

DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発
（相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究）

担当責任者 中田慎一郎 大阪大学大学院医学系研究科 独立准教授

研究要旨

エストロゲン非依存性の難治性乳がんであるTriple Negative乳がんの中にはBRCA1陰性の1群がある。BRCA1陰性乳がんでは相同組換え修復が欠損しており、PARP阻害剤に感受性を示す。しかしBRCA1変異乳がんの一部には、53BP1の発現低下が加わることで相同組換え修復が回復し、PARP阻害剤への耐性を示すことがわかっている。本研究では、BRCA1非依存的な相同組換えを制御するRING型E3ユビキチンリガーゼRINGE3-65に注目し、RINGE3-65が難治性乳がん治療における分子標的となる可能性について検討するため、BRCA1・53BP1ダブルノックアウト細胞およびBRCA1・53BP1・RINGE3-65トリプルノックアウト細胞を樹立した。

A. 研究目的

エストロゲン非依存性の難治性乳がんの Triple Negative 乳がんの中には、プロモーターのメチル化により BRCA1 の発現が低下しているものや BRCA1 の germline 変異から loss of heterozygosity (LOH) により BRCA1 の機能が消失したものが含まれている（以下 BRCA1 陰性乳がん）。BRCA1 は相同組換え修復を促進する分子であり、BRCA1 陰性乳がんの多くでは相同組換え修復の低下が認められる。

PARP1 阻害剤により発生する DNA 損傷の修復には相同組換え修復が必須であるため、BRCA1 変異乳がんは PARP1 阻害剤に強い感受性を示す。一方、BRCA1 が機能する細胞では PARP1 阻害剤による DNA 損傷は問題なく修復されるため、PARP1 は BRCA1 陰性乳がんの治療において重要な分子標的となっている。

近年の研究により、BRCA1 陰性細胞であっても、相同組換え修復抑制因子 53BP1 の発現が低下すると相同組換え修復が回復し、PARP1 阻害剤に耐性となることが示された。病理検体を解析した研究によると、BRCA1 陰性乳がんの中にも少なからず 53BP1 の発現低下が認められることも示されている。これらの知見は、BRCA1 陰性乳がんの中にさらに難治性を示す群が存在することを示唆している。

本研究では、BRCA1 非依存性相同組換え修復に

関与する分子を発見し、その機能を抑制することで BRCA1 陰性難治性乳がんにおける相同組換えを抑制し、PARP1 阻害剤あるいは抗腫瘍薬への感受性を誘導することを目標として研究を進めた。

B. 研究方法

培養細胞において、siRNA を用いて BRCA1 および 53BP1 ノックダウンした。BRCA1 ノックダウン細胞では、相同組換え修復の過程である RAD51 の DNA 損傷部位への局在が強く抑制され、BRCA1・53BP1 ダブルノックダウン細胞では RAD51 の DNA 損傷部位の局在が回復することを確認した。さらに、分子量 65kDa で RING ドメインを持つ E3 ユビキチンリガーゼ RINGE3-65 をノックダウンした BRCA1・53BP1・RINGE3-65 トリプルノックダウン細胞では RAD51 の DNA 損傷部位への局在が強く抑制されることを確認した。薬剤感受性試験を行うために、BRCA1・53BP1・RINGE3-65 ノックアウト細胞を樹立することにした。ヒト細胞では BRCA1 ノックアウト細胞が樹立できないため、BRCA1^{Δ11/Δ11} の樹立が可能と知られているニワトリ DT40 細胞を親株とすることとした。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム研究に相当しない。また、動物実験にも相当しない。

C. 研究結果

BRCA1 ノックアウト細胞では相同組換え修復が低下するため、相同組換えを利用した遺伝子ノックアウトを行うことができない。そこで、BRCA1^{Δ11/+}・53BP1^{+/-}から、RINGE3-65 をノックアウトし、さらに BRCA1 をノックアウトすることで BRCA1^{Δ11/Δ11}・53BP1^{+/-}・RINGE3-65^{+/-}細胞の樹立に成功した。また、BRCA1^{Δ11/Δ11}・53BP1^{+/-}、BRCA1^{Δ11/Δ11}、BRCA1^{Δ11/Δ11}・RINGE3-65^{+/-}、RINGE3-65^{+/-}も作製した。

RINGE3-65 を難治性乳がんの分子標的と考えた場合、RINGE3-65^{+/-} (正常細胞が RINGE3-65 阻害剤に処理された状態を示す) が RINGE3-65^{+/+}よりも強く感受性を示す抗腫瘍薬は本研究において用いる抗腫瘍薬としては不向きであると考えられる。そこで、様々な抗腫瘍薬の中から、RINGE3-65^{+/+}と RINGE3-65^{+/-}が同等の薬剤感受性を示す薬剤を抽出した。また、薬剤感受性試験の本格的実施に備え、各細胞株のプレATING効率を検証し、問題なく利用可能であることを確認した。

D. 考察

相同組換え修復の回復により難治性となる BRCA1 陰性難治性乳がん細胞において、RINGE3-65 を抑制することにより、相同組換え修復を抑制することができると考えられる。また、RINGE3-65 の機能抑制により、BRCA1 陰性難治性乳がんを抗腫瘍薬に感受性に変換できる可能性があると考えられる。本研究において樹立した細胞株を用いて薬剤感受性試験を行うことで、その可能性を詳細に検証できると考えられ、来年度以降実施していく。

E. 結論

RINGE3-65 が BRCA1 陰性難治性乳がん治療における分子標的となるかを検証するために必要な細胞株の樹立に成功した。

F. 健康危険情報

該当する情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu RK, Takeda S, Hirota

K.Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. *Oncogene*. In press

2. 学会発表

- 1) Kato K, Nakajima K, Nakada S. Fine-Tuning of DNA damage-induced ubiquitination supports adequate DNA repair pathway. Gordon Reserch Conference, 香港 2014 年 7 月
- 2) 中田慎一郎 DNA 損傷依存性ユビキチン化の精密制御による適切な DNA 修復経路選択 日本癌学会学術集会 横浜 2014 年 9 月
- 3) Nakada S DNA Damage-Induced Ubiquitination Affects DNA Repair Pathway Choice. 3R symposium 三島 2014 年 10 月
- 4) Nakajima K, Nakada S. Multiple Ubiquitination pathways suppress RAD51 recruitment through facilitating RPA S4/S8 phosphorylation. Keystone Symposium (Canada) March 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用

担当責任者 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

これまでに樹立した耐性機序の異なる6種のアロマターゼ阻害剤（ER陽性乳癌の標準的1次治療薬）耐性モデル細胞（ERが陰転化したものも含む）の耐性機序についてより詳細な解析を進めた。特にER発現が陰転化したものに注目した結果、TN乳がんでは報告されているsubtype（LAR-type）と同様の特徴を有するものも見出された。さらにこれらER陰性耐性株に対して、逐次ホルモン療法と各種新規分子標的薬のコンビネーション等による最も有効な治療戦略について検討した（fulvestrant, mTOR inhibitor, MEK inhibitor, PI3K inhibitor, CDK4/6 inhibitorなど）。その結果、耐性機序ごとにそれぞれの薬剤に対する感受性は異なり、耐性機序の識別が重要であることが改めて示された。特にERが陰転化し、ER非依存性となった耐性細胞はER陽性の耐性細胞とは著しく異なった性質、薬剤感受性を有していることが明らかとなった。

関係を詳細に明らかにし、各々のメカニズムに対

A. 研究目的

エストロゲン受容体を発現しているER陽性乳がんはアロマターゼ阻害薬を中心としたホルモン療法が比較的良く奏効することが知られ、一般的に予後が良いと考えられている。しかし、不応症例も多く、進行・再発症例においては耐性が生じ、その予後は極めて悪く難治性である。ホルモン療法耐性の機序は詳細には明らかとなっておらず、そのため2次治療の戦略も定まっていない。我々は以前、個々の乳がん臨床検体のエストロゲンシグナル経路の解析を行い、耐性機序には複数のパターンがあることが示唆された。そこで、これらの機序の違いを明らかにする目的で、耐性機序の異なった複数のアロマターゼ阻害剤耐性細胞の樹立を行った。これらの細胞株を用いることによって、癌部ホルモン環境も含めた複雑なエストロゲンシグナル経路の存在を明らかにし、これまで報告されていない新たな耐性機序の存在が見出された。また、一部の耐性機序にはERが陰転化するものも見られ、それらは外見上、Triple Negative (TN)の表現系を示す。これらがいわゆる臨床上のTN乳がんの一部に相当するものであるのかは、治療戦略上、大変重要な問題である。これらの耐性株の性質を明らかにすることによってTN乳がんの新たな治療法の開発に繋がる可能性も考えられる。そこで、これらの耐性機序とTN乳がんとの

応じた耐性機序克服やそれを通じたTN乳がん治療の新戦略の構築、また耐性機序識別の診断法を確立する。

B. 研究方法

1. 理論的に考えられる耐性機序の仮説について、それら各々を模倣する複数のアロマターゼ阻害剤耐性モデル乳がん細胞株を、ERE-GFPを安定導入したER陽性乳がん細胞株(MCF-7-E10, T47D-TE8)から樹立し、それらの細胞内のエストロゲンシグナル経路、リン酸化シグナル経路について詳細に解析し、耐性増殖の原因となっている理由、driver pathwayを明らかにする。その際、特にER発現が著しく低下、もしくは陰転化する耐性株に着目し、その原因や特徴、TN乳癌との共通性などについて詳細に解析した。
2. 上記の各種耐性株を用い、臨床上の逐次治療を想定し、各種分子標的治療薬（mTOR阻害剤、PI3K阻害剤、AKT阻害剤、MAPK阻害剤、CDK阻害剤、HDAC阻害剤等）の効果を検討した。
3. 耐性細胞を移植したxenograftマウスを用い、順次、上記治療薬の効果について検証していく。
4. 個々の乳癌臨床検体からの癌細胞の培養を試み、それらのエストロゲンシグナル経路について解析し、上記の解析から明らかになったdriver

pathway の実在性について検討する。また乳がん幹細胞の同定、分離も試みる。

(倫理面への配慮)

本研究に供する研究材料の一部は手術及び生検によって得られる腫瘍組織であり、本研究計画を本学倫理委員会に報告し許可を得た。本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。

C. 研究結果

1. これまでに樹立したホルモン療法耐性細胞 6 種は、大きく 3 つのジャンルに分類できた。すなわち、①エストロゲン枯渇下にあってもエストロゲン様活性を有するアンドロゲンの合成能を獲得、あるいは硫酸抱合型エストロゲンを積極的に利用するもの。②リン酸化などによるリガンドに依存しない ER の活性化能を獲得したもの。③もはや ER シグナル系に依存しない増殖を行うもの。これらの中で③は ER の発現が低下、あるいは陰転化したもので、TN 乳がんに関連がある可能性が考えられた。特に、Type 6 と名付けられた T-47D 細胞由来のものは、ER の陰転化とともにアンドロゲン受容体 (AR) の発現と活性が強まっており、LAR-type と呼ばれる TN 乳がんの subtype と共通の性質が観察された。さらに AI 剤治療後再発乳癌臨床検体を用いた検討においても AR や PSA を高発現している症例が観察され、臨床乳癌においてもこのような症例が実在することが示された。

2. ER 発現が陰性化したホルモン療法耐性に対する次治療の可能性について検討するため、Type 2 耐性細胞や fulvestrant 耐性細胞を用いて、mTOR 阻害剤や他の分子標的治療薬の効果について、*in vitro* で検討した。mTOR 阻害剤 evelorimus は、ER が陰転化した細胞の増殖も抑制し、Akt-mTOR 経路が ER 陰性細胞においても driver pathway のひとつであることが示された。一方、この type 2 耐性細胞は JNK 経路の関与が示唆され、JNK 阻害剤が増殖抑制作用を示し、新たな治療標的となる可能性が示された。

前述の ER 陰性耐性細胞 Type 6 は、前立腺癌治療に用いられる AR アンタゴニストが有用であることを示した。また、これら ER 陰性ホルモン療法耐性乳がん細胞に対しては分子標的治療薬単独よりも fulvestrant などのホルモン療法薬の併用が

効果的であることも示された。

3. さらに現在マウスの xenograft の系を用いてこれらの各種耐性細胞の機序の解析と治療法の検討を行っている。

D. 考察

壮年期女性に罹患が多い乳癌は若年性腫瘍とも言え、社会的、経済的インパクトは多大である。特に ER 陽性乳がんは我が国の乳癌症例の大部分を占め、その進行再発症例の治療は残された大きな課題であり、対象となる患者も多い。多くの乳癌はホルモン療法を施行されるため、進行再発症例はほとんどがホルモン療法耐性である。しかし、タモキシフェンなどの古典的ホルモン療法に対する耐性機序の研究は古くから行われてきたが、それも実際の耐性克服には繋がっていない。さらに最近の新たなホルモン療法や分子標的治療に対する耐性獲得機序についてはほとんど明らかとなっていない。一方、ER 陰性の TN 乳がんは有効な治療法の少ない予後の悪い難治性がんとして知られている。前述のホルモン療法耐性乳癌には ER 発現が低下、消失するものも見られ、TN 乳がんとの共通性が疑われる。我々の樹立した AI 耐性細胞にも同様のものが見られ、AR 依存性という TN 乳がんの一部にみられる subtype と同様の性質を示したことは興味深い。

ER 陰性ホルモン療法耐性乳癌に対する各種分子標的治療薬の効果を検討した結果、耐性機序の違いによって各々の効果は異なり、また、たとえ ER 発現が低下してもホルモン療法との併用が有用であることが示された。これらの情報は TN 乳がんの新規治療開発に有用な情報となり得る。

今後、これらの 6 種の耐性モデル細胞を用いた、*in vitro* や xenograft の実験系によって進行再発乳がんの新規治療法開発が可能になることが期待され、さらに TN 乳がんの新規治療法開発に繋がる知見が得られることが期待される。また、これらの subtype を識別するバイオマーカーを明らかにすることによって、TN 乳がんも含めた乳癌患者のさらなる個別化を可能にし、治療の最適化、医療費の軽減にも繋がると思われる。

E. 結論

これまでエストロゲン応答性 GFP を安定導入し

た ER 陽性乳がん培養細胞株 (MCF-7-E10, T47D-TE8) を親株としてエストロゲンシグナル応答性 GFP を指標に合計 6 種類 (Type 1~Type 6) の機序の異なるホルモン療法耐性 (アロマターゼ阻害剤耐性) 細胞株を樹立してきた。今回、その中で ER 発現が陰転化したものに着目し、TN 乳がんとの関連性について検討し、TN 乳がんの subtype と共通の性質を示すものを見出した。また、これらに対して既存の、あるいは今後臨床への導入が予定されている分子標的治療薬の効果を *in vitro* で検討し、それぞれの機序によるその効果の違いが明らかとなった。これらの知見は TN 乳がんの新規治療を考える上での有用な情報となろう。また、その各々の subtype を識別するバイオマーカーの開発も今後の重要な課題となる。

F. 健康危険情報
該当する情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiki N, Konno H, Kaneko Y, Gohno T, Hanamura T, Imami K, Ishihama Y, Nakanishi K, Niwa T, Seino Y, Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen response element-GFP (ERE-GFP) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 139: 61-72, 2014.
- 2) Hanamura T, Niwa T, Gohno T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 143: 69-80, 2014.
- 3) Yamaguchi Y, Seino Y, Takei H, Kurosumi M, and Hayashi S. Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness. *Cancer Microenvironment*, 7: 23-21, 2014.
- 4) Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohno T, Shibahara Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Ohnuki K, Kakugawa Y, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N, Hayashi S. Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 144: 513-522, 2014.
- 5) Higuchi T, Gohno T, Nagatomo T, Tokiniwa H, Niwa T, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Hayashi S. Variation in use of estrogen receptor a gene promoters in breast cancer compared by quantification of promoter-specific mRNA. *Clin. Breast Cancer*, 14: 249-245, 2014.
- 6) Machioka K, Mizokami A, Yamaguchi Y, Izumi K, Hayashi S, Namiki M. Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells. *Anticancer Res.* 35: 221-228, 2015.
- 7) Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S. Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, in press, 2015.

2. 学会発表

- 1) 樋口徹、遠藤恵、花村徹、郷野辰幸、丹羽俊文、山口ゆり、堀口淳、竹吉泉、林慎一： Estrogen Receptor(ER) 陽性乳癌における Steroid Sulfatase(STS) と Organic Anion Transporter Peptide(OATP)4A1 の新規バイオマーカーとしての可能性. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 (京都) 2014 年 4 月 3 日 ~5 日
- 2) Mariko Kimura, Toru Hanamura, Yosuke Kaneko, Toshifumu Niwa, Yuri Yamaguchi, Itaru Endo, Shin-ichi Hayashi : Molecular characterization of everolimus-resistant cell lines established from estrogen depletion-resistant MCF-7. AACR Annual Meeting 2014 (San Diego, USA) April 5-9, 2014
- 3) Rika Fujii, Toru Hanamura, Tatsuyuki Gohno, Toshifumi Niwa, Yuri Yamaguchi, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Noriaki Ohuchi, Shin-ichi Hayashi : Androgen receptor acquires an oncogenic role in the AI resistance mechanism in breast cancer. AACR Annual Meeting 2014 (San Diego, USA) April 5-9, 2014
- 4) 坪井洸樹、長友隆将、郷野辰幸、樋口徹、丹羽俊文、林慎一： ER α 遺伝子の CpG island shore に存在する特定のメチル化部位がホルモン療法耐性乳癌細胞における ER α 発現を規定している. 第 15 回ホルモンと癌研究会 (宮城) 2014 年 7 月 4 日 ~5 日
- 5) 内海加奈美、佐藤望、山口ゆり、林慎一： 乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞

- 性. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
- 6) 木村万里子、金子陽介、藤木夏、丹羽俊文、山口ゆり、遠藤格、林慎一: ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 におけるエストロゲン枯渇耐性かつ mTOR 阻害剤耐性の分子生物学的特徴. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 7) 金子陽介、花村徹、藤井里圭、坪井洗樹、長友隆将、丹羽俊文、林慎一: フルベストラント耐性乳癌細胞株の分子生物学的特徴. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 8) 徳田恵美、齊藤光江、清野祐子、山口ゆり、林慎一: 乳癌の化学療法効果におけるエストロゲンレセプター蛋白発現と活性による評価の検討. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 9) 樋口徹、長友隆将、郷野辰幸、時庭英彰、丹羽俊文、堀口淳、小山徹也、林慎一、竹吉泉: ER 陽性乳癌における ER, PR, HER2 の mRNA 発現と臨床病理学的因子との関連. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 10) 藤井里圭、鈴木貴、柴原裕紀子、丹羽俊文、石田孝宣、笹野公伸、大内憲明、林慎一: アロマトラーゼ阻害剤耐性再発乳癌症例におけるアンドロゲン受容体関連蛋白発現の検討. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 11) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一: ホルモン感受性乳癌における Aromatase 非依存的 Steroid 代謝経路の役割. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日~12 日
 - 12) 花村徹、丹羽俊文、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一: 閉経後ホルモン感受性乳癌における Androgen 代謝による Aromatase 非依存的 ER 活性化機構と新規治療の可能性. 第 23 回乳癌基礎研究会 (つくば) 2014 年 7 月 26 日~27 日
 - 13) 樋口徹、遠藤恵、花村徹、郷野辰幸、丹羽俊文、山口ゆり、堀口淳、竹吉泉、林慎一: Estrone Sulfate 依存性 Aromatase Inhibitor 耐性ヒト乳癌細胞株の増殖機構. 第 23 回乳癌基礎研究会 (つくば) 2014 年 7 月 26 日~27 日
 - 14) 内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎一: 乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 15 回乳癌最新情報カンファランス (松本) 2014 年 8 月 8 日~10 日
 - 15) 内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎一: 乳癌細胞における癌幹細胞性とホルモン療法耐性の関係. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 16) 高信純子、丹羽俊文、鈴木奏絵、郷野辰幸、山口ゆり、林慎一: 特異的ナノビーズを用いた細胞膜局在型エストロゲン受容体の解析と乳癌ホルモン療法耐性への関与. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 17) 浅利陽佑、高信純子、品川優理、丹羽俊文、平川久、山口ゆり、林慎一: ER を活性化するタバコ煙成分の探索とホルモン療法耐性株への影響の検討. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 18) 山口ゆり、木村万里子、内海加奈美、林慎一: 卵巣摘出マウスにおけるホルモン療法耐性乳癌の Xenograft モデル. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 19) 坪井洗樹、金子陽介、花村徹、藤井里圭、丹羽俊文、林慎一: フルベストラント耐性株における ER α のエピジェネティクスによる制御と細胞内シグナル伝達の可塑性の関係. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 20) 唯野良介、丹羽俊文、林慎一: ER α 転写解析によるエストロゲンシグナル経路の識別の試み. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 21) 福井布美代、内海加奈美、山口ゆり、林慎一: Heregulin- β 1 による MCF-7 乳癌細胞における ER/HER ファミリーの発現規制と癌幹細胞様の特性の誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日~27 日
 - 22) Mariko Kimura, Toru hanamura, Kohki Tsuboi,

- Yuri Yamaguchi, Toshihumi Niwa, Itaru Endo, Shin-ichi Hayashi: Efficacy of everolimus on multiple mechanism of AI-resistance in vitro and xenograft, and characterization of everolimus-resistance. 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio, USA) December 9-13, 2014
- 23) 林慎一：乳癌におけるホルモン療法耐性のメカニズム—基礎研究を中心に—。第14回関東ホルモンと癌研究会（東京）2014年2月1日
- 24) 林慎一：アロマターゼ阻害剤耐性機序と新規治療の可能性。第11回日本乳癌学会九州地方会（福岡）2014年3月2日
- 25) 林慎一：ホルモン療法耐性機序 UP-TO-DATE from 14th BC Meeting. 17th BREAST CANCER UP-TO-DATE Meeting（東京）2014年3月29日
- 26) 林慎一：閉経後進行再発乳癌の治療戦略 ～基礎研究より～。第10回東北 Breast Cancer Workshop（宮城）2014年6月21日
- 27) 林慎一：ホルモン療法耐性乳癌の分子機序。第22回日本乳癌学会学術総会（大阪）2014年7月10日～12日
- 28) 林慎一：閉経後進行・再発乳癌における SERD の可能性 ～基礎研究より～。第22回日本乳癌学会学術総会（大阪）2014年7月10日～12日
- 29) 林慎一：ホルモン療法耐性機序 –エベロリムスによる乳癌治療の可能性-。EAST Japan 乳癌 Live Seminar（大宮）2014年7月30日
- 30) 林慎一：内分泌療法耐性のメカニズム。第52回日本乳癌治療学会学術集会（横浜）2014年8月28日～30日
- 31) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子生物学と mTOR シグナル。Breast Cancer Experts Meeting in 郡山（郡山）2014年9月5日
- 32) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的。Scientific Exchange Meeting（東京）2014年9月6日
- 33) 林慎一：乳癌のホルモン療法耐性のメカニズムとその克服に向けて。第73回日本癌学会学術総会(横浜) 2014年9月25日～27日
- 34) 林慎一：乳癌ホルモン療法の基礎～耐性獲得のメカニズムとその克服に向けて。新潟県乳癌学術講演会(新潟) 2014年10月10日
- 35) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的。National SEM in Sapporo(札幌) 2014年10月24日
- H. 知的財産の出願・登録状況
国際出願中1件（PCT出願）
国際出願番号：PCT/JP2014/58262
発明の名称：アンドロゲンレセプター依存性乳癌細胞の作成方法、当該細胞株を用いたスクリーニング方法、並びに乳癌患者におけるアンドロゲンレセプター依存性獲得の判定方法、キット及びマーカー
発明者：林慎一、藤井里圭
権利者：東北大学
番号：2013-108774
出願年月日：2013年5月23日

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

プロジェクトの総合推進

担当責任者 三木 義男 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨

プロジェクトを円滑に推進するため、半年に1回程度、参画機関が参加する推進会議を開催するなど、連携・調整を密に行う。本年度は、平成26年7月11日に第22回日本乳癌学会の開催に合わせ、研究打ち合わせ会を開催した。さらに平成27年3月9日に、東京医科歯科大学において、平成26年度進捗報告会を開催し、平成27年度の研究方針を討議した。

学会等発表実績

委託業務題目「難治性乳癌のER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究」
 機関名：東京医科歯科大学難治疾患研究所 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター
 聖マリアンナ医科大学大学院医学研究科 大阪大学大学院医学系研究科
 東北大学大学院医学系研究科

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
A novel AKAP protein, BIG3 coordinates estrogen signaling pathways in breast cancer cells.	Toyomasa Katagiri	11th International Conference on Protein Phosphatase	2014年11月	国内
新規エストロゲンシグナル制御分子BIG3による新たながん抑制因子prohibitin2の機能喪失機構の解明(口頭発表)	片桐 豊雅, 吉丸 哲郎, 小松 正人	第87回日本生化学学会大会	2014年10月	国内
トリプルネガティブ乳癌における癌抑制遺伝子BCLR1の発現低下について(ポスター発表)	宮川 義仁, 小松 正人, 清谷 一馬, 吉丸 哲郎, 笹 三徳, 三好 康雄, 片桐 豊雅	第73回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌における核内19S-proteasome関連遺伝子(nPAG1)の役割(口頭発表)	小松 正人, 吉丸 哲郎, 尾野 雅哉, 松尾 泰佑, 清谷 一馬, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅	第73回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の開発(口頭発表)	吉丸 哲郎, 小松 正人, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅	第73回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発(口頭発表)	片桐 豊雅	第73回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発(口頭発表)	大豆本 圭, 小松 正人, 吉丸 哲郎, 上原 久典, 布川 朋也, 金山 博臣, 片桐 豊雅	第73回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
乳癌細胞における癌抑制分子PHB2のエストロゲン依存性核内移行機構の解明(ポスター発表)	金 南希, 吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 笹 三徳, 片桐 豊雅	第74回日本癌学会学術総会,	2014年9月	国内
包括的ゲノム解析を通じたトリプルネガティブ乳がんの分子特性(口頭発表)	片桐 豊雅	第22回日本乳癌学会学術総会	2014年7月	国内
トリプルネガティブ乳癌におけるプロテアソーム構成因子のプロテアソーム活性非依存的な役割(口頭発表)	小松 正人, 吉丸 哲郎, 松尾 泰佑, 片桐 豊雅	第18回日本がん分子標的治療学会学術集会	2014年6月	国内
エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がんの治療法の創製(口頭発表)	吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 片桐 豊雅	第18回日本がん分子標的治療学会学術集会	2014年6月	国内
BIG3-PHB2 Interaction is a key therapeutic target in luminal-type of breast cancer(ポスター発表)	Toyomasa Katagiri, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu and Taisuke Matsuo	Amerian Association for Cancer Research (AACR) Annal	Apr. 2014.	国外
BRCA1の新規クロマチン結合機構を標的としたがん治療戦略(口頭)	太田 智彦	第15回ホルモンと癌研究会	2014年7月	国内

BRCA1の新規DNA損傷応答メカニズムを標的とした治療戦略(口頭)	太田智彦	第22回日本乳癌学会学術総会	2014年7月	国内
BRCA1のDNA損傷応答とヒストン修飾(口頭)	太田智彦	第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会	2014年8月	国内
ATM-dependent but RNF168-independent BRCA1/BARD1 retention at sites of DNA damage(ポスター)	Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa, Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda, Wenwen Wu	Benzon Symposium No 60 – Nuclear Regulation by Ubiquitin	2014年8月	国外
Therapeutic strategy targeting the mechanism of BRCA1 retention at DNA damage sites via a histone modification.(口頭)	太田智彦	第73回日本癌学会学術総会	2014年9月	国内
HP1 amma mediates BARD1 retention on Lys9-dimethylated histone H3 at sites of DNA damage(ポス)	Tomohiko Ohta, Hiroyuki Nishikawa, Anna S. Sedukhina, Takayo Fukuda, Wenwen Wu	Fusion Conference DNA Replication as a Source of DNA Damage	2014年10月	国外
BRCA1 retention at DNA double-strand breaks in homology-directed repair pathways(口頭)	Tomohiko Ohta	International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases	2014年11月	国内
Fine-Tuning of DNA damage-induced ubiquitination supports adequate DNA repair pathway(ポスター)	Kato K, Nakajima K, Nakada S.	Gordon Reserch Conference	2014年7月	国外
DNA損傷依存性ユビキチン化の精密制御による適切なDNA修復経路選択(口演)	中田慎一郎	日本癌学会学術集会	2014年9月	国内
DNA Damage-Induced Ubiquitination Affects DNA Repair Pathway Choice.(口演)	Nakada S	3R Symposium	2014年9月	国内
Multiple Ubiquitination pathways suppress RAD51 recruitment through facilitating RPA S4/S8 phosphorylation.	Nakajima K, Nakada S.	Keystone Symposium	2015年3月	国外
Estrogen Receptor(ER) 陽性乳癌における Steroid Sulfatase(STS) と Organic Anion Transporter Peptide(OATP)4A1 の新規バイオマーカーとしての可能性	樋口徹、遠藤恵、花村徹、郷野辰幸、丹羽俊文、山口ゆり、堀口淳、竹吉泉、林慎一	第114回日本外科学会定期学術集会(京都)	2014年4月	国内
Molecular characterization of everolimus-resistant cell lines established from estrogen depletion-resistant MCF-7.(ポスター)	Kimura M, Hanamura T, Kaneko Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Endo I, Hayashi S.	AACR Annual Meeting 2014 (San Diego,USA)	2014年4月	国外
Androgen receptor acquires an oncogenic role in the AI resistance mechanism in breast cancer.(口演)	Fujii R, Hanamura T, Gohno T, Niwa T, Yamaguchi Y, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N,	AACR Annual Meeting 2014 (San Diego,USA)	2014年4月	国外
ER α 遺伝子の CpG island shore に存在する特定のメチル化部位がホルモン療法耐性乳癌細胞におけるER α 発現を規定している(口演)	坪井洸樹、長友隆将、郷野辰幸、樋口徹、丹羽俊文、林慎一	第15回ホルモンと癌研究会(宮城)	2014年7月	国内

乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性(口演)	内海加奈美、佐藤望、山口ゆり、林慎一	第22回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
ER陽性乳癌細胞株MCF-7におけるエストロゲン枯渇耐性かつmTOR阻害剤耐性の分子生物学的特徴(ポスター)	木村万里子、金子陽介、藤木夏、丹羽俊文、山口ゆり、遠藤格、林慎一	第23回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
フルベストラント耐性乳癌細胞株の分子生物学的特徴(ポスター)	金子陽介、花村徹、藤井里圭、坪井洸樹、長友隆将、丹羽俊文、林慎一	第24回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
乳癌の化学療法効果におけるエストロゲンレセプター蛋白発現と活性による評価の検討(ポスター)	徳田恵美、齊藤光江、清野祐子、山口ゆり、林慎一	第25回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
ER陽性乳癌におけるER, PR, HER2 のmRNA発現と臨床病理学的因子との関連(ポスター)	樋口徹、長友隆将、郷野辰幸、時庭英彰、丹羽俊文、堀口淳、小山徹也、林慎一、竹吉泉	第26回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
アロマトーゼ阻害剤耐性再発乳癌症例におけるアンドロゲン受容体関連蛋白発現の検討(ポスター)	藤井里圭、鈴木貴、柴原裕紀子、丹羽俊文、石田孝宣、笹野公伸、大内憲明、林慎一	第27回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
ホルモン感受性乳癌におけるAromatase 非依存的 Steroid 代謝経路の役割(ポスター)	花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一	第28回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
閉経後ホルモン感受性乳癌におけるAndrogen代謝によるAromatase非依存的ER活性化機構と新規治療の可能性(口演)	花村徹、丹羽俊文、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一	第23回乳癌基礎研究会(つくば)	2014年7月	国内
Estrone Sulfate 依存性Aromatase Inhibitor 耐性ヒト乳癌細胞株の増殖機構(口演)	樋口徹、遠藤恵、花村徹、郷野辰幸、丹羽俊文、山口ゆり、堀口淳、竹吉泉、林慎一	第23回乳癌基礎研究会(つくば)	2014年7月	国内
乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性(口演)	内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎一	第15回乳癌最新情報カンファランス(松本)	2014年8月	国内
乳癌細胞における癌幹細胞性とホルモン療法耐性の関係(ポスター)	内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
特異的ナノビーズを用いた細胞膜局在型エストロゲン受容体の解析と乳癌ホルモン療法耐性への関与(ポスター)	高信純子、丹羽俊文、鈴木奏絵、郷野辰幸、山口ゆり、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
ERを活性化するタバコ煙成分の探索とホルモン療法耐性株への影響の検討(ポスター)	浅利陽佑、高信純子、品川優理、丹羽俊文、平川久、山口ゆり、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
卵巣摘出マウスにおけるホルモン療法耐性乳癌のXenograftモデル(口演)	山口ゆり、木村万里子、内海加奈美、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
フルベストラント耐性株におけるER α のエピジェネティクスによる制御と細胞内シグナル伝達の可塑性の関係(ポスター)	坪井洸樹、金子陽介、花村徹、藤井里圭、丹羽俊文、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
ER α 転写解析によるエストロゲンシグナル経路の識別の試み(ポスター)	唯野良介、丹羽俊文、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
Heregulin- β 1によるMCF-7乳癌細胞におけるER/HERファミリーの発現規制と癌幹細胞様の特性の誘導(ポスター)	福井布美代、内海加奈美、山口ゆり、林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内

Efficacy of everolimus on multiple mechanism of AI-resistance in vitro and xenograft, and characterization of everolimus-resistance. (ポス	Mariko Kimura, Toru hanamura, Kohki Tsuboi, Yuri Yamaguchi, Toshihumi Niwa, Itaru Endo, Shin-ichi Hayashi	2014 San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio, USA)	2014年12月	国外
乳癌におけるホルモン療法耐性のメカニズム—基礎研究を中心に—(口演)	林慎一	第14回関東ホルモンと癌研究会(東京)	2014年2月	国内
アロマターゼ阻害剤耐性機序と新規治療の可能性(口演)	林慎一	第11回日本乳癌学会九州地方会(福岡)	2014年3月	国内
ホルモン療法耐性機序(口演)	林慎一	17th BREAST CANCER UP-TO-DATE Meeting(東京)	2014年3月	国内
閉経後進行再発乳癌の治療戦略～基礎研究より～(口演)	林慎一	第10回東北Breast Cancer Workshop(宮城)	2014年6月	国内
ホルモン療法耐性乳癌の分子機構(口演)	林慎一	第22回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
閉経後進行・再発乳癌におけるSERDの可能性～基礎研究より～(口演)	林慎一	第23回日本乳癌学会学術総会(大阪)	2014年7月	国内
ホルモン療法耐性機序 -エベロリムスによる乳癌治療の可能性(口演)	林慎一	EAST Japan 乳癌 Live Seminar(大宮)	2014年7月	国内
内分泌療法耐性のメカニズム(口演)	林慎一	第52回日本乳癌治療学会学術集会(横浜)	2014年8月	国内
ホルモン療法耐性の分子生物学とmTORシグナル(口演)	林慎一	Breast Cancer Experts Meeting in 郡山(郡山)	2014年9月	国内
ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的(口演)	林慎一	Scientific Exchange Meeting(東京)	2014年9月	国内
乳癌のホルモン療法耐性のメカニズムとその克服に向けて(口演)	林慎一	第73回日本癌学会学術総会(横浜)	2014年9月	国内
乳癌ホルモン療法の基礎～耐性獲得のメカニズムとその克服に向けて(口演)	林慎一	新潟県乳癌学術講演会(新潟)	2014年10月	国内
ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的(口演)	林慎一	National SEM in Sapporo(札幌)	2014年10月	国内
マルチトランスフェクションプレートを用いた上皮性卵巣癌の新規分子標的の探索(ポスター)	田中 英雄, 片岡 史夫, 野村 弘行, 津田 浩史, 進 伸幸, 高野 政志, 板持 広明, 紀川 純三, 齊藤 広子, 三木 義男, 吉村 泰典, 青木	第66回日本産科婦人科学会学術総会、東京(千代田区)	2014年4月	国内
葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いたperiostin欠乏によるdecorinの細胞外放出(ポスター)	石場 俊之, 中西 啓, 永原 誠, 中川 剛士, 佐藤 隆宣, 円城寺 恩, 大野 玲, 飯田 聡, 植竹 宏之, 杉原 健一, 三木 義男	第114回日本外科学会定期学術集会、京都市	2014年4月	国内
乳癌におけるMaspinの過剰発現と臨床的検討(ポスター)	小松 哲, 長崎 光一, 伊藤 研一, 天野 純, 三木 義男	第114回日本外科学会定期学術集会、京都市	2014年4月	国内
遺伝性乳がん卵巣がん症候群(HBOC)と遺伝カウンセリング 遺伝性乳がん原因遺伝子の発見から新しい治療開発への展望(口頭)	三木 義男	第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、東大阪市	2014年6月	国内

乳がんを読み解くために必要なゲノム情報の基礎 全ゲノムシーケンス、RNAシーケンス、エピジェネティクス等(口頭)	三木 義男	第22回日本乳癌学会学術総会、大阪市	2014年7月	国内
機能ネットワークからみた乳癌予測因子の探索(ポスター)	大石 陽子, 黒田 一, 川村雄大, 斎藤 賢将, 野谷 啓之, 川村 徹, 佐藤 康, 密田 亜希, 中嶋 昭, 三木 義男	第22回日本乳癌学会学術総会、大阪市	2014年7月	国内
ルミナール乳がんに対する化学療法の可能性(ポスター)	吉本 賢隆, 前田 奈緒子, 神森 眞, 三木 義男	第22回日本乳癌学会学術総会、大阪	2014年7月	国内
BRCA2の新規機能解明に基づく診断・治療法の開発(口頭)	中西 啓, 三木 義男	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
PARP-1 と PARGは放射線応答において53BP1の制御に関与する(口頭)	Wang Junhui, 茂木 章, 藤森 浩彰, 三木 義男, 益谷 美都子	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
M期中心体におけるMT1-MMPのBRCA2タンパク分解(口頭)	高岡 美帆, ナディラ ワリ, 齋藤 広子, 中西 啓, 三木 義男	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
BRCA2欠失乳細胞に合成致死を誘導する有効な低分子化合物の同定(口頭)	清水 優香, 湯浅 磨里, 中西 啓, 三木 義男	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
画像認識技術による中心体解析とその複製制御に関するBRCA2分子内領域の同定(ポスター)	佐藤 玄, 倉科 太一, 紺野 真衣, 三木 義男, 竹中 克也	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
乳がん患者のパクリタキセル応答性に関わる遺伝子ネットワーク解析(ポスター)	宮口 健, 井元 清哉, 牛嶋大, 松浦 正明, 玉田 嘉紀, 山口 類, 宮野 悟, 三木 義男	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内
日本における中咽頭扁平上皮癌のHPV陽性率とHPV型(ポスター)	古田 玲子, 佐藤 由紀子, 利安 隆史, 新橋 渉, 山本 智理子, 川端 一嘉, 三木 義男, 石川 雄一, 北川 知	第73回日本癌学会学術総会、横浜市	2014年9月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等)	発表した時期	国内・外の別
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its partner through an ARM-type α helical structure.	Chen YA, Murakami Y, Ahmad S, Yoshimaru T, Katagiri T, Mizuguchi K.	BMC Res Notes.	2014	国外
Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes	Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T	PLoS One.	2014	国外
Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions.	Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T	Sci Rep.	2014	国外
Identification of novel epigenetically inactivated gene, PAMR1 in breast carcinoma.	Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K.	Oncol Rep.	2015	国外

Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER+, and HER2- Breast Cancer.	Yanai A, Inoue N, Yagi T, Nishimukai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Enomoto Y, Takatsuka Y, Watanabe T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y	Clin Breast Cancer	2015 in press	国外
Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast	Yoshimaru T, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T	Cancer Sci.	2015 in press	国内
NF- κ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition.	Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K.	Oncotarget.	2015	国外
Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA	Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Klevit RE, Ohta	Cancer Res.	2015	国外
LSD1 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Basal-Like Breast Cancer, and Sensitivity to PARP Inhibition.	Nagasawa S, Sedukhina AS, Nakagawa Y, Maeda I, Kubota M, Ohnuma S, Tsugawa K, Ohta T, Roche-Molina M, Bernal JA, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Sato K.	PLoS One.	2015	国外
Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation.	Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J.	EMBO Rep.	2015	国外
Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining.	Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu RK, Takeda S, Hirota K.	Oncogene	2015 in press	国外
Estrogen response element-GFP (ERE-GFP) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms.	Fujiki N, Konno H, Kaneko Y, Gohno T, Hanamura T, Imami K, Ishihama Y, Nakanishi K, Niwa T, Seino Y, Yamaguchi Y, Hayashi S.	J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 139: 61-72, 2014.	2014	国外
Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary	Hanamura T, Niwa T, Gohno T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S.	Breast Cancer Res. Treat. 143: 69-80, 2014.	2014	国外
Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness.	Yamaguchi Y, Seino Y, Takei H, Kurosumi M, and Hayashi S.	Cancer Microenvironment, 7: 23-21, 2014.	2014	国外
Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma.	Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohno T, Shibahara Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Ohnuki K, Kakugawa Y, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N,	J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 144: 513-522, 2014.	2014	国外

Variation in use of estrogen receptor a gene promoters in breast cancer compared by quantification of promoter-specific mRNA.	Higuchi T, Gohn T, Nagatomo T, Tokiniwa H, Niwa T, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Hayashi S.	Clin. Breast Cancer, 14: 249-245, 2014.	2014	国外
Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells.	Machioka K, Mizokami A, Yamaguchi Y, Izumi K, Hayashi S, Namiki M.	Anticancer Res. 35: 221-228, 2015.	2015	国外
Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer.	Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S.	Clin. Breast Cancer, in press, 2015.	2015	国外
Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion.	Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A	Sci Rep.	2014	国外
Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer	Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP.	EMBO Mol Med.	2014	国外
Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins.	Kimura H, Miki Y, Nakanishi	Cell Cycle.	2014	国外
Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array.	Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y.	J Clin Bioinforma.	2014	国外
BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC.	Takaoka M, Saito H, Takenaka K, Miki Y, Nakanishi A.	Cancer Res.	2014	国外

Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER⁺, and HER2⁻ Breast Cancer

Ayako Yanai,¹ Natsuko Inoue,¹ Tomoko Yagi,¹ Arisa Nishimukai,¹
Yoshimasa Miyagawa,¹ Keiko Murase,¹ Michiko Imamura,¹ Yukie Enomoto,¹
Yuichi Takatsuka,¹ Takahiro Watanabe,² Seiichi Hirota,² Mitsunori Sasa,³
Toyomasa Katagiri,⁴ Yasuo Miyoshi¹

Abstract

We determined the activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in 108 cases of estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with high and low Ki-67 expression. The expression levels of Ki-67, p53, phosphorylated MAPK (pMAPK), and protein S6 (pS6; downstream molecule of PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase pathway) were determined immunohistochemically. pS6 positivity, but not pMAPK positivity, was significantly associated with the high Ki-67 expression subset.

Background: Evaluation of luminal A and luminal B characteristics of estrogen receptor (ER)-positive and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative breast cancer is considered important. Although the phosphoinositide 3 kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways are thought to be involved in the luminal B subtype, the details of their contribution to breast cancer remain unclear. **Materials and Methods:** We determined the activation of these pathways (phosphorylated MAPK [pMAPK] and protein S6 [pS6; a downstream molecule of PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/S6 kinase (S6K)]) in 108 ER⁺, HER2⁻ breast cancer cases with high and low Ki-67 expression. The ER, progesterone receptor (PgR), Ki-67, p53 expression levels were also determined immunohistochemically. The cutoff value for Ki-67 was set at 15%. **Results:** A significantly greater percentage of cancer cases with high Ki-67 expression showed pS6 positivity than did those with low Ki-67 expression (53.2% vs. 19.7%; $P = .0003$). No significant differences were found between the cases with high and low expression levels were detected for p53 (23.4% vs. 11.5%; $P = .12$) or pMAPK (36.2% vs. 34.4%; $P = .85$) positivity. Multivariate analysis showed that pS6 positivity (odds ratio 5.16, 95% confidence interval 1.95-13.63; $P = .0009$), nuclear grade 2 and 3, and low PgR expression ($\leq 20\%$) were independently associated with the high Ki-67 subset. **Conclusion:** From our findings, we have concluded that the pS6 expression level is associated with the characteristics of breast cancer with high Ki-67 expression. Because these associations were observed, irrespective of menopausal status, the biologic difference seems to be less affected by estrogen signaling than by activation of S6 protein, especially in terms of proliferation. Our findings have also indicated that targeting the mTOR/S6K pathway might be a useful strategy for the treatment of ER⁺/HER2⁻ breast cancer with high Ki-67 expression.

Clinical Breast Cancer, Vol. ■, No. ■, ■-■ © 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Akt, Breast Cancer, Ki67, PI3K, S6 kinase

¹Division of Breast and Endocrine, Department of Surgery

²Department of Surgical Pathology

Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo, Japan

³Tokushima Breast Care Clinic, Tokushima, Tokushima, Japan

⁴Division of Genome Medicine, Institute for Genome Research, University of Tokushima, Tokushima, Tokushima, Japan

Submitted: Sep 29, 2014; Accepted: Dec 16, 2014

Address for correspondence: Yasuo Miyoshi, MD, PhD, Division of Breast and Endocrine, Department of Surgery, Hyogo College of Medicine, Mukogawa-cho 1-1, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan
E-mail contact: ymiyoshi@hyo-med.ac.jp

Activation of mTOR/S6K in Ki-67-high, ER⁺/HER2⁻ Breast Cancer

Introduction

The evaluation of biologic differences between estrogen receptor (ER)-positive and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative breast cancers is considered important, not only for predicting the effectiveness of endocrine therapy, but also for indications for chemotherapy. It is well known that ER⁺/HER2⁻ breast cancers can be divided into luminal A and luminal B subtypes according to the gene expression profiling findings.¹ Because it is not always feasible to use gene expression data, luminal A and luminal B breast cancers are often classified according to the Ki-67 expression level,² which can also be used in daily clinical practice for determining the usefulness and indications for chemotherapy.³ Although the luminal B subtype designation could be considered to indicate low progesterone receptor (PgR) expression, high grade, high proliferation, and less sensitivity to endocrine therapy, the mechanisms accounting for the biologic differences between luminal A and luminal B subtypes have not yet been disclosed.

In a previous study, we demonstrated that the biologic characteristics of luminal A cancers (defined by the Ki-67 level) are influenced by the estrogen environment. However, its influence on luminal B cancers (defined by the Ki-67 level) seems to be less important than cross-talk with growth factor signaling.⁴ It is thought that activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of the rapamycin (mTOR) pathway, the result of well-characterized downstream signaling mediated through membrane growth factor receptors, plays a critical role in the progression of breast cancer.⁵ Creighton et al⁶ used both protein and mRNA to investigate PI3K signature scores and found that the scores were significantly greater in luminal B than in luminal A cancers. Furthermore, it has been reported that activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling resulted in estrogen-independent growth in ER⁺ breast cancer cells.⁷ This inverse

correlation between MAPK activation and resistance to endocrine therapy has also been identified in human ER⁺ breast cancer.⁸⁻¹⁰

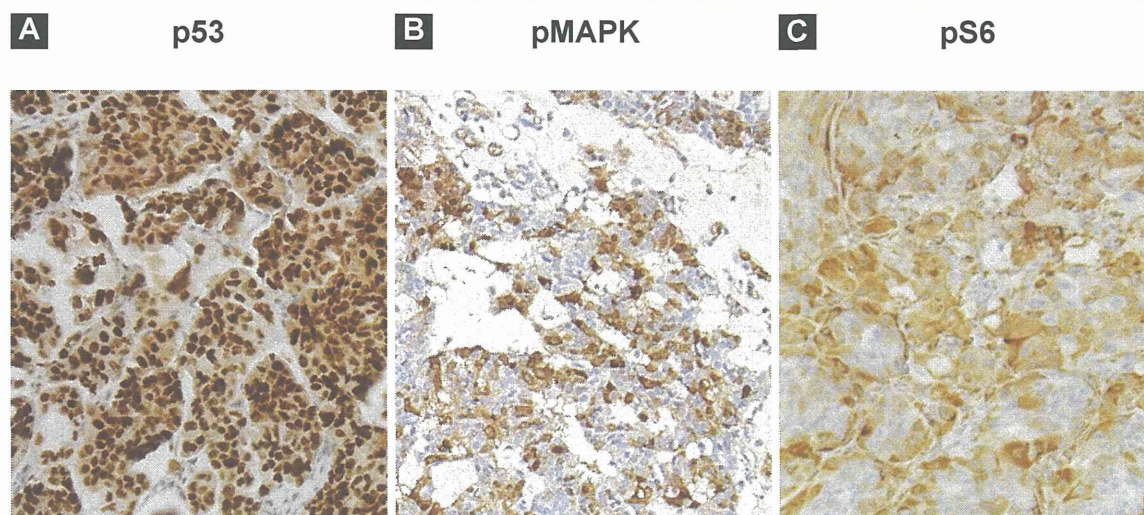
However, although it has been demonstrated that activation of both PI3K and MAPK pathways in ER⁺ and HER2⁻ human breast cancers is related to an intrinsic subtype or endocrine sensitivity, little is known about how the 2 signaling pathways contribute to ER⁺ and HER2⁻ breast cancer. Because these signaling pathways can contribute, not only to biologic (including proliferative) actions, but also to endocrine resistance mediated through various mechanisms, the identification of activating signaling, especially in luminal B breast cancer, is of major importance. Thus, we subjected phospho-ribosomal protein S6 (pS6; downstream molecule of the PI3K/Akt/mTOR/S6K pathway and phosphorylated by S6 kinase [S6K]) and phosphorylated p44/42 MAPK (pMAPK) to immunohistochemical examinations to determine their role as biomarkers of PI3K/Akt/mTOR and MAPK activation, respectively, in luminal A and luminal B breast cancer, as defined by the Ki-67 level. Because ER⁺ and HER2⁻ breast cancers are affected by differences in the estrogen milieu between pre- and postmenopausal women, we determined the differences in the activating pathways, taking menopausal status into consideration. In addition, luminal B breast cancers reportedly feature a high frequency of p53 alterations¹¹; thus, we also conducted immunohistochemical investigations of p53 protein expression.

Materials and Methods

Tumor Samples

A total of 108 patients with invasive ER⁺ and HER2⁻ breast cancer who were treated with mastectomy or breast-conserving surgery at the Hyogo College of Medicine (79 cases, from February 2005 to August 2011) or Tokushima Breast Clinic (29 cases, from July 2003 to April 2011) were eligible for

Figure 1 Representative Immunostaining for p53 (A), Phosphorylated Mitogen-Activated Protein Kinase (pMAPK) (B), and Protein S6 (pS6) (C) Positivity to Determine the Percentage of Positive Cancer Cells in the Nuclei (p53), Cytoplasm and Nuclei (pMAPK), and Cytoplasm (pS6)



enrollment in the present study. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from these patients' cancers were examined. The patients with noninvasive carcinoma or those who had received chemotherapy or endocrine therapy before surgery were excluded. The histologic classification and nuclear grade were determined using the Japanese Breast Cancer Society classification.¹² The cutoff value for ER was set at 1% of nuclear staining, and an immunohistochemical score of 0 or 1 or 2 with negative fluorescence in situ hybridization findings was considered to indicate HER2⁺ cancer. During the median follow-up period of 41.0 months (range, 1-116 months), 10 patients developed distant or local recurrence. For adjuvant chemotherapy, anthracycline-containing regimens were administered to 5 and anthracycline followed by taxanes and taxane-based regimens to 7 patients each. A total of 96 patients were treated with endocrine therapy, including aromatase inhibitors (n = 57),

a luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) analog plus tamoxifen (n = 29) or aromatase inhibitor (n = 1), and tamoxifen (n = 6). Three patients received tamoxifen followed by an aromatase inhibitor or LHRH analog and aromatase inhibitor followed by LHRH analog plus tamoxifen. Four patients did not receive endocrine therapy, and the previous treatment of 8 patients was unknown. The Ethics Committee of Hyogo College of Medicine and Tokushima University approved the present study.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues resected intraoperatively were used for additional examination. The tissues were stained immunohistochemically for ER and PgR with antibody 1D5 (Dako, Glostrup, Denmark) and PgR636 (Dako), respectively, using automated immunostainers (BOND-MAX; Leica Microsystems,

Table 1 Correlation of p53, pMAPK, and pS6 Expression Levels With Clinicopathologic Characteristics

Characteristic	p53		pMAPK		pS6	
	Positive (n = 18)	Negative (n = 90)	Positive (n = 38)	Negative (n = 70)	Positive (n = 37)	Negative (n = 71)
Age (years)						
Mean	58.1	57.8	58.5	57.8	59.6	56.9
Range	37-81	33-90	35-90	33-85	37-85	33-90
Menopausal status						
Premenopausal	13 (72.2)	56 (62.2)	24 (63.2)	45 (64.3)	26 (70.3)	43 (60.6)
Postmenopausal	5 (27.8)	33 (36.7)	13 (34.2)	25 (35.7)	11 (29.7)	27 (38.0)
Unknown	0 (0)	1 (1.1)	1 (2.6)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)
Histologic type						
Invasive ductal carcinoma	18 (100)	82 (91.1)	36 (94.7)	64 (91.4)	36 (97.3)	64 (90.1)
Invasive lobular carcinoma	0 (0)	3 (3.3)	1 (2.6)	2 (2.9)	0 (0)	3 (4.2)
Other	0 (0)	5 (5.6)	1 (2.6)	4 (5.7)	1 (2.7)	4 (5.6)
Tumor size (cm)						
<2	11 (61.1)	59 (65.6)	24 (63.2)	46 (65.7)	26 (70.3)	44 (62.0)
>2	6 (33.3)	29 (32.2)	13 (34.2)	22 (31.4)	11 (29.7)	24 (33.8)
Unknown	1 (5.6)	2 (2.2)	1 (2.6)	2 (2.9)	0 (0)	3 (4.2)
Lymph node metastasis						
Negative	11 (61.1)	56 (62.2)	23 (60.5)	44 (62.9)	24 (64.9)	43 (60.6)
Positive	6 (33.3)	31 (34.4)	13 (34.2)	24 (34.3)	11 (29.7)	26 (36.6)
Unknown	1 (5.6)	3 (3.3)	2 (5.3)	2 (2.9)	2 (5.4)	2 (2.8)
Nuclear grade						
1	7 (38.9)	60 (66.7) ^a	22 (57.9)	45 (64.3)	20 (54.1)	47 (66.2)
2	5 (27.8)	21 (23.3)	11 (28.9)	15 (21.4)	10 (27.0)	16 (22.5)
3	6 (33.3)	9 (10.0)	5 (13.2)	10 (14.3)	7 (18.9)	8 (11.3)
ER expression level						
<50%	6 (33.3)	17 (18.9)	9 (23.7)	14 (20.0)	9 (24.3)	14 (19.7)
>50%	12 (66.7)	73 (81.1)	29 (76.3)	56 (80.0)	28 (75.7)	57 (80.3)
PgR expression level						
<20%	9 (50.0)	32 (35.6)	11 (28.9)	30 (42.9)	16 (43.2)	25 (35.2)
>20%	9 (50.0)	58 (64.4)	27 (71.1)	40 (57.1)	21 (56.8)	46 (64.8)

Data presented as n (%), unless otherwise noted.

Abbreviations: ER = estrogen receptor; pMAPK = phosphorylated mitogen-activated protein kinase; PgR = progesterone receptor.

^aP = .02.

Activation of mTOR/S6K in Ki-67-high, ER⁺/HER2⁻ Breast Cancer

Tokyo, Japan). HER2 (Hercep Test; Dako) and Ki-67 (MIB1; Dako) staining was evaluated using Autostainer (Dako Japan, Tokyo, Japan). Because the stability of phosphoproteins is a critical point, we obtained tissue samples immediately after resection during surgery that were fixed in buffered formalin for 24 to 48 hours. p53, pMAPK, and pS6 expression was determined using primary antibodies DO-7 (mouse monoclonal antibody; Dako), D13.14.4E (phospho-p44/42 MAPK [Thr202/Tyr204], rabbit monoclonal antibody; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), D57.2.2E (phospho-S6 ribosomal protein [Ser235/236], rabbit monoclonal antibody; Cell Signaling Technology). After deparaffinization of the sections, antigen was retrieved by heating at 98°C for 40 minutes in Tris/ethylenediaminetetraacetic acid buffer (pH 9.0). Endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.3% hydrogen peroxide, and nonspecific binding was blocked with 10% normal goat serum, both for 10 minutes. The primary antibody was then incubated at 4°C overnight. Finally, the sections were incubated with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (EnVision Plus, Dako) at room temperature for 1 hour, and the peroxidase reaction was visualized using a 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride solution (Dako) according to the manufacturer's protocol, followed by counterstaining with hematoxylin. The primary antibodies were diluted 1:100 for p53 and 1:200 for pMAPK or pS6, followed by determination of the percentage of positive cancer cells in the nuclei (p53), cytoplasm (pS6), and cytoplasm and nuclei (pMAPK). The cancer cells with moderate to intense staining were evaluated as positive from among 500 cancer cells selected in different areas of the stained lesions. The slides were examined by 2 of us (A.Y., Y.M.) who were unaware of the clinicopathologic features of the patients, and the results were rechecked when discrepant. The cutoff value of Ki-67 was set at 15%, according to the criteria defined by Cheang et al.² The cutoff values of p53, pMAPK, and pS6 were set at 10% according to the criteria defined previously by Millar et al,¹³ Gori et al,¹⁴ and Sun et al,¹⁵ respectively.

Statistical Analysis

The relationships between the clinicopathologic characteristics and p53, pMAPK, or pS6 positivity were evaluated using the χ^2 or Fisher's exact test, as appropriate, and the Mann-Whitney *U* test. The expression levels of p53, pMAPK, or pS6 in the low and high Ki-67 subsets were calculated using the Mann-Whitney *U* test. The relationships between the findings from univariate and multivariate analyses of the Ki-67 expression levels with various factors and the relevant odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated using the logistic regression method. The log-rank test was used to compare the relapse-free survival (RFS) of different groups on Kaplan-Meier plots. JMP Pro, version 10, software (SAS Institute Inc, Cary, NC) was used for all statistical analyses, and the differences were considered statistically significant at $P < .05$.

Results

Relationships of p53, pMAPK, and pS6 Expression With Clinicopathologic Characteristics

Representative displays of p53, pMAPK, and pS6 immunostaining are shown in Figure 1. The results of an analysis of the correlations between the positivity of these proteins and the

clinicopathologic characteristics are listed in Table 1. Significantly more cancers with a high nuclear grade were recognized in the p53⁺ subset ($P = .02$). No significant differences were found between p53 positivity and the other clinicopathologic factors, including menopausal status, tumor size, lymph node metastasis, or ER and PgR expression level. Nor were any significant associations detected between any of the clinicopathologic factors and either pMAPK or pS6 expression level.

p53, pMAPK, and pS6 Expression Levels in High and Low Ki-67 Breast Cancer

Of the 108 patients enrolled in the present study, 61 had low and 47 high Ki-67 expression cancer. As listed in Table 2, p53 and pMAPK positivity was not associated with the Ki-67 expression level, irrespective of menopausal status. In contrast, pS6 positivity in

Table 2 p53, pS6, and pMAPK Expression Level in Low and High Ki-67 Breast Cancer Stratified by Menopausal Status

Characteristic	Low Ki-67 (n = 61) ^a	High Ki-67 (n = 47) ^b	P Value
p53			.12
All patients			
p53 ⁺	7 (11.5)	11 (23.4)	
p53 ⁻	54 (88.5)	36 (76.6)	
Premenopausal women			.33
p53 ⁺	2 (8.3)	3 (21.4)	
p53 ⁻	22 (91.7)	11 (78.6)	
Postmenopausal women			.35
p53 ⁺	5 (13.9)	8 (24.2)	
p53 ⁻	31 (86.1)	25 (75.8)	
pMAPK			.85
All patients			
pMAPK ⁺	21 (34.4)	17 (36.2)	
pMAPK ⁻	40 (65.6)	30 (63.8)	
Premenopausal women			.48
pMAPK ⁺	7 (29.2)	6 (42.9)	
pMAPK ⁻	17 (70.8)	8 (57.1)	
Postmenopausal women			.80
pMAPK ⁺	13 (36.1)	11 (33.3)	
pMAPK ⁻	23 (63.9)	22 (66.7)	
pS6			.0003
All patients			
pS6 ⁺	12 (19.7)	25 (53.2)	
pS6 ⁻	49 (80.3)	22 (46.8)	
Premenopausal women			.06
pS6 ⁺	4 (16.7)	7 (50.0)	
pS6 ⁻	20 (83.3)	7 (50.0)	
Postmenopausal women			.005
pS6 ⁺	8 (22.2)	18 (54.5)	
pS6 ⁻	28 (77.8)	15 (45.5)	

Data presented as n (%).

Abbreviations: pMAPK = phosphorylated mitogen-activated protein kinase; pS6 = protein S6.

^aLow (<15%).

^bHigh (>15%).

the high Ki-67 subset (53.2%) was significantly greater than that in the low Ki-67 subset (19.7%; $P = .0003$). This difference in pS6 positivity tended to be consistent for both premenopausal ($P = .06$) and postmenopausal ($P = .005$) women.

The univariate analysis indicated that nuclear grade 2 (OR, 3.45; 95% CI, 1.34-8.84; $P = .01$), nuclear grade 3 (OR, 16.42; 95% CI, 3.38-79.79; $P = .0005$), low PgR expression ($< 20\%$; OR, 3.20; 95% CI, 1.42-7.17; $P = .004$), and pS6⁺ (OR, 4.64; 95% CI, 1.98-10.89; $P = .0004$) were significantly associated with high Ki-67 cancer (Table 3). Multivariate analysis of these factors indicated that nuclear grade 2 (OR, 2.84; 95% CI, 1.01-8.00; $P = .04$), nuclear grade 3 (OR, 16.90; 95% CI, 3.11-91.83; $P = .001$), low PgR expression ($< 20\%$; OR, 2.80; 95% CI, 1.07-7.30; $P = .03$), and pS6 positivity (OR, 5.16; 95% CI, 1.95-13.63; $P = .0009$) were significant independent risk factors for high Ki-67 cancer.

Relationship of Ki-67, p53, pMAPK, and pS6 Expression Levels With Patient Outcomes

The RFS of patients with high Ki-67 cancer was significantly worse than the RFS of those with low Ki-67 tumors ($P = .04$;

Figure 2A). In contrast, no statistically significant differences were found in the RFS between patients with positive and negative subsets for p53, pMAPK, and pS6 (Figure 2B-D). Next, Kaplan-Meier plots for combined Ki-67 and pS6 expressions levels were analyzed. The RFS of those with high pS6 cancer was not significantly different from the RFS of those with low pS6 cancer in the low Ki-67 subset ($P = .25$; Figure 3A) or high Ki-67 subset ($P = .17$; Figure 3B).

Discussion

The findings of the present study demonstrated that pS6 positivity, but not pMAPK positivity or p53 positivity, was associated with high Ki-67 status of ER⁺ and HER2⁻ breast cancer, irrespective of menopausal status. This suggests that the biologic characteristics of luminal B cancers are influenced, not by activation of the MAPK pathway, but rather by that of the mTOR/S6 pathway. Because this relationship was consistent for both pre- and postmenopausal patients, the estrogen environment seems to be less important for the luminal B subtype. This result, in addition to the previously reported finding that the gene expression signature of

Table 3 Univariate and Multivariate Analyses of Associations of Various Factors With High Ki-67 Subset

Variable	Univariate Analysis	P Value	Multivariate Analysis	P Value
Menopausal status		.27		
Premenopausal	1.00		—	—
Postmenopausal	1.57 (0.70-3.54)		—	—
Tumor size (cm)		.26		
<2.0	1.00		—	—
>2.0	1.59 (0.70-3.60)		—	—
Lymph node metastasis		.45		
Negative	1.00		—	—
Positive	1.32 (0.59-2.96)		—	—
Nuclear grade				
1	1.00	1.00	—	—
2	3.45 (1.34-8.84)	.01	2.84 (1.01-8.00)	.04
3	16.42 (3.38-79.79)	.0005	16.90 (3.11-91.83)	.001
ER expression level		.34		
High (>50%)	1.00		—	—
Low (<50%)	1.56 (0.62-3.93)		—	—
PgR expression level				
High (>20%)	1.00	1.00	—	—
Low (<20%)	3.20 (1.42-7.17)	.004	2.80 (1.07-7.30)	.03
p53 expression		.10		
Negative	1.00		—	—
Positive	2.36 (0.84-6.65)		—	—
pMAPK expression		.85		
Negative	1.00		—	—
Positive	1.08 (0.49-2.39)		—	—
pS6 expression				
Negative	1.00	1.00	—	—
Positive	4.64 (1.98-10.89)	.0004	5.16 (1.95-13.63)	.0009

Data presented as odds ratio (95% confidence interval).

Abbreviations: ER = estrogen receptor; pMAPK = phosphorylated mitogen-activated protein kinase; PgR = progesterone receptor; pS6 = protein S6.