times 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems) with Big Dye Terminators (Applied Biosystems) according to standard protocols. All amplified fragments were sequenced by two pairs of sequencing primers. Then SNPs were detected by Sequecher software v4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA).

RESULTS

To identify genetic variants susceptible to HRP breast cancer in the Japanese population, we performed a GWAS using 1086 female patients and 1816 female controls with Illumina HumanHap 610k BeadChip (Table 1). After the quality check of SNP genotyping data, a total of 453 627 SNPs were selected for further analysis. Principal component analysis revealed that all the subjects participating in this study were clustered in the Hapmap Asian population (Supplementary Figure 1S). A quantile quantile plot for this GWAS is shown in Supplementary Figure 2S. The genomic inflation factor (λ_{GC}) of the test statistic in this study was 1.053 indicating a very low possibility of false positive associations resulted from the population stratification. Although no SNP achieved genome wide significance level, 46 SNPs in various chromosomes showed suggestive association (P values $< 1 \times 10^{-4}$) as illustrated in Figure 1.

Among these 46 SNPs, we excluded SNPs possessing strong LD ($r^2 > 0.8$) and selected 33 SNPs for replication analysis as well as 4 additional SNPs that were previously reported their association with breast cancer and showed P value of $< 1.0 \times 10^{-2}$ in GWAS analysis, using an independent set of 1653 female patients and 2797 female controls. Among 37 SNPs analyzed in the replication study, an SNP rs6788895 was successfully replicated with the P value of $< 1.35 \times 10^{-3}$ even after the Bonferroni correction (0.05/37) as shown in Table 2 and Supplementary Table 2S. Combined analysis of the results of the GWAS and the replication study suggested strong association of the locus of the *SIAH2* gene on chromosome 3q25.1 (rs6788895, $P_{combined}$ of 9.43×10^{-8} with OR of 1.22, 95% confidence interval 1.13–1.31) without any significant heterogeneity between the two studies ($P_{heterogeneity} = 2.33 \times 10^{-01}$).

The SNP rs6788895 was further examined its association with the subgroups of breast cancer, an invasive papilloductal breast cancer

group and a HER2 negative breast cancer group, and found significant associations with them ($P_{combined} = 3.61 \times 10^{-07}$, 6.78×10^{-06} , OR = 1.23, 1.21, respectively) although they did not reach to the genome wide significant level (Supplementary Table 3S). Imputation analysis of this locus identified nine additional SNPs in strong LD (r^2 of > 0.8) that showed similar levels of association with rs6788895 (Figure 2a). The subsequent logistic regression analysis revealed no significant association of these nine SNPs when we accounted the effect of SNP rs6788895. The haplotype analysis found no haplotype revealing stronger association than the single SNP (Supplementary Table 4S). Although *in silico* prediction of the functional effect of rs6788895 identified no possible biological effect, one SNP rs2018246 showing strong LD with rs6788895 ($r^2 = 0.94$), which was located about 0.7 kb upstream from the transcription initiation site of *SIAH2*, was indicated to be present within the binding site of multiple transcription factors such as STAT1, LEF1, PAX2, which were reported to have some implication to breast cancer.^{13–16} The re sequencing of 22 353 bps corresponding to the *SIAH2* gene identified 10 novel genetic variations in addition to 37 genetic variations reported previously. We further genotyped 22 of the 47 variations after the exclusion of SNPs showing strong LD with the marker SNP (r^2 of > 0.8). As a result, we identified no genetic variant showing significant association in HRP breast cancer (Supplementary Table 5S and Supplementary Table 6S).

Furthermore, we examined the association of 37 previously reported SNPs with the HRP breast cancer^{17–26} using our sample sets (Supplementary Table 7S) and found very moderate association of four genetic variants, rs1292011, rs3803662, rs2981579 and rs3750817, with HRP breast cancer in the GWAS phase ($P_{GWAS} = 5.89 \times 10^{-02}$, 6.95×10^{-03} , 8.68×10^{-04} and 5.03×10^{-04} , respectively). Further analysis of these four SNPs identified significant

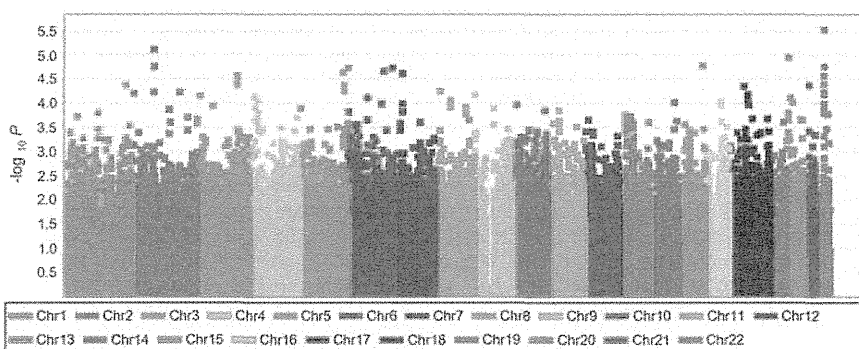


Figure 1 Manhattan plot for the genome wide association study (GWAS) of hormonal receptor positive breast cancer indicating $-\log_{10} P$ of the Cochran Armitage trend test for 453 627 single nucleotide polymorphisms (SNPs) plotted against their respective positions on each chromosome.

Table 2 Association of SNP rs6788895 on chromosome 3q25.1 with hormonal receptor-positive breast cancer

Chr.	Chrlc.	SNP	RA	Stage	Case				Control				P_{assoc}^a	OR	(95% CI)	P_{het}^b
					11	12	22	RAF	11	12	22	RAF				
3	151950498	rs6788895	G	GWAS	106	456	524	0.69	242	832	742	0.64	2.34E 05	1.28	(1.14 1.43)	
				Rep	164	694	786	0.69	337	1265	1195	0.65	5.77E 04	1.18	(1.07 1.29)	2.33E 01
				Combined	270	1150	1310	0.69	579	2097	1937	0.65	9.43E 08	1.22	(1.13 1.31)	

Abbreviations: Chr., chromosome; chrlc., chromosomal location (bp); CI, confidence interval; GWAS, genome-wide association study; OR, odds ratio (calculated based on the risk allele); RA, risk allele; RAF, risk allele frequency; Rep, replication; SNP, single-nucleotide polymorphism; 11, homozygous non-risk genotype; 12, heterozygous genotype; 22, homozygous risk genotype. ^a P_{assoc} , P -value for the GWAS and replication study obtained from the Cochran–Armitage trend test and P -value for the combined study obtained from the simple combined test. ^b P_{het} , P -value for heterogeneity test obtained from the Breslow–Day test.

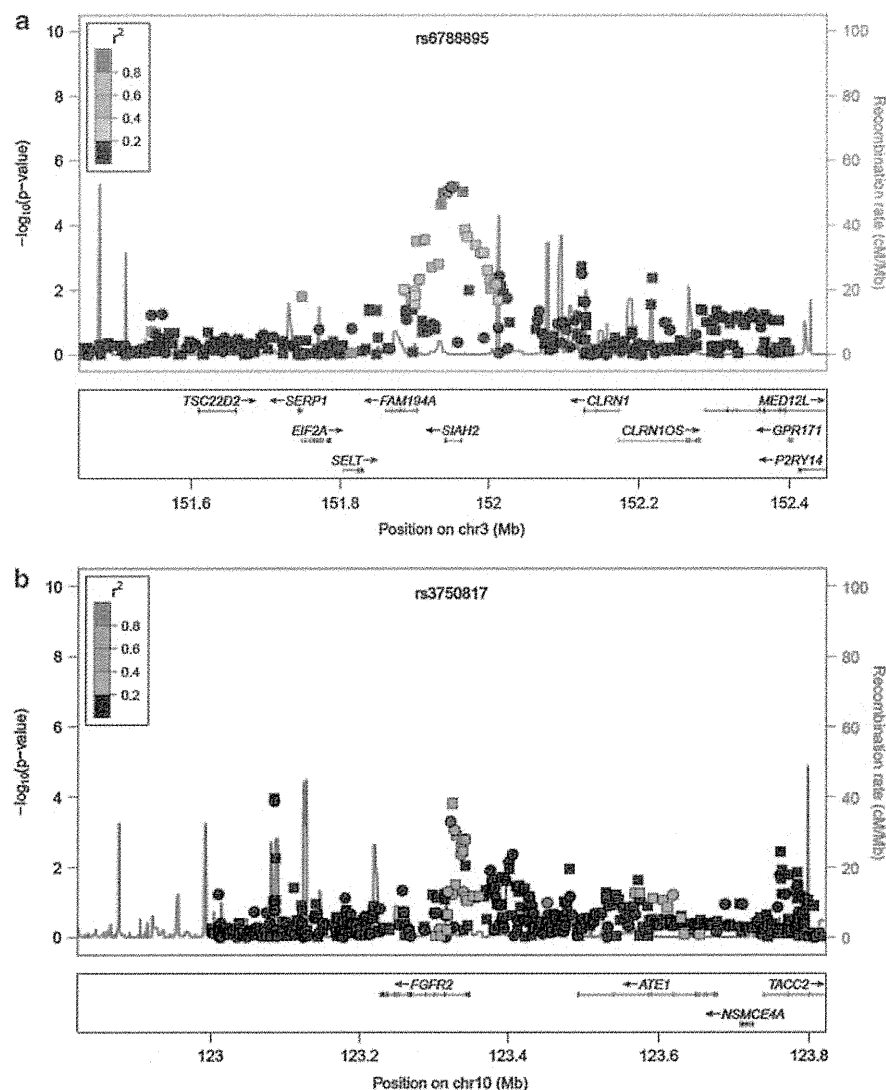


Figure 2 (a) Regional association plots of the locus associated with hormonal receptor positive breast cancer on chromosomes 3q25.1 (*intron of seven in absentia homolog 2 (SIAH2)*). (b) Regional association plots of the locus associated with hormonal receptor positive breast cancer on chromosomes 10q26 (*fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)*). For each plot, $-\log_{10}P$ of the Cochran Armitage trend test of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genome wide association study (GWAS) was plotted against relative chromosomal locations. The square and rounded signs represent imputed and genotyped SNPs, respectively. All SNPs are color coded as red ($r^2=0.8-1.0$), orange ($r^2=0.6-0.8$), green ($r^2=0.4-0.6$), light blue ($r^2=0.4-0.6$), and dark blue ($r^2<0.2$) according to the r^2 pair wise r^2 to the marker SNP. The marker SNP is represented in purple color. SNP positions followed NCBI build 36 coordinates. Estimated recombination rates (cM/Mb) are plotted as a blue line.

replication of two SNPs, rs3750817 ($P_{\text{replication}} = 5.39 \times 10^{-5}$, OR = 1.22) and rs2981579 ($P_{\text{replication}} = 1.21 \times 10^{-3}$, OR = 1.20). Both SNPs are located within intron 2 of the fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) genes. The combined analysis of the GWAS and replication phases of rs3750817 revealed strong association with $P_{\text{combined}} = 8.47 \times 10^{-8}$ (OR = 1.22) and that of rs2981579 was 1.77×10^{-6} (OR = 1.20) (Table 3). Imputation analysis of this locus identified three additional SNPs, rs9420318, rs11199914 and rs10736303 that showed similar levels of association with rs3750817 (Figure 2b).

DISCUSSION

We reported here GWA and replication studies using a total of 2730 female breast cancer cases and 4613 female controls in the Japanese population to identify common genetic variants susceptible to the

HRP breast cancer. The SNP rs6788895 located in the intronic region of the *SIAH2* gene on chromosome 3q25.1 revealed a significant association with the HRP breast cancer (P_{combined} of 9.43×10^{-8} with OR of 1.22, 95% confidence interval of 1.13-1.31). We further examined the association of rs6788895 with the subgroups of breast cancer. The analysis of two histological subgroups, an invasive papilloductal breast cancer group and a HER2 negative breast cancer group, indicated suggestive associations with P_{combined} of 3.61×10^{-7} (OR = 1.24) and with P_{combined} of 6.78×10^{-6} (OR = 1.21), respectively (Supplementary Table 3S). However, rs6788895 showed no association in the GWAS with the hormonal receptor negative group (P_{trend} of 1.03×10^{-1}) or with the HER2 positive breast cancer group (P_{trend} of 1.15×10^{-1}).

For further characterization of the chromosome 3q25.1 locus, we imputed genotypes of SNPs that were not genotyped in the GWAS

Table 3 rs2981579 and rs3750817 in different population

SNPs	Minor/major		OR	P trend	Population
	allele	MAF			
rs2981579 (FGFR2)	A/G	0.42	1.43	3.60×10^{-31}	UK ²⁰
rs2981579	A/G	0.44	1.31	2.60×10^{-09}	American ²⁵
rs2981579	A/G	0.47	1.20	1.77×10^{-06}	Japanese
rs3750817 (FGFR2)	T/C	0.49	1.22	8.47×10^{-08}	Japanese
rs3750817	T/C	0.37	0.78	8.20×10^{-08}	American ²⁵

Abbreviations: FGFR2, fibroblast growth factor receptor 2; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio (calculated based on the non susceptible allele) except rs3750817 in American population OR, calculated based on the susceptible allele); SNP, single-nucleotide polymorphism.

and then examined their associations with HRP breast cancer, but found no SNP showing stronger association than the marker SNP rs6788895 although several SNPs having strong LD with rs6788895 ($r^2 > 0.8$) showed similar levels of associations (Figure 2a). Previous reports implicated possible roles of *SIAH2* in breast carcinogenesis and described that *SIAH2* expression was highly associated with estrogen receptor levels.^{9,27–29} In addition, *SIAH2* protein was indicated to have an essential role in the hypoxic response by regulating the hypoxia inducible factor α .³⁰

Moreover, *SIAH2* was known to induce ubiquitin mediated degradation of many substrates, including proteins involved in transcriptional regulation (POU2AF1, PML and NCOR1), a cell surface receptor (DCC) and an anti apoptotic protein (BAG1). These proteins were reported to have some relations to breast cancer by different mechanisms.^{31–35} Recent genetic studies showed that the chromosome 3q25.1 region might have a critical role in some estrogen dependent diseases such as development of peritoneal leiomyomatosis.^{36,37}

We also examined the association of previously reported loci with the breast cancer^{17–26} using our sample sets and found very moderate association of four genetic variants in our GWAS. Further analysis of these four SNPs identified significant replication of two SNPs, rs3750817 and rs2981579 ($P_{\text{combined}} = 8.47 \times 10^{-8}$ and 1.77×10^{-06} with OR = 1.22 and OR = 1.20, respectively). A T allele for rs3750817 is a protective allele for both Japanese and American populations with comparable ORs (Table 3).

For characterization of the chromosome 10q26 locus, we imputed genotypes of SNPs that were not genotyped in the GWAS, and examined the associations of these SNPs with HRP breast cancer. As a result, three additional SNPs, rs9420318, rs11199914 and rs10736303 were found to have similar levels of association with rs3750817 (Figure 2b). The most strongly associated SNPs are located in intron 2 of the *FGFR* gene. The intron 2 region contains a highly conserved region and possess the transcription factor binding sites possibly related to the estrogen receptor signaling pathway.³⁸ *FGFR2* encodes a receptor tyrosine kinase and has an important role in human mammary epithelial cell transformation,^{39,40} suggesting that *FGFR2* is a good candidate for breast cancer susceptibility. Subsequent functional analyses are thus essential to pinpoint the causal variants and genes associated with HRP breast cancer. In addition, because breast cancer is multi factorial disease, we could not exclude the possibility that some subjects with undiagnosed early stage of cancers or undiagnosed hormonal dependent diseases or subject have diseases related to breast cancer might have been included as controls. Hence, this study might not have sufficient power to detect SNPs having very modest effects on susceptibility to HRP breast cancer. In conclusion, our findings, the verification of the association of the *FGFR2* to the

risk of breast cancer in the Japanese population and the novel identification of significant association of genetic variations in the *SIAH2* gene, should contribute to the better understanding of the susceptibility to HRP breast cancer.

URLS

The Leading Project for Personalized Medicine, <http://biobankjp.org/>; EIGENSTRATsoftwarev2.0, <http://genepath.med.harvard.edu/~reich/Software.htm>;

R project v2.10.0, <http://www.r-project.org/>;

Haploview v4.1, <http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>;

MACH v1.0, <http://www.sph.umich.edu/csg/yli/mach/index.html>;

PLINK statistical software v1.06, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>;

SNP info web server, <http://manticore.niehs.nih.gov/index.html>.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We extend our heartfelt gratitude to all individuals who kindly participated in the current study. We also thank the BioBank Japan for providing DNA samples and clinical information and the members of the Rotary Club of Osaka Midotsuji District 2660 Rotary International in Japan for supporting this study. We extend our appreciation to Dr Siew Kee Low for her useful discussion in the statistical analysis and Dr Osman Wael Mohammed for his insightful advices. Finally, we would like to express our gratefulness to technical staff of the Laboratory for Genotyping Development in RIKEN, Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, the University of Tokyo and technical staff of collaborative hospitals for their assistances.

- Massarweh, S. & Schiff, R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, S15–S24 (2006).
- Xu, W.-H., Shu, X. O., Long, J., Lu, W., Cai, Q., Zheng, Y. et al. Relation of FGFR2 genetic polymorphisms to the association between oral contraceptive use and the risk of breast cancer in Chinese women. *Am. J. Epidemiol.* **173**, 923–931 (2011).
- Hu, Y.-H., Nagata, C., Shimizu, H., Kaneda, N. & Kashiki, Y. Association of body mass index, physical activity, and reproductive histories with breast cancer: a case-control study in Gifu, Japan. *Breast Cancer Res. Treat.* **43**, 65–72 (1997).
- Tung, H. T., Tsukuma, H., Tanaka, H., Kinoshita, N., Koyama, Y., Ajiki, W. et al. Risk factors for breast cancer in Japan, with special attention to anthropometric measurements and reproductive history. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **29**, 137–146 (1999).
- Miyoshi, Y., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y. & Noguchi, S. Association of serum estrone levels with estrogen receptor-positive breast cancer risk in postmenopausal Japanese women. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2229–2233 (2003).
- Colditz, G. A. & Rosner, B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.* **152**, 950–964 (2000).
- Yamashita, H., Iwase, H., Toyama, T., Takahashi, S., Sugiura, H., Yoshimoto, N. et al. Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann. Oncol.* **22**, 1318–1325 (2011).
- Ao, A., Morrison, B. J., Wang, H., López, J. A., Reynolds, B. A. & Lu, J. Response of estrogen receptor-positive breast cancer tumorspheres to antiestrogen treatments. *PLoS ONE* **6**, e18810 (2011).
- Jansen, M., Ruigrok-Ritstier, K., Dorssers, L. C., van Staveren, I. L., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E. et al. Downregulation of *SIAH2*, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **116**, 263–271 (2009).
- Kiyotani, K., Mushirola, T., Tsunoda, T., Morizono, T., Hosono, N., Kubo, M. et al. A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1665–1672 (2012).
- Prat, A. & Baselga, J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 531–542 (2008).
- Ohnishi, Y., Tanaka, T., Ozaki, K., Yamada, R., Suzuki, H. & Nakamura, Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J. Hum. Genet.* **46**, 471–477 (2001).

- 13 Chan, S., Vermi, W., Luo, J., Lucini, L., Rickert, C., Fowler, A. *et al.* STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor alpha-positive luminal mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.* **14**, R16 (2012).
- 14 Holmes, K. A., Song, J. S., Liu, X. S., Brown, M. & Carroll, J. S. Nkx3-1 and LEF-1 function as transcriptional inhibitors of estrogen receptor activity. *Cancer Res.* **68**, 7380–7385 (2008).
- 15 Huang, F.-I., Chen, Y.-L., Chang, C.-L., Yuan, R.-H. & Jeng, Y.-M. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. *Carcinogenesis* **33**, 1142–1148 (2012).
- 16 Beauchemin, D., Lacombe, C. & Van Themsche, C. PAX2 is activated by estradiol in breast cancer cells of the luminal subgroup selectively, to confer a low invasive phenotype. *Mol. Cancer* **10**, 148 (2011).
- 17 Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J. *et al.* Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* **295**, 1379–1388 (2006).
- 18 Sehrawat, B., Sridharan, M., Ghosh, S., Robson, P., Cass, C. E., Mackey, J. R. *et al.* Potential novel candidate polymorphisms identified in genome-wide association study for breast cancer susceptibility. *Hum. Genet.* **130**, 529–537 (2011).
- 19 Higginbotham, K. S. P., Breyer, J. P., Bradley, K. M., Schuyler, P. A., Plummer, Jr W. D., Freudenthal, M. E. *et al.* A multistage association study identifies a breast cancer genetic locus at NCOA7. *Cancer Res.* **71**, 3881–3888 (2011).
- 20 Prentice, R. L., Huang, Y., Hinds, D. A., Peters, U., Pettinger, M., Cox, D. R. *et al.* Variation in the FGFR2 gene and the effects of postmenopausal hormone therapy on invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarker. Prev.* **18**, 3079–3085 (2009).
- 21 Ghoussaini, M., Fletcher, O., Michailidou, K., Turnbull, C., Schmidt, M. K., Dicks, E. *et al.* Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet.* **44**, 312–318 (2012).
- 22 Rebbeck, T. R., DeMichele, A., Tran, T. V., Panossian, S., Bunin, G. R., Troxel, A. B. *et al.* Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis* **30**, 269–274 (2009).
- 23 Yoshimoto, N., Nishiyama, T., Toyama, T., Takahashi, S., Shiraki, N., Sugiura, H. *et al.* Genetic and environmental predictors, endogenous hormones and growth factors, and risk of estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women. *Cancer Sci.* **102**, 2065–2072 (2011).
- 24 Fanale, D., Amodeo, V., Corsini, L. R., Rizzo, S., Bazan, V. & Russo, A. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene* **31**, 2121–2128 (2012).
- 25 Turnbull, C., Ahmed, S., Morrison, J., Pernet, D., Renwick, A., Maranian, M. *et al.* Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 504–507 (2010).
- 26 Hamaguchi, M., Nishio, M., Toyama, T., Sugiura, H., Kondo, N., Fujii, Y. *et al.* Possible difference in frequencies of genetic polymorphisms of estrogen receptor α , estrogen metabolism and P53 genes between estrogen receptor-positive and -negative breast cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **38**, 734–742 (2008).
- 27 Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
- 28 van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536 (2002).
- 29 Roh, M. S., Hong, S. H., Jeong, J. S., Kwon, H. C., Kim, M. C., Cho, S. H. *et al.* Gene expression profiling of breast cancers with emphasis of β -catenin regulation. *J. Korean Med. Sci.* **19**, 275–282 (2004).
- 30 Chan, P., Moller, A., Liu, M. C., Sceneay, J. E., Wong, C. S., Waddell, N. *et al.* The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Res.* **13**, R19 (2011).
- 31 Koren, R., Dekel, Y., Sherman, E., Weissman, Y., Dreznik, Z., Klein, B. *et al.* The expression of DCC protein in female breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **80**, 215–220 (2003).
- 32 Zhen-huan, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Yamamoto, Y., Kawasoe, T., Ibusuki, M. *et al.* Nuclear corepressor 1 expression predicts response to first-line endocrine therapy for breast cancer patients on relapse. *Chin. Med. J.* **122**, 1764–1768 (2009).
- 33 Plevova, P., Bouchal, J., Fiuřásková, M., Foretová, L., Navrátilová, M., Zapletalová, J. *et al.* PML protein expression in hereditary and sporadic breast cancer. *Neoplasma* **54**, 263–268 (2007).
- 34 Yang, X., Hao, Y., Ding, Z., Pater, A. & Tang, S.-C. Differential expression of antiapoptotic gene BAG-1 in human breast normal and cancer cell lines and tissues. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1816–1822 (1999).
- 35 Baysal, B. E. A high-resolution integrated map spanning the SDHD gene at 11q23: a 1.1-Mb BAC contig, a partial transcript map and 15 new repeat polymorphisms in a tumour-suppressor region. *Eur. J. Human Genet.* **9**, 121–129 (2001).
- 36 Ordulu, Z., Dal, C., P., Chong, W. W., Choy, K. W., Lee, C., Muto, M. G. *et al.* Disseminated peritoneal leiomyomatosis after laparoscopic supracervical hysterectomy with characteristic molecular cytogenetic findings of uterine leiomyoma. *Genes Chromosom. Cancer* **49**, 1152–1160 (2010).
- 37 Cha, P.-C., Takahashi, A., Hosono, N., Low, S. K., Kamatani, N., Kubo, M. *et al.* A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nat. Genet.* **43**, 447–450 (2011).
- 38 Carroll, J. S., Meyer, C. A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T. R., Eeckhoutte, J. *et al.* Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat. Genet.* **38**, 1289–1297 (2006).
- 39 Moffa, A. B. & Ethier, S. P. Differential signal transduction of alternatively spliced FGFR2 variants expressed in human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **210**, 720–731 (2007).
- 40 Koziczak, M., Holbro, T. & Hynes, N. E. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* **23**, 3501–3508 (2004).

Supplementary Information accompanies the paper on Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/jhg>)

乳癌の薬物療法

◆ 中村清吾

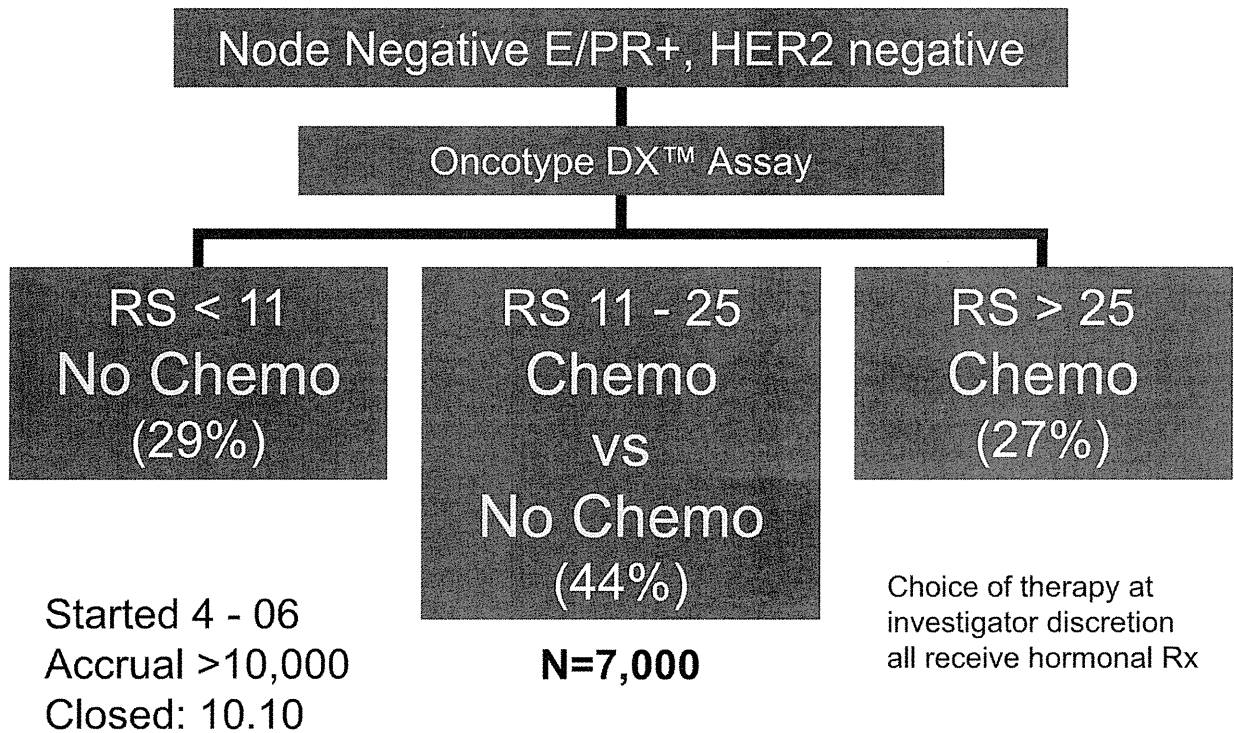
はじめに

乳癌は、その約70%がホルモン感受性を有し、ホルモン療法が薬物療法の大きな柱の一つである。これに加え、癌細胞表面にHer2 (Human epidermal growth factor receptor 2) 蛋白が過剰発現している場合は、分子標的薬であるトラスツズマブやラパチニブが有用である。さらに、近年、網羅的遺伝子発現解析の進歩によって、乳癌の予後は、そのサブタイプにより異なることが明らかとなった。そこで、本稿では、サブタイプ別に見た薬物療法について述べる。

Luminal A¹ Bタイプ

Luminal タイプとは、基本的にはホルモン感受性がある乳癌のことであり、Luminal Aタイプは、術後薬物療法としては、基本的にホルモン療法のみでよい場合を意味する。すなわち、ER (+) Her2 (-) であり、かつ増殖能の低い場合である。増殖能を示すマーカーとしては、Ki67が用いられることが多く、セントガレンコンセンサスでは、14%以下であればホルモン療法高感受性群として分けられている¹⁾。また、多遺伝子発現解析を用いたOncotype DXTMでは、Low RS (Recurrence Score : 18以下) に相

①TAILORx Trial



Trial Assigning Individualized Options for Treatment

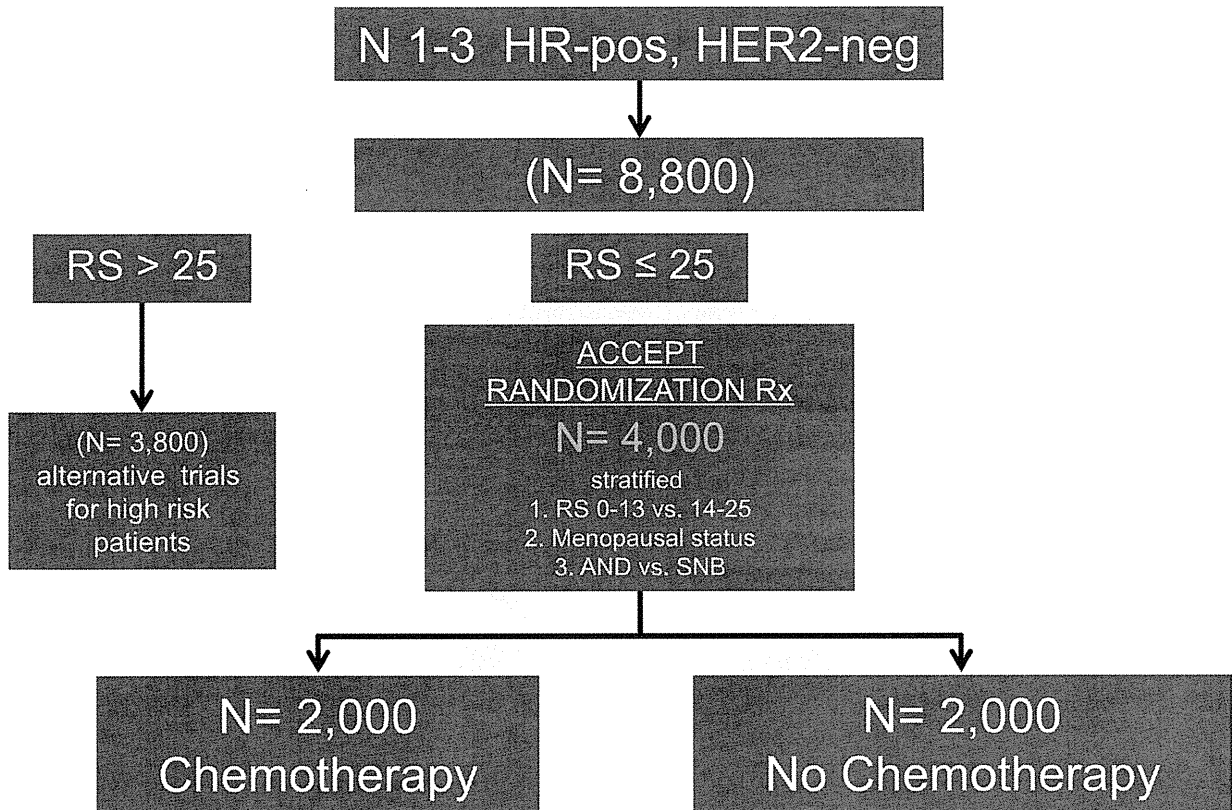
当する。しかし、Ki67の測定法やカットオフ値をどこに設けるかについては様々な見解に分かれている。

一方、米国では、no症例を対象にOncotype DX™を用いた前向き臨床試験：TAILORx試験が行われており、さらに、リンパ節転移陽性の場合であっても化学療法不要群を見いだすための、大規模臨床試験：RxPonder試験が行われている^{2,3)}。(図①②)。

Her2タイプ

Her2陽性においては、ACCT (ドキソルビシン+シクロホスファミド併用療法後にドセタキセル単独投与)の化学療法に加えて、トラスツズマブ1年間が標準治療となっているが、アンスラサイクリンを含まないTCH (ドセタキセルおよびカルボプラチンとトラスツズマブの3者併用)療法も毒性が懸念される高齢者を中心に用いられるようになってきている。ま

②RxPonder Trial

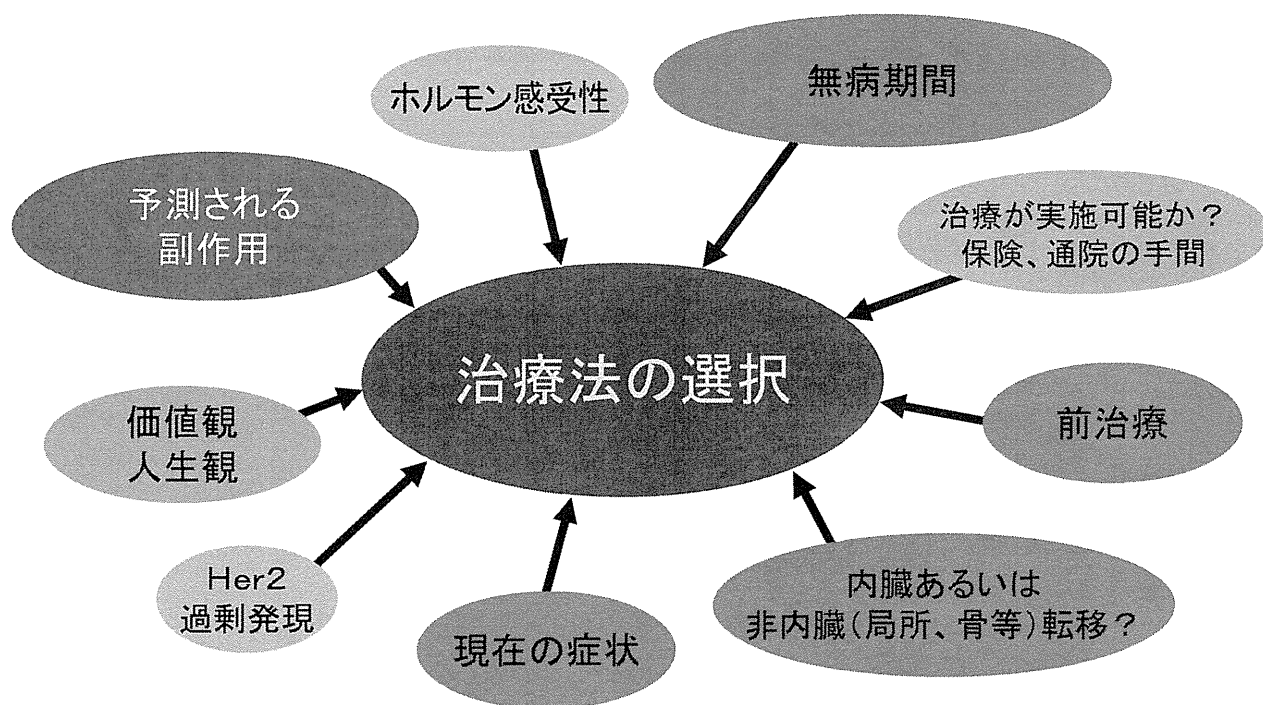


た、海外の術前化学療法における臨床試験では、トラスツズマブとラパチニブを併用した NeoAllto 試験や、トラスツズマブとペルスズマブを併用した NeoSphere 試験において、トラスツズマブ単独群に比べ、倍近い病理学的完全奏効 (pCR) 率が得られ、今後臨床現場に導入されることが期待されている。

Basal タイプ

いわゆるホルモン療法や Her2 をターゲットとした分子標的薬が無効で、化学療法のみが適応となるグループである。この群では、化学療法が著効する場合と、アンストラサイクリンやタキサンが全く効かない場合があることが問題となっていた (Triple negative paradox ともいわれる)。この無効群では、BRCA1 の変異陽性あるいは、BRCA の機能不全を認めることが多いということが分かってきており、その場合は、DNA 直接障害性薬剤であるアルキル化剤

③個別化治療とは？



Beslija, et al. : Ann. Oncol.(2007)より改変

や、ゲムシタビンやカルボプラチンが有効なことが多く、また、ポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤の臨床試験等が行われている。

再発乳癌における新たな展開

ホルモン療法においては、SERD (Selective Estrogen Receptor Downregulator) と呼ばれるフルベストラントが、閉経後再発乳癌の治療において用いられるようになった。抗エストロゲン剤のようにエストロゲン受容体（ER）に結合するだけではなく、その後、ERの分解を促進して、ERの量を大幅に減らすという特徴を有する。アロマターゼ阻害剤（AI）による一次治療に続いて使用した場合、Clinical Benefitの観察期間中央値が16・6カ月と、効果の持続期間が長いことが臨床試験の結果で示されている。抗がん剤では、クロイソカイメンから見いだされた、強い抗がん作用を有するハリコンドリ

ンBの類似化合物であるエリブリンも、昨年より保険適用となった。本剤は、主治医選択治療群に比べ、全生存期間（OS）の中央値が2・7カ月改善したという国際共同試験の結果から、日米欧ではほぼ同時に承認されたという経緯を有し、再発乳癌における選択肢の幅が広がった。

同様に昨年承認となったナブパクリタキセルは、人血清アルブミンとパクリタキセルからなる130nmの均一なナノ粒子パクリタキセル製剤で、ポリオキシエチレンヒマシ油（商品名・クレモホール[®]EL）および無水エタノールの添加物（溶媒）を含有しないため、アナフィラキシーショックやアルコール過敏症などの副作用が少ないという特徴を有する。

この他、血管新生阻害剤のベバシズマブも、パクリタキセルとの併用において、再発乳癌に對して保険適用となった。しかし、他の薬剤との組み合わせも含め、OSで有意差が出ていないということが主な理由で、米国食品医薬品局

（FDA）の承認は取り消しとなっている。今後は、VEGFAの発現量等のバイオマーカーをもとに、効果が期待される症例における臨床試験が計画されている。

骨転移に対する治療薬としては、近年、ビスフォスフォネート製剤が用いられてきた。ビスフォスフォネートは、破骨細胞の形成および成熟の過程は阻害せず、成熟・活性化した破骨細胞に細胞死を誘導し、すなわち、骨吸収が開始してから破骨細胞の活性を阻害する。一方、本年に入り、骨芽細胞の形成を促すRANKL（Receptor activator of NF- κ B ligand）と特異的に結合し骨吸収を抑制する、ヒト型抗RANKLモノクローナル抗体製剤であるデノスマブが保険適用となった。ゾレドロン酸と比較して、非劣性という主要評価項目を満たし、骨関連事象（SRE）無発現期間における優越性という副次的評価項目を達成した。また、皮下注射という特徴を有するため、在宅医療等の現場での

有用性も期待されている。

最後に

以上、乳癌における薬物療法の開発スピードはめざましく、選択肢の幅が広がっているが、いずれも高額なために、個々の癌の特徴と期待される効果を的確に予測できるようなバイオマーカーの開発も待たれるところである。

さらに、図③に示すごとく予測される副作用や個人の人生観・価値観等に照らし合わせたアプローチが望まれる。

(昭和大学医学部 乳腺外科 教授)

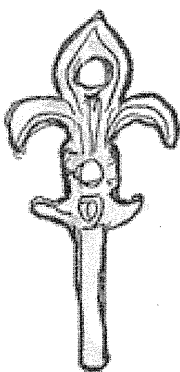
文献

①Gnant, M, et al.: St. Gallen 2011 : Summary of the Consensus Discussion. Breast Care (Basel), 6 (2), 136-141 (2011)

②NCT00310180. Hormone therapy with or without combination chemotherapy in treating women who have undergone surgery for node-negative breast cancer (the TAILORx trial). www.clinicaltrials.gov (Accessed

September 6, 2011)

③NCT 01272037. Tamoxifen citrate, letrozole, anastrozole, or exemestane with or without chemotherapy in treating patients with invasive RxPONDER breast cancer. www.clinicaltrials.gov (Accessed September 6, 2011)



CYP2D6 遺伝子多型による TAM 投与量調節治療

演題番号：OJ-173

笹 三徳¹ 清谷 一馬^{2,5} 筈田 泰誠² 今村 知世³ 谷川原 佑介³
細野 直哉⁴ 前佛 均² 中村 祐輔²

1. とくしまプレストケアクリニック
2. 東京大学医科学研究所
3. 慶應大学医学部 臨床薬剤学
4. 理化学研究所
5. 徳島大学疾患ゲノムセンター

<はじめに> CYP2D6 は TAM 代謝においては重要な酵素である。日本人女性では*10 をはじめ酵素活性減弱・消失を示す多型(V)が高頻度に認められ、同症例では TAM の効果が減弱している可能性がある。

<対象と方法> TAM 服用患者 98 名について、CYP2D6 遺伝子型別に TAM 投与量を調節し (wt/V: 30mg/day, V/V:40mg/day) 、endoxifen、TAM などの血中濃度測定、副作用調査を行った。

<結果> TAM 増量により、血液中の endoxifen は wt/*10、*10/*10 症例でそれぞれ 1.4, 1.7 倍に増加し、wt/wt 症例での 20mg/day 投与とほぼ同じ水準まで改善した。血液中の 4-OH TAM も同じ結果を示した。副作用は、TAM 増量により有意に増加したものはなかった。

<結語> CYP2D6 遺伝子多型別に TAM 投与量を調節することは治療成績向上に寄与する可能性が示唆された。

網羅的遺伝子多型解析による 乳がんホルモン療法の治療効果の予測

Identification of genetic polymorphisms associated with clinical efficacy of
adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients

藤村 一博¹、藤田 泰誠²、今村 知世³、藤野 直樹⁴、角田 謙彦⁵、
久保 光樹⁶、谷川 隆 祐介⁷、植 三雄⁸、橋本 均⁹、中村 祐輔¹⁰

Key words : CYP2D6、ABCC2、タモキシフェン、個別化医療、SNP

はじめに

乳がんは女性において、罹患率が最も高いがんである。タモキシフェンはエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER) 陽性乳がんに対し、再発の予防を目的とした術後補助療法として広く用いられてきた。5年間のタモキシフェン療法により、5年および10年再発率がそれぞれ11.4%および11.8%減少することが報告されている¹⁾。しかしながら、タモキシフェン投与患者での5年および10年再発率はそれぞれ13.9%および22.7%であり²⁾、これらの患者はタモキシフェンを服用してもその効果が十分に得られていないと考えられる。タモキシフェンは通常5年と長期間投与するため、医療経済学的観点からも、投与前に治療効果および副作用の発現を予測し、適切な患者に適切な治療を提供することが不可欠な薬物である。

タモキシフェンはプロドラッグであり、活性本体は代謝物であるエンドキシフェン (4-水酸化-N-脱メチルタモキシフェン) および4-水酸化タモ

キシフェンである。これらの活性代謝物がエストロゲンのERへの結合を阻害することにより、抗エストロゲン作用を示す (図1)。したがって、活性代謝物であるエンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンの生成や排泄に関する薬物代謝酵素または薬物トランスポーターの活性の個人差はタモキシフェンの治療効果を左右すると考えられる。

タモキシフェンからエンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンの生成においては、CYP2D6が最も重要な酵素である³⁾。CYP2D6の機能を消失する遺伝子多型である*4アレルをホモ合体で有する患者ではタモキシフェンの再発予防効果が低いことが報告されている³⁾。我々は67名の日本人乳がん患者による検討で、日本人で頻度の高い遺伝子多型であるCYP2D6*10を有する患者ではタモキシフェン再発予防効果が低くなることを初めて明らかにした⁴⁾。このように、CYP2D6遺伝子多型はタモキシフェンの再発予防効果を決定する重要な因子の一つであると考えられる。しか

¹⁾ Kiyotani Kazuma 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 遺伝情報解析チーム
²⁾ Mushiroda Taisei 同上
³⁾ Imamura Chiyo 慶応義塾大学 医学部 臨床薬理学教室
⁴⁾ Hosono Naoya 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 多型解析技術開発チーム
⁵⁾ Tsunoda Tatsuhiko 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 情報解析研究チーム
⁶⁾ Kubo Michiaki 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 多型解析技術開発チーム
⁷⁾ Tanigawara Yusuke 慶応義塾大学 医学部 臨床薬理学教室
⁸⁾ Sasa Mitsunori とくしまプレストケアクリニック
⁹⁾ Zembutsu Hiyoshi 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター ゲノムシーケンズ解析分野
¹⁰⁾ Nakamura Yusuke 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター ゲノムシーケンズ解析分野、理化学研究所 ゲノム医科学研究センター

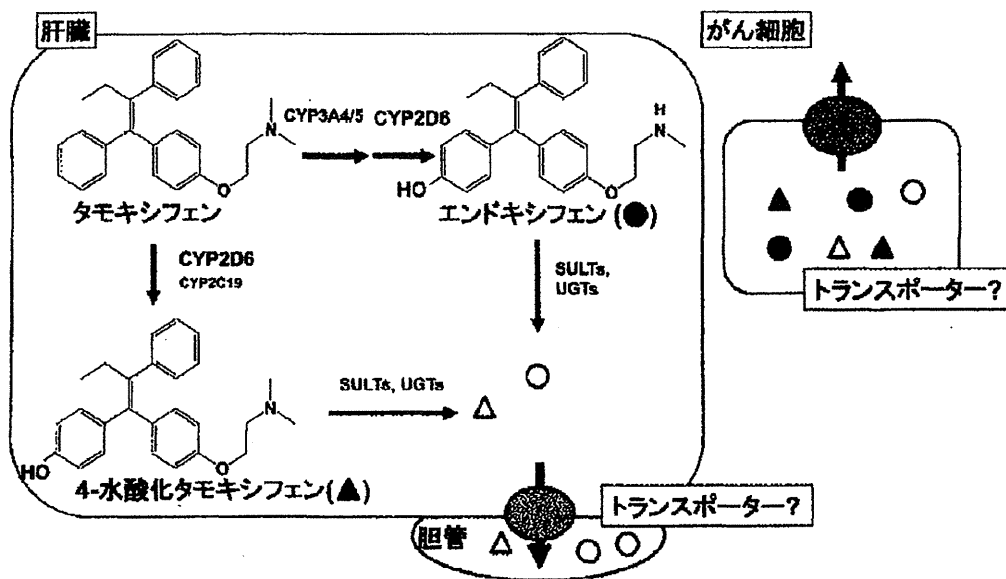


図1 タモキシフェンの代謝・排泄経路

タモキシフェンは肝臓で活性代謝物であるエンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンに変換される。エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンはさらに硫酸抱合またはグルクロン酸抱合を受け、胆汁中に排泄される。この胆汁排泄過程にトランスポーターの関与が推測される。がん細胞では、タモキシフェンおよび活性代謝物の細胞外への排出にトランスポーターが関与することが示唆されている。
SULTs, sulfotransferases ; UGTs, UDP-glucuronosyltransferases.

しながら、いずれの検討においてもCYP2D6遺伝子多型のみではタモキシフェン再発予防効果の個人差をすべて説明することはできないことから、CYP2D6遺伝子多型以外にタモキシフェンの再発予防効果に影響する遺伝子多型が存在することが考えられた。

タモキシフェンから生成したエンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンはさらに硫酸抱合またはグルクロン酸抱合を受け、大部分が胆汁中に排泄される(図1)。これまでに報告はないが、この排泄過程にトランスポーターの関与が推測される。また、トランスポーターの発現はがん細胞において、薬剤耐性の獲得に関与している。したがって、薬物トランスポーターの遺伝子多型がタモキシフェンの再発予防効果に影響するのではないかという仮説をたてた。

本研究では、CYP2D6遺伝子多型とともに薬物トランスポーターの遺伝子多型を網羅的に解析することにより、タモキシフェンの再発予防効果に

影響を及ぼす遺伝子多型を同定することを目的とした。

患者と方法

患者

対象患者は全て日本人女性で、1986年から2007年の間にホルモン受容体陽性の浸潤性乳がんと診断され、根治手術を受けた患者である。対象患者の全てから文書による同意を得た。本研究は理化学研究所・横浜研究所、東京大学医科学研究所および各施設の倫理審査委員会の承認を得た上で行った。

遺伝子多型と再発予防効果との関連解析では、とくしまプレストケアクリニック、やまかわ乳腺クリニック、四国がんセンター、関西ろうさい病院、札幌乳腺外科クリニック、札幌医科大学附属病院で乳がん根治手術後に5年間のタモキシフェン単剤による術後補助療法を受けており、2007年9月から2009年4月に来院した282名を対象とした。タモキシフェンの効果を適切に判断するため、併

用薬治療を受けている患者は対象外とした。

遺伝子多型と血漿中濃度との関連解析では、とくしまプレストケアクリニックに来院しており、20mg/日でタモキシフェンを服用中の98名を対象とした。タモキシフェン服用24時間後に血液を採取した。血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンをHPLC-TOFMSにより測定した。

遺伝子型の判定

*CYP2D6*の遺伝子型 (*1-*1、*4、*5、*6、*10、*10-*10、*14、*18、*21、*36-*36および*41)はTaqMan法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) およびreal-time Invader法 (Third Wave technologies, Madison, WI) により判定した⁵⁾。本研究では、*1および*1-*1アレルをwtアレル、酵素活性を低下または消失させる*4、*5、*10、*10-*10、*14、*21、*36-*36および*41をVアレルとして解析を行った。

ABCB1 (*MDR1*)、*ABCC2* (*MRP2*) および *ABCG2* (*BCRP*) については、haplotype-tagging SNPs (tag SNPs) を用いたスクリーニングを行った。Tag SNPsの選択は、international HapMap databaseの日本人集団 (JPT) の情報を用い、以下の条件で行った： $r^2 \geq 0.8$ 、マイナーアレル頻度 ≥ 0.1 ⁶⁾。*ABCB1*、*ABCC2*および*ABCG2*遺伝子でそれぞれ28 SNPs、11 SNPsおよび12 SNPsを選択し、合計51 SNPsをInvader法により判定した。

統計解析

タモキシフェンの再発予防効果と遺伝子多型との関連はKaplan-Meier法 (trend log-rank検定) およびCox比例ハザード法により検討した。血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンの比較はKruskal-Wallis検定により評価した。有意水準は $P < 0.05$ とした。トランスポーターの遺伝子多型との関連解析では、Bonferroni's correctionにより多重検定を補正し、 $P < 0.00098$ (0.05/51) を有意水準とした。

結 果

遺伝子多型とタモキシフェン再発予防効果との関連解析⁷⁾

表1に282名の患者背景を示す。follow-up期間の中央値は7.1年 (0.8 - 23.5年) であった。表1に示す因子のうち、tumor sizeおよびnodal statusは無再発生存期間と有意な関連を示した ($P=0.037$ および0.049)。

この282名について*CYP2D6*遺伝子型を判定したところ、*CYP2D6*遺伝子型の頻度は過去の知見と概ね一致した⁵⁾。Kaplan-Meier解析では、*CYP2D6*遺伝子多型は無再発生存期間と有意な関連を示した (図2；log-rank $P=0.00020$)。Cox比例ハザード解析では、*CYP2D6*遺伝子型はその他の因子とは独立した再発予測因子であり、wt/V およびV/V遺伝子型を有する患者でのハザード比はwt/wtと比較してそれぞれ4.44 (95%信頼区間、1.31-15.00) および9.52 (95%信頼区間、2.79-32.45) であった (表2)。

次に*ABCB1*、*ABCC2*および*ABCG2*遺伝子についてtag SNPsを選択し、タモキシフェンの再発予防効果との関連を網羅的に検討した。検討した51 tag SNPsのうち、*ABCC2*遺伝子の2 SNPs (rs 3740065およびrs11190303) は、無再発生存期間と有意な関連を示した (表3および図2；log-rank $P=0.00020$ および0.00048)。これらの2 SNPsは強い連鎖不平衡にあった ($D' = 0.97$ 、 $r^2 = 0.79$)。rs3740065 G/G患者と比較したとき、rs3740065 A/GおよびA/A患者でのハザード比は3.52 (95%信頼区間、0.46-26.79) および10.64 (95%信頼区間、1.44-78.88； $P=0.00017$) であった (表2)。*ABCB1*および*ABCG2*遺伝子のtag SNPsはいずれも有意な関連を示さなかった (log-rank $P > 0.083$ ；data not shown)。

さらに*ABCC2*と*CYP2D6*遺伝子型との組み合わせの検討を行ったところ、二つの遺伝子のリスクアレルの数の合計が増加するのに伴い、無再発生存期間が有意に短くなった (図2；log-rank $P=$

表1 患者背景

Characteristic	Total (N = 282) Number of patients (%)
Age at surgery, years	
Median	51
Range	31 to 83
Menopausal status	
Premenopause	123 (43.6)
Postmenopause	149 (52.8)
Unknown	10 (3.6)
Tumor size, cm	
≤2	159 (56.4)
2.1-5	106 (37.6)
>5	2 (0.7)
Unknown	15 (5.3)
Nodal status	
Negative	230 (81.6)
Positive	48 (17.0)
Unknown	4 (1.4)
ER status	
Positive	208 (73.8)
Negative	25 (8.9)
Unknown	49 (17.3)
PR status	
Positive	195 (69.1)
Negative	36 (12.8)
Unknown	51 (18.1)
Her-2	
Positive*	5 (1.8)
Negative	97 (34.4)
Unknown	180 (63.8)
Events	
No event	241 (85.5)
Locoregional events	9 (3.2)
Distant metastasis events	22 (7.8)
Contralateral breast events	10 (3.5)

ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor;
Her-2, human epidermal growth factor receptor 2.

* ImmunohistochemistryでScore 3+ を Positive とした。

表2 CYP2D6およびABCC2遺伝子多型と再発予防効果との関連 (Cox比例ハザード解析)

Variables	Number of patients	Number of recurrences	Hazard ratio* (95% CI)	P value
CYP2D6				0.000036
wt/wt	84	3	1.00 (reference)	
wt/V	135	20	4.44 (1.31-15.00)	
V/V	63	18	9.52 (2.79-32.45)	
ABCC2 rs3740065				0.00017
GG	39	1	1.00 (reference)	
AG	131	14	3.52 (0.46-26.79)	
AA	112	26	10.64 (1.44-78.88)	
CYP2D6 + ABCC2 [†]				0.00000055
0	13	0	1.00 (reference)	
1	52	1		
2	109	8		
3	86	23		4.93 (0.61-39.63)
4	22	9		19.98 (2.69-148.65)
			45.25 (5.58-366.81)	

*Tumor sizeおよびnodal statusで調整した。

[†]CYP2D6およびABCC2のリスクアレルの合計本数。
CI, confidence interval.

表3 ABCC2遺伝子のtag SNPsとタモキシフェン再発予防効果との関連

SNP ID	Chromosomal location*	Position in gene	Allele†		Event			No event			Minor allele frequency		Hardy-Weinberg equilibrium P	Log-rank P
			1	2	11	12	22	11	12	22	Event	No event		
rs12286782	101523996	5' upstream region	G	A	24	15	2	174	61	6	0.23	0.15	0.83	0.082
rs2804398	101548624	Intron 7	T	A	30	8	3	175	58	8	0.17	0.15	0.062	0.79
rs2756109	101548736	Intron 7	G	T	10	22	9	110	102	28	0.49	0.33	0.58	0.0031
rs2273697	101553805	Exon 10 (Ile417Val)	G	A	32	7	1	196	43	2	0.11	0.10	0.89	0.66
rs11190291	101558000	Intron 11	C	T	32	7	1	196	43	2	0.11	0.10	0.89	0.66
rs2002042	101577921	Intron 19	C	T	19	18	4	114	101	26	0.32	0.32	0.66	0.83
rs3740065	101595683	Intron 29	A	G	26	14	1	86	117	38	0.20	0.40	0.84	0.00020‡
rs12762549	101610761	3' downstream region	G	C	12	20	8	100	110	30	0.45	0.36	0.98	0.074
rs2862691	101612513	3' downstream region	C	T	17	19	5	138	86	17	0.35	0.25	0.48	0.042
rs11598781	101623010	3' downstream region	C	T	17	19	5	138	90	15	0.35	0.25	0.92	0.036
rs11190303	101625199	3' downstream region	C	T	27	13	0	103	103	34	0.16	0.36	0.31	0.00048‡

*NCBI 36 genome assemblyに基づいた10番染色体での位置を示す。

†イベントなしの患者でのメジャーアレルをアレル1と定義した。

‡有意差あり:Bonferroni's correctionにより多重検定を補正し、 $P < 0.00098$ (0.05/51) を有意水準とした。

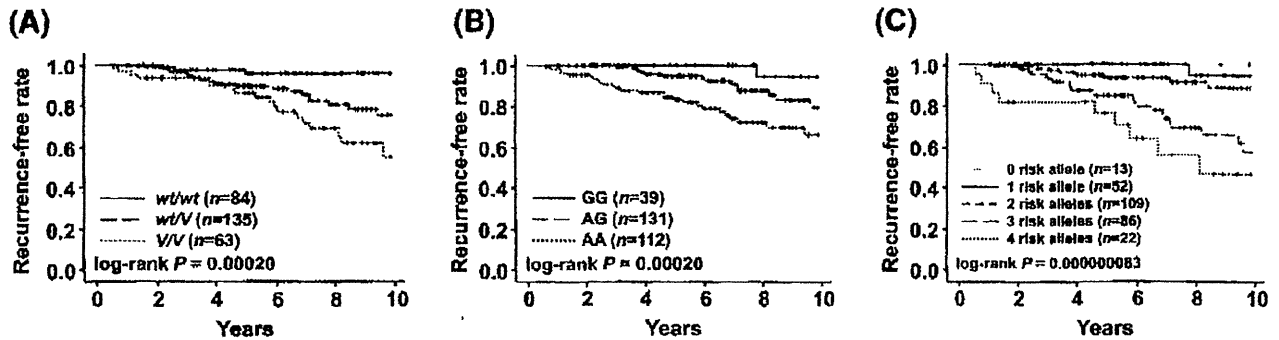


図2 タモキシフェンの再発予防効果と遺伝子多型の関連

タモキシフェン単剤による補助療法を受けている282名の乳がん患者における無再発生存率とCYP2D6遺伝子型 (A)、ABCC2 rs3740065遺伝子型 (B) およびCYP2D6+ABCC2 (C) との関連をKaplan-Meier法で解析した。trend log-rank検定で有意差を検定した。

CYP2D6遺伝子型: wt、*1、*1-1; V、*4、*5、*10、*10-10、*14、*21、*36-36、*41。

0.000000083)。リスクアレルの数が2、3および4の患者では、1以下の患者と比較して、ハザード比は4.93 (95%信頼区間、0.61-39.63)、19.98 (95%信頼区間、2.69-148.65) および45.25 (95%信頼区間、5.58-366.81) であった (表2)。

遺伝子多型とタモキシフェン代謝物の血漿中濃度との関連解析⁷⁾

CYP2D6およびABCC2遺伝子型と血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度との関連を検討した (図3)。

血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度は各CYP2D6遺伝子型群間で有意に差があった (Kruskal-Wallis $P=0.0000043$ および 0.00052)。CYP2D6 V/Vおよびwt/V患者での血漿

中エンドキシフェン濃度の中央値はそれぞれ15.5 および27.2ng/mLであり、wt/wt患者 (35.4ng/mL) のそれぞれ43.8%および76.8%であった。4-水酸化タモキシフェンについても同様の結果であった。一方、ABCC2 rs3740065遺伝子型では、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度いずれとも有意な関連は認められなかった (Kruskal-Wallis $P=0.68$ および 0.26)。また、ABCC2 rs3740065遺伝子型は血漿中タモキシフェンおよびN-脱メチルタモキシフェン濃度とも関連を示さなかった (data not shown)。

考 察

本検討では、乳がん術後補助療法として用いられるタモキシフェンの再発予防効果に関連する遺

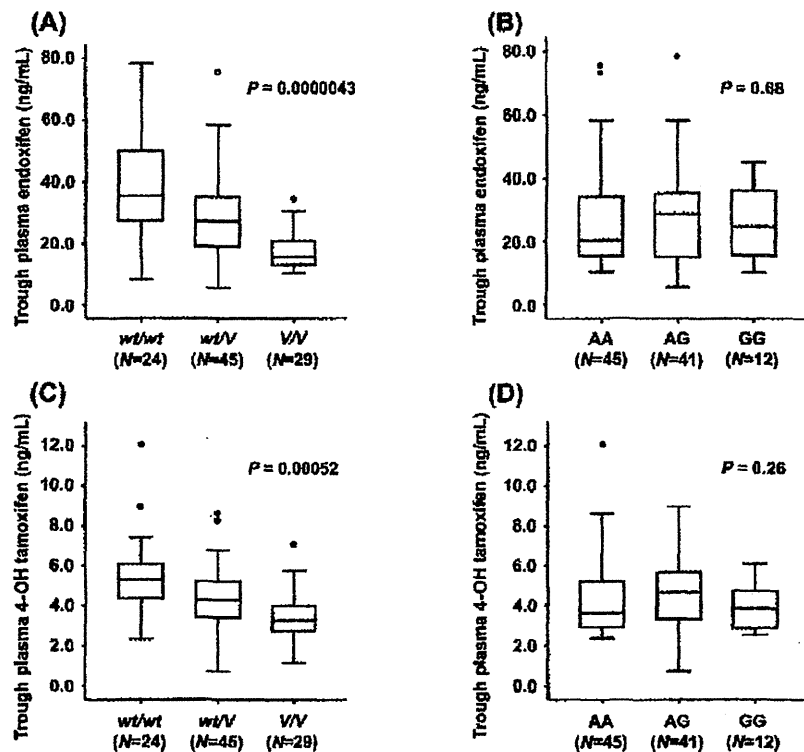


図3 血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度と遺伝子多型の関連
 タモキシフェン (20mg/日) を服用中の98名の乳がん患者の血漿中エンドキシフェン
 および4-水酸化タモキシフェン濃度とCYP2D6遺伝子型 (A, C) およびABCC2
 rs3740065遺伝子型 (B, D) との関連を検討した。タモキシフェン服用24時間後に血
 液を採取し、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンをHPLC-
 TOFMSにより測定した。Kruskal-Wallis検定で有意差を検定した。
 CYP2D6遺伝子型: wt, *1, *1-1; V, *4, *5, *10, *10-10, *14, *21, *36-36, *41。

伝子多型について検討した。タモキシフェン単剤による術後補助療法を受けている282名の乳がん患者による検討で、CYP2D6遺伝子多型がタモキシフェンの治療効果に関連することを明らかにした。さらに、いくつかの薬物トランスポーターの遺伝子多型を網羅的に解析することにより、ABCC2遺伝子のrs3740065がタモキシフェンの再発予防効果と有意に関連することを明らかにした。

CYP2D6遺伝子多型については、これまでにいくつかのグループでタモキシフェンの治療効果との有意な関連が報告されてきた^{3,8,9)}。2009年のSchroth *et al.*の報告では、1325名の欧米人の乳がん患者による解析を行い、CYP2D6の酵素活性を低下または消失させる遺伝子多型を有する患者で

は無再発期間、無再発生存期間、無病生存期間が有意に短いことを明らかにしている⁹⁾。本検討はこれに次いで多くの検体を用いた検討であり、CYP2D6遺伝子多型がタモキシフェンの再発予防効果に影響することを強くサポートしている。しかしながら、相反する結果も報告されている^{10,11)}。これに関しては、併用治療の影響、判定したCYP2D6遺伝子多型の種類が重要な要因であることを明らかにしている^{12,13)}。本検討と並行して収集している167名のタモキシフェン併用治療患者を用い検討したところ、CYP2D6遺伝子型と再発予防効果との間に有意差は認められなかった¹³⁾。有意な関連が認められないこれまでの報告のほとんどはタモキシフェンと化学療法併用による補助