

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18590348  
 研究課題名 (和文)：ホルモン非依存性乳癌の細胞増殖機序解明 (ER 陰性 HER2 陰性乳癌と転写因子異常)  
 研究課題名 (英文)：A analysis for the cell proliferation mechanisms of hormone independent breast cancers. ER negative and HER2 negative breast cancers and transcriptional factors.  
 研究代表者：梅村 しのぶ (UMEMURA SHINOBU)  
 東海大学・医学部・准教授  
 研究者番号：20276794

## 研究成果の概要：

Estrogen receptor  $\alpha$ (ER $\alpha$ )および human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) いずれも陰性の乳癌について検討し、細胞周期関連転写因子 E2F の高発現が認められることを明らかにした。E2F-5 遺伝子変異 (E2F-5 遺伝子点突然変異解析、E2F-5 遺伝子増幅) の有無について検討し、E2F-5 陽性乳癌の臨床病理学的特徴を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

## 研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：乳癌，細胞増殖，ER 陰性，HER2 陰性，転写因子，E2F-5

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌において、ホルモン受容体とくに estrogen receptor  $\alpha$ (ER $\alpha$ ) と human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) は、代表的な細胞の分化増殖調節因子であり、また多くの治療薬開発の標的分子である。一方、乳癌の約 20% を占める ER $\alpha$ 、HER2 いずれも陰性の乳癌は予後不良である。これらの症例に対する治療は一般的な化学療法剤であり、分子標的薬剤の開発や新たな治療戦略の展開は見られていない。また、ER $\alpha$  陰性・HER2 陰性乳癌

は、他群の乳癌に比較し細胞増殖マーカー (Ki-67 labeling index (LI)) が高く、ER $\alpha$  や HER2 を介さない細胞増殖機構が存在することは確実であるが、その詳細は明らかになっていない。ER $\alpha$  陰性・HER2 陰性乳癌の細胞増殖機構に関する研究は、生物学的意義のみならず新たな治療法開発に寄与しうる重要な課題である。われわれは、基盤研究(C) 平成15~17年度「ホルモン非依存性(ER陰性/HER2陰性)乳癌の生物学的特性に関する研究—特異的細胞増殖機構の解明について—」の研究成果として、ER $\alpha$

陰性・HER2陰性乳癌における転写因子E2F-5の高発現を明らかにしてきている。

## 2. 研究の目的

期間内における目的は、ER $\alpha$ 陰性・HER2陰性乳癌の細胞増殖機構に、とくに細胞周期関連転写因子E2Fの異常がどのように関与しているかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト乳癌組織を用いた観察的検討

- ① E2Fの遺伝子異常検出: direct sequence法による点突然変異解析およびFISH法による遺伝子増幅の検出
- ② E2F-5蛋白複合体を形成蛋白 (DP1,2, Rb, p107, p130など)の異常検出
- ③ ヒト乳癌培養細胞、初代培養細胞を用いた、Ki-67 LIと細胞増殖速度との関連性

### (2) (1)の検討で明らかになったE2F-5遺伝子、あるいは複合体形成蛋白の異常が、ER $\alpha$ 陰性・HER2陰性乳癌の細胞増殖調節破綻に関与していることを証明する。

- ① E2F-5 mutant遺伝子導入: E2F-5蛋白の細胞内局在の変化、細胞周期との関係についての解析

以上の研究計画により、ER $\alpha$ 陰性・HER2陰性乳癌における転写因子E2F-5の異常が明らかになり、細胞増殖調節の破綻への関与が証明されると考えた。

## 4. 研究成果

### (1) E2F-5遺伝子異常の有無

- ① E2F-5遺伝子点突然変異解析: ヒト乳癌組織からDNAを抽出し、E2F-5 (Accession No. 278409) Exon 1-8について設計されたprimerを用いPCR法により増幅した。得られた産物について塩基配列を解析した。Exon 1にsilence mutation(A44A)および Exon 6 - 7にsplicing variant (A295 delition)が確認された。
- ② E2F-5遺伝子増幅の有無: E2F-5 BAC cloneおよび nick translation kitを用いて、E2F-5 FISH probeを作成し、FISH法による遺伝子増幅を検索した。乳癌43症例中5例にE2F-5遺伝子増幅が確認され、2例には c-myc geneの co-amplificationが確認された (図参照)。

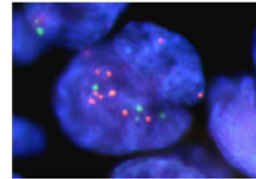
### (2) ヒト乳癌培養細胞株を用いた検討

- ① ER陽性細胞 (MCF-7), ER陰性細胞 (MDA-MB231, Hs578T)を細胞周期を同調

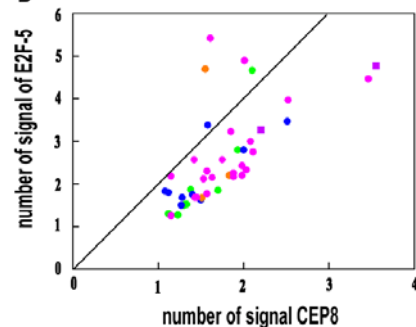
させて培養し、核および細胞質内のE2F-5蛋白量を解析した。いずれの培養細胞株においても、G1期において E2F-5蛋白量が多く、S期において低下する傾向が確認された。

- ② E2F-5の細胞内局在を細胞周期関連蛋白発現状況 (Ki-67, cyclin B1)との関連において観察した。E2F-5はG0期において核に陽性となったが、G0以外では細胞質に陽性所見を示した。

A



B



### (3) E2F-5陽性乳癌の臨床病理学的特徴 (表参照)

- ① 正常組織におけるE2F-5陽性細胞の分布は、平滑筋細胞 (腸管壁)、気管支軟骨細胞、円柱上皮 (胃、結腸、膵管上皮、胆嚢上皮、乳腺)、扁平上皮細胞であった。
- ② 細胞内陽性局在は、平滑筋細胞の一部と、授乳期乳腺細胞で核内であったが、その他の正常細胞および乳癌細胞においては、細胞質内が多かった。
- ③ E2F-5陽性乳癌は、TNBC (ER/PgR/HER2陰性乳癌), BLBC(basal-like breast cancer) に高頻度に見られること。
- ④ E2F-5陽性乳癌はKi-67 labeling indexが高いこと。
- ⑤ E2F-5陽性乳癌は、リンパ節陰性群について再発症例が多いこと。

が明らかになり、これらの内容について論文投稿し掲載された (Umamura S, et al. *B r. J. Cancer* 100; 764-771, 2009)。

Clinicopathological features of E2F-5-positive breast cancers.

	E2F-5		p-value
	positive n=19	negative n=38	
Tumor size			N.S
T1	9	17	
T2	7	14	
T3	3	6	
Lymph node metastasis			N.S
Absent	6	15	
Present	13	23	
Histological grade			0.049
I	0	6	
II	6	21	
III	13	11	
Estrogen receptor			0.039
Positive	3	16	
Negative	16	22	
Progesterone receptor			0.010
Positive	2	17	
Negative	17	21	
HER2			N.S
Positive	5	14	
Negative	14	24	
Pathological characteristics			
TNBC	14	13	0.0049
non-TNBC	5	25	
BLBC	14	11	0.0012
non-BLBC	5	27	
Apocrine ca	1	3	N.S
Metaplastic ca	4	0	0.0034
Ki-67 labeling index (%)	59.5 ± 20.4	36.3 ± 26.3	0.001

TNBC ; triple negative breast cancer (ER/PgR/HER2 negative)

BLBC ; basal-like breast cancer

#### (4) ER $\alpha$ 陰性・HER2陰性乳癌のシグナル伝達の特徴

- ER $\alpha$ 陰性・HER2陰性乳癌においては、他群に比較してAktのリン酸化が有意に高い症例群があることが明らかになり、免疫組織化学的にも確認された(Cancer Science 98; 1889-2283, 2007) (知的財産所有権を出願し、国内外ともに手続きが完了した)。

これらの結果から明らかになったことは、第一に転写因子 E2F-5 遺伝子自体に有意な点突然変異はなかったこと(結果(1)①)、また、遺伝子増幅が確認されたが、必ずしも ER $\alpha$ 陰性・HER2 陰性乳癌に限定した異常ではなかったこと(結果(1)②)から、E2F-5 遺伝子自体の異常が、ER $\alpha$ 陰性・HER2 陰性乳癌の Ki-67 LI 高値の直接の原因となっている可能性は低いと考えられた。次に、乳癌における E2F-5 細胞内局在が、細胞質であったこと(結果(3)①②)については、E2F-5 が G0 期において核内で機能する蛋白であること(結果(2)②)と、ER $\alpha$ 陰性・HER2 陰性乳癌では G0 期(Ki-67 陰性)の癌細胞が少ないことから、E2F-5 蛋白の機能異常というよりは、細胞周

期を反映する所見と考えられた。しかしながら、ER $\alpha$ 陰性・HER2 陰性乳癌においては、E2F-5 の高発現が確認されていることから、何らかの転写促進因子が存在することは確実であろう。E2F-5 転写促進因子が、高度な細胞増殖活性の原因か結果か、G0 期への移行障害の可能性はないか、また、mesenchymal epithelial transition との関連性など、細胞の分化と増殖の分岐点における調整機序解明という重要な意義を有する課題として、継続して研究を進める。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- Umemura S, Shirane M, Takekoshi S, Kusakabe T, Itoh J, Egashira N, Tokuda Y, Mori K, and Osamura RY. (2009) Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome. *Br J Cancer* 100: 764-771 (査読有)
- Umemura S, Osamura RY, Akiyama F, Honma K, Kurosumi M, Sasano H, Toyoshia S, Tsuda H, Ruschoff J, Sakamoto G. (2008) What causes discrepancies in HER2 testing for breast cancer?: An Japanese ring study in conjunction with global standard. *Am J Clin Pathol*. 130: 883-891 (査読有)
- Izumi M, Xiaoyan T, Chiu C-S, Nagai T, Matsubayashi J, Iwaya K, Umemura S, Tsuboi R, Mukai K. (2008) Ten cases of sebaceous carcinoma arising in nevus sebaceous. *J Dermatol*. 35; 704-711 (査読有)
- Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T. (2008) Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor. *Eur Urol*. 55; 441-451 (査読有)
- Itoh H, Miyajima Y, Umemura S, Osamura RY. (2008) Lower HER2/CEP17 ratio in cytologic HER2 FISH for breast cancers: Three dimensional analysis of intranuclear localization of centromere 17 and HER2 signals. *Cancer Cytopathol* 113: 134-140 (査読有)
- Hirabayashi K, Yasuda M, Umemura S, Itoh H, Itoh J, Yazawa N, Imaizumi T, Osamura Y. (2008) Cytological features of the cystic fluid

- of pancreatic schwannoma with cystic degeneration. *J Pancreas.* 9; 203-208 (査読有)
7. Umemura S, Yoshida S, Ohta Y, Naito K, Osamura Y, Tokuda Y (2007) Increased phosphorylation of Akt in triple negative breast cancers. *Cancer Science*; 98: 1889-1892 (査読有)
  8. Fischer A, Stuckas H, Gluth M, Russel TD, Rudolph MC, Beeman NE, Bachmann S, Umemura S, Ohashi Y, Neville MC, Theuring F. (2007) Impaired tight junction sealing and precocious involution in mammary glands of PKN1 transgenic mice. *J Cell Science*; 120: 2272-2283 (査読有)
  9. Inomoto C, Umemura S, Egashira N, Minematsu T, Takekoshi S, Itoh Y, Itoh J, Taupenot L, O'Connor D T, Osamura RY. (2007) Granulogenesis in Non-neuroendocrine COS-7 Cell Induced by EGFP-tagged Chromogranin A Gene Transfection: Identical and Distinct Distribution of CgA and EGFP. *J Histochem Cytochem*; 55:487-493 (査読有)
  10. Kitano Y, Umemura S, Ohbayashi H, Takenaga M, Osamura RY. (2007) Assessment of a New Anti-HER2 Monoclonal Antibody, SV2-61y: A Best Concordance with HER2 FISH. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15: 389-393 (査読有)
  11. Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M, T Moriya, T Oyama, H Yamashita, Y Umekita, Y Komoike, C Shimizu, H Fukushima, H Kajiwara, F Akiyama (2007) Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical stainings. *Am J Clin Pathol* 127:1-10 (査読有)
  12. Inomoto C, Umemura S, Sasaki Y, Yasuda M, Terachi T, Osamura RY. (2007) Renal cell carcinoma arising in a long pre-existing angiomyolipoma. *Pathol Int*; 57:162-166 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Umemura S, et al. E2F-5 overexpression in ER negative and HER2 negative breast cancers. AACR Advances in Breast Cancer Research: Genetics, Biology, and Clinical Applications. 2007. 10. 17. SanDiego

2. 梅村しのぶ他. 転写因子E2F-5 の正常組織における分布およびE2F-5 陽性乳癌の臨床病理学的特徴. 第 15 回 日本乳癌学会学術総会. 2007. 6. 30. 横浜
3. 梅村しのぶ他. 浸潤部ER陰性乳癌周囲の乳管内ER陽性癌細胞の発現形質について. 第 96 回日本病理学会総会. 2007. 3. 15. 金沢
4. 梅村しのぶ他. ER陰性・HER2 陰性乳癌における細胞増殖関連遺伝子発現について. 第 14 回日本乳癌学会学術総会. 2006. 7. 7. 金沢
5. 梅村しのぶ他. Estrogen receptor  $\alpha$  陰性 / Human epidermal growth factor receptor-2 陰性乳癌の細胞増殖分化の特性. 第 52 回日本病理学会秋期特別総会. 2006. 11. 24. 和歌山
6. 梅村しのぶ他. ER陰性・HER2 陰性乳癌のマイクロアレー遺伝子発現解析について. 第 95 回日本病理学会総会. 2006. 5. 2. 東京

[図書] (計 2 件)

1. 梅村しのぶ他. 乳腺病理カラーアトラス (土屋眞一、秋山太、森谷卓也編) 文光堂. 東京 2007: 50-53. 70-71.
2. 梅村しのぶ他. 乳腺細胞診カラーアトラス—乳癌取り扱い規約「細胞診報告様式」に準拠—(土屋眞一編). 医療科学社. 2007: 92-93, 98-99.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ER陰性およびHER2陰性である乳癌の予防または治療剤およびそのスクリーニング法

発明者: 梅村しのぶ、徳田裕、吉田聖、大田義一

権利者: 学校法人東海大学、武田薬品工業株式会社

種類: T-1263

番号: 特願 2008-534425,  
PCT-JP2007/068482

出願年月日: 2007/09/14

国内外の別: 国内および国際

○取得状況 (計 1 件)

同上

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 しのぶ (UMEMURA SHINOBU)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：20276794

(2) 研究分担者

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：70216878

(2007年まで)

徳田 裕 (TOKUDA YUTAKA)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：20163975

(2007年まで)

長村 義之 (OSAMURA YOSHIYUKI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：10100992

(2007年まで)

(3) 連携研究者

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：70216878

(2008年)

徳田 裕 (TOKUDA YUTAKA)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：20163975

(2008年)

長村 義之 (OSAMURA YOSHIYUKI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：10100992

(2008年)