

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591910

研究課題名(和文) 乳癌内分泌療法の効果予測を目的とした多遺伝子発現の定量的評価ツールの開発

研究課題名(英文) Development of quantitative evaluation tool using multigene expression to predict efficacy of endocrine therapy for breast cancer

研究代表者

岩瀬 弘敬 (Iwase, Hiroataka)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40211065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌療法はER陽性HER2陰性のLuminal型乳癌の全身治療の中心であるが、特定の症例には化学療法の適用が必要となる。自験の250例を用いて、既知の30遺伝子発現をRT-PCRで解析し、予後予測ツール(Ku-30)を作成した。このツールを2つの他施設で妥当性の検討を行った。

結果では、30遺伝子すべての解析でなくとも4遺伝子と3つの内因性因子を解析することで(Ku-FFPE4)、十分な結果が得られた。また、再発乳癌組織における解析ではKu-FFPE4が低値であることが、内分泌療法単独の効果予測となりうる事が判明した。

研究成果の概要(英文)：In luminal-type breast cancer with ER-positive and HER2 negative, endocrine therapy should be mainly adopted as a systemic therapy. Some selected luminal breast cancer need the chemotherapy. As the test-set, 250 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue treated in our department, 30 gene expressions by real-time PCR method, Ku-30, had been developed. In addition, we studied the usefulness of chemotherapy in other 2 facilities using this Ku-30, it was confirmed the validity. As a result, measuring of all 30 genes has not been required, the RT-PCR assay by four genes and three internal control genes (Ku-FFPE 4) is enough to predict the prognosis of luminal-type breast cancer. Furthermore, in the recurrent cases, it was useful to effect prediction of endocrine therapy alone.

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 予後予測因子 効果予測因子

1. 研究開始当初の背景

乳癌治療においてはエストロゲンレセプター (ER)、HER2 の発現状況により、Luminal A/B 型、HER2 型、Triple Negative (TN) 型のサブタイプに分類され、治療選択に用いられている¹⁾。この分類で重要なのは、Luminal A/B の鑑別である。術後全身治療において、Luminal A では内分泌療法のみが勧められているのに対し、Luminal B では内分泌療法に化学療法を追加することが勧められている。しかしながら、現時点では、その鑑別は、Ki-67 labelling index による増殖能評価を参考としているに過ぎない。

米国においては、Paik らがホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) から RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて 21 遺伝子の発現を定量化し (Oncotype Dx[®]、予後情報から RS (Recurrence Score) を計算し、この score を用いて臨床応用している。一方、Ellis らは同様に数千の遺伝子の中から 50 遺伝子を抽出し、FFPE から RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて intrinsic subtype を確実に判別するツールを開発した (PAM50)。このツールは FDA に承認されている。

2. 研究の目的

前記に示した遺伝子評価ツールはいずれも米国において開発され、対象となった症例も日本人では無い。さらに、検査費も高額であり、容易に検査を行うことが出来ない。そこで、日本人を対象として、効率の良い優れた予後、効果予測ツールが必要と考え、開発を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、OncotypeDx、PAM50 の発現遺伝子を含め、候補を約 30 程度に絞りこんだ上で、連続した乳癌手術症例 300 例の FFPE 乳癌組織から中核下 RNA を test set として、定量的 real-time RT-PCR を用いて定量評価した。各因子の予後因子としての重みづけから、最終的に数個程度の遺伝子を抽出した。

また、Luminal A/B で、内分泌療法のみ行っている症例、化学療法を併施した症例を抽出し、再発・死亡などホルモン療法に抵抗性となった症例と全く再発の見られない症例を導き出し、先に抽出した遺伝子発現量を連続定量的に評価し、Luminal A/B を分別する新しい遺伝子ツールを作成する。また、各因子の遺伝子発現においても詳細に検討することとした。さらに、予後予測ツールを他施設の症例を用いて妥当性の検討も行った。

4. 研究成果

既知の予後因子として重要とされているも

のを抽出し、それぞれの重要度を約 250 の自験例において予後因子の重要性を検討した。

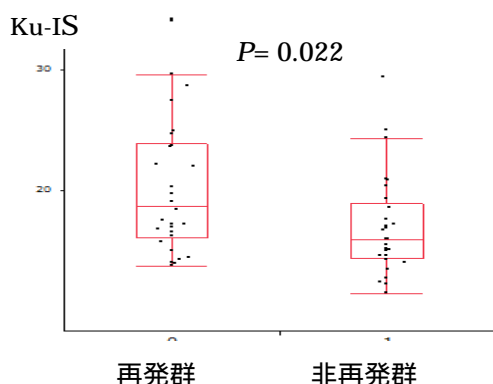
ER	Growth signaling	Proliferation	Invasion /EMT	Angiogenesis	stem cell	survival/apoptosis
ESR1	EGFR	MKI67	MMP11	VEGF-A	ALDH1	Survivin
ESR2	ERBB2	AuroraA	Cathepsin D	HIF1a	CD44	MCL1
PgR	ERBB3	CCNB1	MMP8			BCL2
HDAC6	ERBB4	CCNE1	bcatenin			
SRC1	IGF1R	c-Myc				
AIB1	MELK	FBXW7				
NCOR1	c-Met	E2F1				
FOXA1						
GATA3						

(1) 乳癌組織の FFPE からの RNA 抽出と RT-PCR による定量法の確立を行った。また、ER、PgR、HER2 の mRNA 定量、Ki-67 の mRNA 定量を行った。さらに、この方法を基礎として、IGF1R、HER1-4、Survivin、AuroraA、AR など定量化した。これらはそれぞれが単一項目でも様々な臨床病理学的重要性を持っており、発表をしている。

(2) 自験例の Luminal 型乳癌 160 例を用い、包括的予後予測スコア創出を試みた。無再発生存における多変量解析リスク比を基に月経、腫瘍径、リンパ節転移個数、核グレードを評価した臨床情報スコア (CS)、IHC による ER、PgR、Ki67 の染色陽性率を用いたスコア (IHC3) をそれぞれ算出した。また同患者群の FFPE 検体腫瘍部より抽出した RNA を用い予後規定因子として報告されている 30 遺伝子の mRNA 発現解析を行ったうえ、上位 5 遺伝、BIRC5 (survivin)、CCNB1、CCNE1、MET、VEGF を選出して同様に予後予測 score を作成した (FFPE score; FS)。各 score 単独や各々の組み合わせを比較すると、3 つの score を組み合わせた Integrated Score (IS) は FS を考慮しない群 (CS+IHC3) より更に予後予測能が高いことが示された (IS vs. CS+IHC3; p-value 0.0014 vs. 0.023)。また、IS と CS+IHC3 との間のリスク不一致は 31 例 (22.4%) で、IS の risk と実際の補助療法の乖離が 37 例 (23.1%) にみられており、今後の長期予後解析も重要である。

Cox univariate	χ^2	P	RR	95%CI	
Clinical Score	4.3 9	0.036	1.12	1.01	1.25
IHC3 Score	6.4 5	0.011	1.17	1.04	1.27
CS + IHC3	7.9 4	0.005	1.42	1.01	1.83
Integrated Score	10. 5	0.0012	1.04	1.02	1.07

(3) 他病院での症例に Ku-IS を当てはめると、A,B 病院を合わせた再発例、非再発例において、予後の分離は極めて良好であり、妥当性も確かめられた。



以上、より、Ku-ISs として、ER 陽性 HER2 陰性乳癌における、予後予測ツールの開発が行われた。このアッセイ系は安価であり、比較的短時間に測定できることが利点であるが、さらなる多施設、異なるサブタイプでの検討が必要であると思われた。

< 引用文献 >

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)
全て査読有

Ibusuki M, Fu P, Yamamoto S, Fujiwara S, Yamamoto Y, Honda Y, Iyama K, Iwase H. Establishment of a standardized gene-expression analysis system using formalin-fixed, paraffin-embedded, breast cancer specimens. *Breast Cancer*. 20(2):159-66, 2013

Takeshita T, Omoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H.: Clinical significance of androgen receptor and its phosphorylated form in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 20(5):L15-21, 2013

Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Fu P, Honda Y, Iyama K, Iwase H; Comparison of prognostic values between combined immunohistochemical score of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, Ki-67 and the corresponding gene expression score in breast cancer. *Mod Pathol*. 26(1):79-86, 2013.

[学会発表](計 5 件)

指宿睦子、山本 豊、山本聡子、藤原沙織、村上敬一、岩瀬弘敬：ワークショップ 3 Luminal 型乳癌における包括的予後予測スコア創出の試みとその有用性 第 20 回日本乳癌学会学術総会 2012. 6. 28-30 熊本

山本 豊、指宿睦子、山本聡子、藤原沙織、西山康之、西村令喜、川添 輝、村上敬一、岩瀬弘敬：ER 陽性 HER2 陰性乳癌の予後予測ツールとしての

Ku-Integrated Score の開発 第 21 回日本乳癌学会総会 2013.6.27- 29 浜松
Iwase H; Neoadjuvant therapy for early breast cancer in HER2 type and Luminal type tumors. Global Breast Cancer Conference 2013, Symposium 3 10th Oct, 2013, Seoul, Korea

岩瀬弘敬: 進行・再発乳がんに対する内分泌療法の最新情報 乳癌治療の最前線 進行・再発乳癌の治療戦略 第 51 回日本癌治療学会学術集会 臓器別シンポジウム 6 2013. 10.24 京都

Iwase H, Yamamoto Y, Murakami K, Yamamoto-Ibusuki M, Nakano M Tomita S; Breast Cancer Low-dose estrogen is beneficial for postmenopausal breast cancer with acquired resistance to endocrine therapies. The 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, English Oral Sessions; 9-11 Oct, 2012, Sapporo

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩瀬弘敬 (IWASE, Hirotaka)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号： 40211065

(2) 研究分担者

山本 豊 (YAMAMOTO Yutaka)
熊本大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号： 2039817

(3) 連携研究者

指宿睦子 (IBUSUKI, Mutsuko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号： 30448526