

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10531

研究課題名(和文) 晩期再発乳癌の予測因子の同定と再発メカニズムの解明 - 個別化治療を目指して

研究課題名(英文) Studies on characteristics and prognosis of breast cancer with late recurrence

研究代表者

山下 啓子 (Yamashita, Hiroko)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：70332947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： エストロゲン受容体(estrogen receptor: ER)陽性HER2陰性早期乳癌において、乳癌組織を用いて晩期再発や予後に関する因子を検討した。閉経後症例において、PIK3CA mutant症例はwild type症例と比較して有意に無再発生存期間が長かった。AKTセリン473リン酸化低発現症例は高発現症例に比べて有意に無増悪生存期間が長く、ER セリン167リン酸化高発現症例は低発現症例に比べて有意に無増悪生存期間が長かった。閉経後ER陽性HER2陰性早期乳癌においてPIK3CA遺伝子変異とAKTセリン473およびER セリン167のリン酸化は予後に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン受容体陽性乳癌では初回治療後5年以降に再発(晩期再発)する症例が存在する。晩期再発乳癌は増殖が遅く培養細胞が樹立できず、晩期再発のメカニズムは未だ解明されていない。本研究で晩期再発乳癌に特徴的な乳癌組織における遺伝子変異および遺伝子発現を同定することにより、晩期再発のメカニズムの解明に繋がり、新たな治療戦略をもたらす。晩期再発乳癌の予後予測因子の同定により、術後長期の内分泌療法の適応症例が明確となる。

研究成果の概要(英文)： PIK3CA is the most frequent mutated gene in estrogen receptor (ER)-positive early breast cancers, and PIK3CA mutation status is reported to affect activation of AKT and ER . PIK3CA mutations were detected in 47% in premenopausal women and 47% in postmenopausal women. Postmenopausal women with PIK3CA wild-type tumors had significantly worse disease-free survival than patients with PIK3CA mutant tumors. Low levels of phosphorylation of AKT serine (Ser) 473 (AKT phospho-Ser473) and high levels of ER Ser167 (ER phospho-Ser167) were strongly associated with increased disease-free survival in postmenopausal women. Evaluation of ER activation, in addition to PIK3CA mutation status, might be helpful in identifying patients who are likely to benefit from endocrine therapy alone versus those who are not in postmenopausal ER-positive early breast cancer.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 トランスレーショナルリサーチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

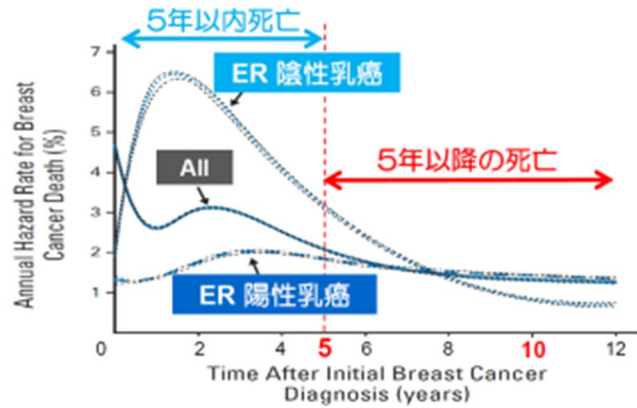
1. 研究開始当初の背景

日本および世界の乳癌において、その約 8 割は女性ホルモン依存性に進展するエストロゲン受容体(estrogen receptor: ER)陽性乳癌である。乳癌には手術などの初回治療後、5 年以降に再発(晩期再発)する症例が存在する。晩期再発をきたす乳癌のほとんどは ER 陽性乳癌であり、ER 陽性乳癌の再発症例の約 4 割は晩期に再発する。長期(10 年間)の術後内分泌療法により晩期再発が抑制されることが、最近の大規模臨床試験により検証されている。

晩期再発乳癌は増殖が遅く培養細胞が樹立されていないため基礎研究がなされておらず、晩期再発のメカニズムは未だ解明されていない。実際の症例を用いた検討が必要である。

米国の臨床試験グループ(ALLIANCE)は、ER 陽性乳癌の晩期再発のメカニズムの解明を乳癌の Unmet Needs の第 1 位にランクしている。日本人女性で急増している ER 陽性乳癌において、晩期再発乳癌の予後予測因子の同定が急務であり、実際の症例を用いた検討が必要である。

乳癌診断時からの死亡の危険率の年次推移



2. 研究の目的

エストロゲン受容体(ER)陽性 HER2 陰性早期乳癌において、乳癌原発巣の遺伝子発現、遺伝子変異を解析して、臨床病理学的因子、予後との相関を検討することにより、晩期再発乳癌に特徴的な遺伝子群を同定する。

3. 研究の方法

手術で切除したホルマリン固定パラフィン包埋乳癌組織を用いて下記を検討した。

- (1) ER セリン 167 リン酸化: 免疫組織化学法
- (2) AKT セリン 473 リン酸化: 免疫組織化学法
- (3) アンドロゲン受容体(AR)の発現: 免疫組織化学法
- (4) ビタミン D 受容体(VDR)の発現: 免疫組織化学法
- (5) PIK3CA 遺伝子変異: DNA sequencing
- (6) 遺伝子発現プロファイル: mRNA マイクロアレイ
- (7) TP53 遺伝子変異: direct sequencing
- (8) HER2 遺伝子増幅: in situ hybridization
- (9) 腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL): HE 標本

4. 研究成果

- (1) ER セリン 167 リン酸化
- (2) AKT セリン 473 リン酸化
- (3) アンドロゲン受容体(AR)の発現
- (4) ビタミン D 受容体(VDR)の発現
- (5) PIK3CA 遺伝子変異

ER 陽性 HER2 陰性、浸潤性乳管癌 214 例(閉経前 62 例、閉経後 152 例)を対象とした検討において、PIK3CA 遺伝子変異陽性(mutant)は閉経前 29 例(47%)、閉経後 71 例(47%)と高頻度に認められた。中でもキナーゼドメイン内の H1047 の変異を最も高頻度に認めた(閉経前 17 例、閉経後 38 例)。AKT セリン 473 リン酸化は閉経前症例において閉経後症例より有意に高発現していた。

閉経後症例において、PIK3CA mutant 症例は wild type 症例と比較して有意に無再発生存期間が長かった($P = 0.007$)。AKT セリン 473 リン酸化は 170%、ER セリン 167 リン酸化は 15%を閾値とすると、AKT セリン 473 リン酸化低発現症例は高発現症例に比べて有意に DFS が長く($P = 0.007$)、ER セリン 167 リン酸化高発現症例は低発現症例に比べて有意に DFS が長かった($P = 0.0016$)。PIK3CA wild type 症例において、AKT セリン 473 リン酸化低発現/ER セリン 167 リン酸化高発現群が最も予後良好、AKT セリン 473 リン酸化高発現/ER セリン 167 リン酸化低発現群が最も予後不良であった。PIK3CA mutant 例においては AKT セリン 473 リン酸化低発現/ER セリン 167 リン酸化低発現群のみ再発していた。アンドロゲン受容体、ビタミン D 受容体の発現と予後には関連を認めなかった。以上より、閉経後 ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌において PIK3CA 遺伝子変異と AKT セリン 473 および ER セリン 167 のリン酸化は予後に関与すると考えられた

(Ishida N, Yamashita H, et al: PIK3CA mutation, reduced AKT serine 473 phosphorylation, and increased ER serine 167 phosphorylation are positive prognostic indicators in postmenopausal estrogen receptor-positive early breast cancer. Oncotarget 9: 17711-17724, 2018)。

(6) 遺伝子発現プロファイル解析

ER 陽性 HER2 陰性乳癌の晩期再発症例と 10 年以上無再発症例において、ホルマリン固定パラフィン包埋乳癌組織より RNA を抽出して、mRNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現プロファイルを比較した。晩期再発症例と無再発症例とで発現に差のある遺伝子を抽出、晩期再発乳癌の予測因子の候補である遺伝子を同定して特許出願を行った。

今後、これまで抽出した晩期再発症例と無再発症例とで発現に差のある遺伝子について、パスウェイ解析などを行い、特に重要と考えられる遺伝子を絞り込む。その中で、市販抗体がある遺伝子の蛋白発現を乳癌組織（晩期再発症例と無再発症例）において免疫組織化学法で検討する。

また、再発巣がある症例については、再発巣と原発巣を用いた網羅的遺伝子変異解析（遺伝子パネルを用いる）を予定している。

(7) TP53 遺伝子変異

(8) HER2 遺伝子増幅

ER 陽性 HER2 陰性乳癌の早期（手術後 5 年以内）再発症例（27 例）と無再発症例（29 例）において、ホルマリン固定パラフィン包埋乳癌組織より DNA を抽出して TP53 遺伝子変異を検討した。また、乳癌組織の薄切切片を用いて HER2 遺伝子増幅を検討した。HER2 遺伝子増幅は早期再発乳癌 27 例中 4 例（15%）に認められた。無再発症例には認めなかった。TP53 遺伝子変異は検討し得た 53 例中、7 例が 1 か所、3 例が 2 か所、3 例が 3 か所に認められた。すべての変異は異なった部位に認められた。

HER2 遺伝子増幅または TP53 遺伝子変異を認めた早期再発症例は、再発後生存期間が短かった (Yamashita H, et al: HER2 gene amplification in ER-positive HER2 immunohistochemistry 0 or 1+ breast cancer with early recurrence. Anticancer Res 40: 645-652, 2020)。

(9) 腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte ; TIL)

ER 陽性 HER2 陰性乳癌の早期再発症例（184 例）と晩期再発症例（134 例）、10 年以上無再発症例（321 例）において、乳癌組織の HE 標本で腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を評価した。早期再発症例は無再発症例に比べて TIL が高かった。TIL の発現は、リンパ節転移陽性、ER 低発現、プロゲステロン受容体低発現、グレード、Ki67 ラベリングインデックスと相関していた。再発例において、TIL 高発現群は再発後生存期間が短かった (Miyoshi Y, Yamashita H, et al: Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. Oncol Lett 17:2177-2186, 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishida N, Baba M, Hatanaka Y, Hagio K, Okada H, Hatanaka K C, Togashi K, Matsuno Y, Yamashita H	4. 巻 9
2. 論文標題 PIK3CA mutation, reduced AKT serine 473 phosphorylation, and increased ER serine 167 phosphorylation are positive prognostic indicators in postmenopausal estrogen receptor-positive early breast cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 17711-17724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R, Horimoto Y, Masuda N, Yasojima H, Inao T, Osako T, Takahashi M, Tomioka N, Wanifuchi-Endo Y, Hosoda M, Doihara H, Yamashita H	4. 巻 17
2. 論文標題 Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 2177-2186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.9853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita H, Ishida N, Hatanaka Y, Hagio K, Oshino T, Takeshita T, Kanno-Okada H, Shimizu AI, Hatanaka KC, Matsuno Y	4. 巻 40
2. 論文標題 HER2 gene amplification in ER-positive HER2 immunohistochemistry 0 or 1+ breast cancer with early recurrence.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 645-652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田直子、畑中豊、馬場基、岡田宏美、萩尾加奈子、笠原里紗、畑中佳奈子、松野吉宏、山下啓子
2. 発表標題 ER陽性HER2陰性乳癌早期再発症例におけるTP53遺伝子変異、HER2遺伝子増幅の検討
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山下啓子（分担執筆）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 858
3. 書名 日本臨牀 第76巻・第5号	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 乳癌の晩期再発リスクを評価する方法及びキット	発明者 北海道大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-070024	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬場 基 (Baba Motoi) (90724980)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	