

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501055

研究課題名（和文） 生存増殖シグナル伝達系における乳癌のプロファイリング解析研究

研究課題名（英文） Extensive analysis of signaling pathways in breast cancer-proposal of a new classification based on activity of signaling pathways

研究代表者

堀井 理絵（HORI RIE）

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・研究員

研究者番号：20446272

研究成果の概要（和文）：

生存増殖シグナル伝達経路の異常な活性化は癌化の一因であり、現在、この経路を阻害する抗がん剤が複数開発されている。我々は、338例の浸潤性乳癌を対象にシグナル伝達経路の6因子（p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1, p-MAPK/ERK）を免疫組織化学的に検索し、その結果を用いて、乳癌の新分類を作成した。新分類は、既知の臨床病理学的因子と有意に関連していた。新分類は、個々の乳癌におけるシグナル伝達経路の活性化状況を反映しており、シグナル伝達経路を阻害する新規抗がん剤の適応決定に有用な可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The activation of proliferative signaling pathways is one of the causes of carcinogenesis and several drugs interfering with these pathways are currently being developed. We evaluated 338 invasive breast cancer patients by focusing attention on six factors, p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1 and p-MAPK/ERK, in the signaling pathways. These factors were immunohistologically examined and using those results a new breast cancer classification was devised. The new classification was significantly related to conventional clinicopathological characteristics. This classification reflects the activation status of the signaling pathways and useful for selection of newly developed drugs that interfere with signaling pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学 臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

発生過程や正常組織における細胞の生死は、生存増殖シグナルとアポトーシスシグナ

ルのバランスにより厳密に制御されており、このことは生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。生存増殖シグナルの異常な

活性化は癌化の一因であり、現在、生存増殖シグナルの伝達阻害を作用機序とした複数の分子標的抗がん剤が開発中である。一方、乳癌は、バイオマーカによる薬物療法の個別化が最も普及している癌種である。内分泌療法の効果予測因子であるホルモン受容体

(HR) と HER2 標的治療薬の効果予測因子である Human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) を組み合わせたサブタイプ分類は、浸潤性乳癌における薬物療法の適応決定に有用で、日常診療で広く用いられている。今後、多数臨床応用されるであろうシグナル伝達経路阻害薬による治療戦略を考えるうえで、シグナル伝達系の活性化状況を広く把握することは非常に重要であり、その情報に基づいた新分類を構築することは臨床的に意義深い。

## 2. 研究の目的

シグナル伝達系に関与するバイオマーカを用いた新分類を確立することを目的に、多数の乳癌症例を対象に複数のシグナル伝達系に関与する因子の発現状況を検索し、その臨床病理学的な意義を検討した。

## 3. 研究の方法

### 対象

1996年に当院で手術を施行された原発性乳癌 578 例から、非浸潤癌、Stage IV 症例、両側乳癌、一側多発癌、術前薬物療法施行例を除外した浸潤性乳管癌 338 例を本研究の対象とした。観察期間の中央値は 11 年 4 か月 (10 か月 - 15 年 5 か月) であった。原発巣代表切片でシグナル伝達系に関与する 6 つの因子 (p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1, p-MAPK/ERK) を検索し、それらと予後との関係を解析した。次に、6 つの因子の発現状況を用いて対象例を亜分類し、その亜分類と臨床病理学的因子との関連を検討した。

### 標本作成とその評価

手術標本の原発巣を代表するホルマリン固定パラフィンブロックから厚さ 4 μm の連続切片を 10 枚薄切し、それらを用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1, p-MAPK/ERK, エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、HER2 の免疫染色を行った。

HE 染色標本では、癌の組織型と癌細胞の核グレードを評価した。癌の組織型は、浸潤癌巣の大きさや構築により、乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌に分類した。すなわち、乳頭腺管癌：浸潤癌巣が大きく、その中に乳頭状構造や腺腔形成がみられるもの、充実腺管癌：浸潤癌巣が大きく充実性のもの、硬癌：浸潤

癌巣が小さく、周囲に線維の増生を伴うものである。核グレードは、核異型度と核分裂像をそれぞれ 3 段階に評価し、その合計点で判定した。異型の弱いほうから順に、Grade 1, 2, 3 である。

p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1, p-MAPK/ERK の免疫染色は、研究用に市販されている抗体と自動染色装置 (Autostainer; Dako Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。これらのバイオマーカは、浸潤癌における染色強度と陽性細胞の割合とを加味した染色スコアで評価した。すなわち、染色強度は、0：陰性、1：弱陽性、2：中等度陽性、3：強陽性に、陽性細胞の割合は、0：0%、1：10%未満、2：10%以上 50%未満、3：50%以上にそれぞれ分類し、それらの合計点 (0, 2-6) を染色スコアとした。

ER, PgR の免疫染色は、ER 抗体: clone 1D5 (Dako Japan Inc.), PgR 抗体: clone PgR636 (Dako Japan Inc.) と自動染色装置 (Autostainer; Dako Japan Inc.) を用い、抗体の添付文書に厳密に従った方法で行った。ER, PgR の判定基準は、癌巣全体に対する陽性細胞の割合が 10%以上を陽性、10%未満を陰性とした。HR 陽性は、ER, PgR いずれか少なくとも一方が陽性のものとした。

HER2 は、まず、免疫組織化学的にタンパク発現を検索し、0, 1+, 2+, 3+に分類した。HER2 の免疫染色は、染色キット: Hercep Test™ (Dako Japan Inc.) と自動染色装置 (Autostainer; Dako Japan Inc.) を用い、染色キットの添付文書に厳密に従った方法で行った。HER2 タンパク発現が 2+であった症例には、FISH 法による HER2 遺伝子検査を追加し、遺伝子増幅の有無を検索した。HER2 の FISH 法は、バスビジョン HER2-DNA プロブキット (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) を用いて行った。タンパク発現、遺伝子検査いずれも、ASCO/CAP の HER2 検査に関するガイドラインに従って評価した。HER2 タンパク 3+または HER2 遺伝子増幅ありを HER2 陽性、それ以外を HER2 陰性と判定した。

HR と HER2 の診断結果により、Luminal subtype: HR(+) and HER2(-)、Luminal HER2 subtype: HR(+) and HER2(+), HER2 enriched subtype: HR(-) and HER2(+), Triple negative subtype: HR(-) and HER2(-) の 4 つに分類した。

### 臨床情報の収集

全ての症例のカルテを見直し、臨床情報を収集した。

### シグナル伝達経路 6 因子と予後との関連

p-AKT, Cyclin D1, P27, p-p70S6K, p-4EBP1, p-MAPK/ERK それぞれの染色強度・陽性細胞の

割合・染色スコア、手術時年齢、閉経状況、TNM 臨床病期分類、リンパ節転移の有無、癌の組織構築、癌細胞の核グレード、HR と HER2 によるサブタイプ、術後化学療法の有無、術後内分泌療法の有無と予後（再発の有無、生死）との関連を検討した。

#### クラスタリング分類

p-AKT、Cyclin D1、P27、p-p70S6K、p-4EBP1、p-MAPK/ERK の染色スコアを標準化し、その値を用いてクラスタリング解析を行い、対象例を亜分類した。このクラスタリング分類と手術時年齢、閉経状況、TNM 臨床病期分類、リンパ節転移の有無、癌の組織構築、癌細胞の核グレード、HR と HER2 によるサブタイプ、再発の有無、生死との関連を検討した。

#### 統計解析

シグナル伝達経路に関与する因子と予後との関連は、最初に、全ての因子と予後との関連を Cox 単回帰分析で検討した。次に Cox 単回帰分析で有意であった因子のすべての組み合わせで多変量解析を行い、Akaike's information criterion (AIC) が最小のモデルを多変量解析での最終結果として採用した。クラスタリング分類と臨床病理学的因子との関連は、ヒートマップ解析で検討した。有意差は、 $\chi^2$ 法、Fisher 法、ログランク法を用いて検定した。いずれも有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

##### 結果

##### 対象症例の特性

対象症例の手術時年齢は平均 53.1 (24-84) 才、TNM 臨床病期分類は Stage I: 108 例 (32%)、Stage II: 186 例 (55%)、Stage III: 44 例 (13%) であった。癌の組織型は、乳頭腺管癌: 57 例 (17%)、充実腺管癌: 111 例 (33%)、硬癌: 170 例 (50%) で、核グレードは、Grade 1: 191 例 (57%)、Grade 2: 78 例 (23%)、Grade 3: 69 例 (20%) であった。リンパ節転移は、なしが 187 例 (55%)、ありが 151 例 (45%) で、術前の超音波検査で転移なしと診断され腋窩郭清を行わなかった 2 例は、リンパ節転移なしに分類した。HR 陽性率は 68%、HER2 陽性率は 18% で、HR と HER2 を組み合わせたサブタイプの内訳は、Luminal subtype: 211 例 (62%)、Luminal HER2 subtype: 19 例 (6%)、HER2 enriched subtype: 42 例 (12%)、Triple negative subtype: 66 例 (20%) であった。術後に内分泌療法が施行された症例は 124 例 (37%) で、その大部分がタモキシフェンの単独投与であった。術後に化学療法が施行された症例は 152 例 (45%) で、そのうち多くの症例で、アンスラサイクリン系薬剤あるいはメトトレキセートを含む多剤併用療法が

施行されていた。術後に HER2 標的治療薬が投与された症例はない。粗再発率は 23%、粗死亡率は 22% である。再発の有無が確認できなかった死亡例が 1 例認められた。

#### シグナル伝達経路 6 因子の染色スコア

図 1 にシグナル伝達系に関与する 6 因子の染色スコアを示す。染色スコア 5 または 6 と判定された症例の割合は、それぞれ、p-AKT: 74%、Cyclin D1: 12%、P27: 53%、p-p70S6K: 37%、p-4EBP1: 19%、p-MAPK/ERK: 3% であった。

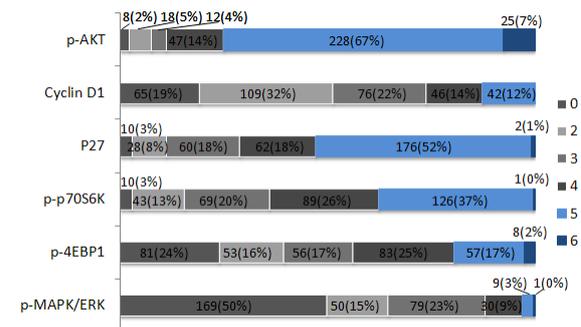


図 1 シグナル伝達経路 6 因子の染色スコア

#### シグナル伝達経路 6 因子と予後との関連

Cox 単回帰分析で再発の有無と有意な関連がみられた因子は、P27 の染色強度 (Relative Risk (RR)=0.57, P=0.003)・陽性細胞の割合 (RR=0.74, P=0.016)・染色スコア (RR=0.80, P=0.004)、p-p70S6K の染色強度 (RR=0.56, P=0.003)・陽性細胞の割合 (RR=0.66, P<0.001)・染色スコア (RR=0.75, P<0.001)、p-MAPK/ERK の染色強度 (RR=0.77, P=0.041)・陽性細胞の割合 (RR=0.64, P=0.014)・染色スコア (RR=0.84, P=0.021)、手術時年齢 (RR=0.97, P=0.014)、TNM 臨床病期分類 (I vs. II: RR=3.18, P=0.002; I vs. III: RR=21.1, P<0.001)、リンパ節転移 (RR=3.30, P<0.001)、HR と HER2 によるサブタイプ (RR=1.36, P<0.001)、術後化学療法の有無 (RR=3.17, P<0.001) であった。多変量解析で再発の有無と有意に関連していたのは、p-p70S6K 染色スコア (RR=0.84, P=0.027)、手術時年齢 (RR=0.98, P=0.042)、TNM 臨床病期分類 (I vs. II: RR=2.56, P=0.011; I vs. III: RR=5.81, P<0.001)、リンパ節転移 (RR=2.25, P=0.002) であった。

Cox 単回帰分析で生死と有意な関連がみられた因子は、TNM 臨床病期分類 (I vs. II: RR=2.92 P=0.004; I vs. III: RR=22.3, P<0.001)、リンパ節転移 (RR=2.28, P<0.001)、組織型 (RR=1.47, P=0.024)、核グレード (RR=1.33, P=0.037)、HR と HER2 によるサブタイプ (RR=1.26, P=0.009)、術

後化学療法の有無 (RR=1.95, P=0.005) であった。シグナル伝達経路の因子をカテゴリごとに細かく検討すると、p-4EBP1の染色スコア0と3の間 (RR=2.02, P=0.044)、p-MAPK/ERKの陽性細胞の割合0%と10-50%の間 (RR=0.25, P=0.045) に有意差が認められた。多変量解析で生死と有意に関連していたのは、TNM臨床病期分類 (I vs. II: RR=2.57, P=0.011; I vs. III: RR=8.29, P<0.001)、組織型 (RR=1.44, P=0.041) であった。

### クラスタリング分類

再発の有無が不明の1例を除く337例でクラスタリング解析を行った。337例は、133例のグループ1と204例のグループ2に分類された (図2)。

クラスタリング分類と有意な関連がみられた臨床病理学的因子は、HRとHER2を組み合わせたサブタイプ ( $\chi^2$ 検定, P<0.001; Fisher検定, P<0.001)、癌細胞の核グレード ( $\chi^2$ 検定, P<0.001; Fisher検定, P<0.001)、癌の組織型 ( $\chi^2$ 検定, P=0.034; Fisher検定, P=0.034) であった。手術時年齢 ( $\chi^2$ 検定, P=0.252; Fisher検定, P=0.220)、閉経状況 ( $\chi^2$ 検定, P=0.451; Fisher検定, P=0.452)、TNM臨床病期分類 ( $\chi^2$ 検定, P=0.154; Fisher検定, P=0.157)、リンパ節転移の有無 ( $\chi^2$ 検定, P=0.407; Fisher検定, P=0.371)、再発の有無 (ログランク検定, P=0.859)、生死 (ログランク検定, P=0.604) は、いずれもクラスタリング分類との有意な関連はみられなかった。

サブタイプと核グレードのヒートマップ解析結果を図2に示す。HRとHER2を組み合わせたサブタイプのHER2 enriched subtypeとTriple negative subtypeはグループ1に多く、Luminal subtypeとLuminal HER2 subtypeはグループ2に多かった。癌細胞の核グレード3はグループ1に多く、核グレード1はグループ2に多かった。

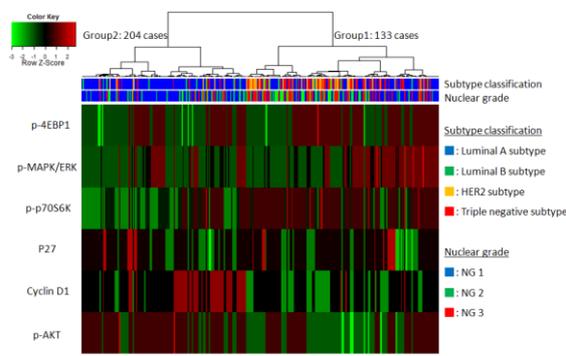


図2 クラスタリング分類とサブタイプ分類、核グレードとの関連

### 結語

本研究では、シグナル伝達系に関与するバイオマーカーを用いた乳癌の亜分類は可能であり、その分類がHRとHER2を組み合わせたサブタイプ分類、核グレード、組織型と関連していることが示された。この新分類はシグナル伝達経路の活性化状況を反映しており、シグナル伝達経路阻害を作用機序とする薬剤の選択に有用で、新時代の乳癌の個別化治療に寄与すると思われる。また、個々の癌においてシグナル伝達経路全体の活性化状況を把握することは、癌細胞の増殖調節機構の解明、薬剤開発の効率化に役立つ可能性がある。

### 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)

[学会発表] (計3件)

堀井理絵, 伊藤良則, 岩瀬拓士, 秋山 太. シグナル伝達経路の活性化状況に基づく乳癌新分類. 第21回日本乳癌学会学術総会 2013.6.27-29 浜松 (厳選講演)

堀井理絵, 秋山 太, 伊藤良則, 岩瀬拓士. 乳癌における生存増殖シグナル伝達系の網羅的解析. 第19回日本乳癌学会学術総会 2011.9.2-4 仙台 (ワークショップ)

堀井理絵, 秋山 太, 矢守隆夫, 伊藤良則, 岩瀬拓士. PI3K阻害剤のバイオマーカーとして期待される pAKTの乳癌における発現率. 第48回日本癌治療学会学術集会 2010.10.28-30 京都 (シンポジウム)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀井 理絵 (HORII RIE)

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・研究員

研究者番号: 20446272

(2) 研究分担者

秋山 太 (AKIYAMA FUTOSHI)

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・臨床病理担当部長

研究者番号: 50222550