

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591927

研究課題名(和文) 乳癌ホルモン療法効果予測におけるメニンの可能性

研究課題名(英文) Possibility of menin as a predictive factor for aromatase inhibitors

## 研究代表者

山内 清明 (YAMAUCHI, Akira)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・部長

研究者番号：00291427

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)：MEN1の責任遺伝子にコードされたメニンがアロマターゼ阻害剤の効果阻害因子となる可能性について検討した。これまでの研究でメニンはERに結合してERの転写活性を促進することを明らかにし、臨床的意義を解析してきた。今回はエキセメスタンを用いた術前ホルモン療法症例41例の組織におけるメニン発現をH-Scoreで評価したが、現在臨床データの開示手続き中で、開示され次第メニンと治療効果との関連を解析予定である。研究分担者の上野貴之氏はメニン発現とTunnel法によるアポトーシスとの有意な逆相関を証明した。この結果より乳癌組織におけるメニンは乳癌ホルモン療法の効果阻害予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the possibility of menin, a gene product of men1, as a negative predictive factor for the efficacy of aromatase inhibitors. We already clarified that menin enhances the transcriptional activity of estrogen receptors (ER) by physical association to ER, and investigate the association with clinical events. In this study, we finished to evaluate menin expression on breast cancer tissue. We have only to analyze the relationship between menin expression and clinical events, after clinical data come to be available.

Dr. Takafumi Ueno, a collaborator, demonstrated the negative correlation between menin expression and apoptosis assessed by TUNEL method. This suggests the possibility of menin as a negative predictive factor for the efficacy of aromatase inhibitors.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：メニン 乳癌 ホルモン療法 アロマターゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

ホルモン依存性増殖を示すいわゆる Luminal 型乳がんはホルモン療法を5年間の長期間にわたり継続することで良好な予後が得られているが、近年晩期再発 (late recurrence) が問題視されつつあり、ATLAS 試験ではホルモン療法の期間を5年から10年に延長した方が晩期再発を防止できるとの報告もなされた。このことは乳がんの中にはホルモン療法抵抗性の乳がんも存在することを示唆する。これまで乳がんホルモン療法に対する抵抗性に関しては日本から多くの報告がなされていた。その多くはタモキシフェン耐性に関する発表である。まずシグナル伝達因子の関与に関しては、Campbell らが PI3K や AKT そのものがエストロゲン非存在下でエストロゲンレセプターを活性化することでタモキシフェン耐性を示す可能性を報告した (J Biol Chem. 2001)。また日本からも多くの報告がなされている。山下、岩瀬らがエストロゲンレセプターのセリン167のリン酸化が耐性機序の一つである可能性を報告した (Breast Cancer Res. 2005)。彼らは翌年に stat5 にも同様の可能性があることを報告している (Endocr Relat Cancer. 2006)。また岩瀬らは P53 の変異もタモキシフェン耐性である可能性を示唆している (Int J Clin Oncol. 2006)。さらに Hurtado らは PAX-2 という HER2 関連遺伝子がエストロゲンレセプターの発現を抑制することでタモキシフェン耐性を誘導することを報告した (Nature. 2008)。エストロゲンレセプター転写活性調節因子関連では Zhang らが転写共役因子 NCOR1 mRNA (Cancer Letters. 2006) およびヒストンを脱アセチル化することで転写制御に関わる HDAC6 (Oncogene. 2005) がタモキシフェン耐性予知因子である可能性を報告している。しかし残念ながら上記のどの因子も臨床応用に至っていない。

## 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、臨床応用可能なタモキシフェン効果予知因子として、多発性内分泌腫瘍1型 (MEN1) の責任遺伝子 *men1* にコードされたタンパク質メニンの検討を行うこととした。本研究は科学技術振興機構 (JST) の独創的シーズ展開事業「独創モデル化」における平成18年度新規採択課題に採用決定されました。採択となった新規課題は、「乳がんホルモン療法効果予知診断」キットの開発で、メニンを検出するキットの作成を行った。このキットを用いて、乳がん術後再発防止に広く用いられるホルモン療法剤タモキシフェンの効果を阻害するメニンの発現を解析し、タモキシフェン効果予知の可能性を検討した。その成果としてメニンはエストロゲンレセプターのエストロゲン結合部位に結合してエストロゲンレセプタ

ーの転写活性を促進する新規の cofactor (共役因子) であることを明らかにし、臨床的意義を解析してきた。その結果メニン高発現を呈する乳がん症例は有意にタモキシフェン抵抗性を示すことを報告した (Imachi H, Yamauchi A, et al., Breast Cancer Res Treat. 2010; 122: 395-407)。この論文で我々はメニンが元来内分泌細胞の核内に存在し、proto-oncogene であり転写因子でもある Jun-D に結合して転写活性を調節することで内分泌細胞の腫瘍化を制御していることに着目した。メニンが乳がん細胞の核内に存在すればメニンは同じく転写因子であるエストロゲンレセプターに結合し、エストロゲンレセプターの機能を調節する可能性があるのではないかと考えた。そこで我々は先ずメニンが乳がん細胞に存在するかどうかを、エストロゲン依存性増殖を示す乳がん細胞株 MCF-7 細胞を用いてノザンプロット法とウェスタンプロット法で解析したところ、MCF-7 細胞にはメニンの mRNA とタンパク質の存在することを証明した。次に乳がん切除標本を用いて、赤色蛍光標識した抗メニン抗体と緑色蛍光標識した抗エストロゲンレセプター抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡でメニンとエストロゲンレセプターの発現を解析したところ、両者とも乳がん細胞の核に存在し、かつ merge すると黄色に変化した。すなわちメニンはエストロゲンレセプターと同じ核に発現している可能性が示唆された。さらに GSH pull down assay では野生型メニンはエストロゲンレセプターに結合したが、変異型メニンは結合しなかった。続いて mammalian two hybrid assay でエストロゲンレセプターにおけるメニンの結合部位を確認したところ、メニンはエストロゲンレセプターの AF2 部に結合し転写活性を促進した。すなわちメニンはエストロゲンレセプターの新規共役因子であることが示された。AF2 部はエストロゲンやタモキシフェンが結合する部分でもあることから、メニンはエストロゲンとエストロゲンレセプターの結合に何らかの影響を及ぼす可能性があることが示された。このことはメニンが乳がんホルモン療法剤タモキシフェンの効果に何らかの影響を与える可能性を示唆する。また野生型メニン遺伝子 *men1* および変異型 *men1* を乳がん細胞株に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイでエストロゲンレセプターの転写活性を測定したところ野生型 *men1* 導入細胞は変異型導入細胞より4倍程度転写活性が高かった。さらにこの転写活性はタモキシフェンでも抑制されなかった。この結果から臨床標本を用いてメニンの発現とタモキシフェンの効果との関連を解析した。用いた標本は、タモキシフェン単独療法を施行された症例でかつ2年から5年の投与終了後5年以上経過して予後の判明している標本で、香川大学、名古屋市立大学、東京医科大学から提供された。解析結果は予想通り、メニン発現

が50%を超える症例は50%未満の症例より再発頻度がLog rank検定で有意に高かった。これらからメニンはタモキシフェンのnegativeな効果予知因子である可能性が強く示唆された。

今回はメニンが乳がんホルモン療法剤のうちタモキシフェンより効果が高いアロマターゼ阻害剤の効果予知因子になりうるかどうかを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

乳がんホルモン療法剤のうちステロイド系アロマターゼ阻害剤エキセメスタンを用いてがん集学的治療財団が2007年に実施開始した術前ホルモン療法の臨床研究JFMC34-0601に登録された110例のうち免疫組織染色可能な41例の抽出標本についてメニン発現を定量化し、各症例の腫瘍縮小効果とメニンとの関連を検討することとした。当初使用した抗メニン抗体はBethyl社製のA300-105Aが販売中止となり、同社の同じく抗メニン抗体であるIHC-00572に変更して免染条件を調整した結果、A300-105Aと同様の免染スペクトラムが得られたので、IHC-00572抗体を使用することとした。免染手順は以下のとおりである。

- (1) 未染スライドを溶解液内で60分間ベーキング。
- (2) 抗原賦活液を自動前処理システム「PT Link」のヒートトレイに添加し、プレヒートにより65℃まで加温する。
- (3) ベーキングを実施した未染スライドを自動免疫染色装置「Autostainer Link 48」専用のスライドラックにセットし、ラックごと自動前処理システム「PT Link」内のヒートトレイに浸漬する。
- (4) 自動前処理システム「PT Link」により、脱パラフィンならびに抗原賦活処理(97℃、20分)を行う。
- (5) 抗原賦活処理後、装置内の温度が65℃まで下がったことを確認した後、スライドラックごと洗浄液(Wash Buffer)に浸漬する(5分間)。
- (6) 自動免疫染色装置「Autostainer Link 48」を用いて染色を実施する。

自動免疫染色装置設定条件(試薬添加量:一律300μL)

洗浄(Washing Buffer)1回

内因性ペルオキシダーゼ除去(ブロッキング試薬)室温5分

洗浄(Washing Buffer)1回

1次抗体反応 室温20分

洗浄(Washing Buffer)1回

ポリマー反応(ポリマー試薬 室温40分)

洗浄(Washing Buffer)1回

洗浄(Washing Buffer)5分1回

発色反応(DAB溶液 室温5分X2回

洗浄(Washing Buffer)1回

洗浄(精製水)1回

(7) 染色終了後、自動免疫染色装置からスライドラックを外し、水洗5分。

(8) カラッチのヘマトキシリンにて核染色を行う。

(9) 脱水(エタノール)透徹(キシレン)封入(マリノール)を行う。

### 4. 研究成果

メニンの発現はH-Scoreで評価し、H-Scoreが0-100の陰性または弱陽性群が22症例、101-200の陽性群が12例、201-300の強陽性群が7例であった。H-Score中央値は100であった。現在臨床データの開示手続きが施行中であるが、アロマタシンの効果との関連については臨床データを入手次第解析予定とした。結果の一覧を記す。

研究分担者の上野貴之氏の研究ではアロマタシンのエンドキサンを用いた術前ホルモン療法に登録された症例の抽出標本を用いた解析でメニン発現はTUNEL法によるアポトーシスと有意な逆相関を認めた。この結果より乳がん組織におけるメニンは乳がんホルモン療法のアポトーシス誘導作用を阻害する可能性が示唆された。増殖因子現減少によるがん細胞のアポトーシスの誘導には一般的にmTORやMDMによるp53蛋白の不活性化が起こり、アポトーシス関連蛋白がミトコンドリアに作用してCaspase Familyの活性化が起こる。乳がん細胞ではさらにAKTが細胞のsurvivalに関与している。メニンがmTOR阻害剤エベロリムスの効果に関与する可能性もあり、これらの経路にメニンがいかに関与しているかを今後も検証を継続してゆく。また完全型エストロゲンレセプター阻害剤フルヴェストラントや、さらに近い症例上梓されるCDK4/6とアロマターゼ阻害剤との併用療法においてもメニンが効果予測因子となりうるかどうか検討する必要があると考える。

最近、変異型men1がマウスにおいて乳がんの発症を促進するという報告と共に、我々の解析と同様、ヒト乳がん症例でメニン発現が高いほど予後不良であるとの報告があった(Christelle Seigne, et al., Journal of Pathol, 2013)。さらに変異型men1を有する多発性内分泌腺腫1型の患者は、BRCA1も変異しており、遺伝性乳がんの発症率が高いとの報告もあった(Koen M.A. Dreijerink, New England Journal of Medicine, 2014)。これらの報告は「今後のメニン研究の方向性を示唆するものである。

< Menin 免疫組織染色の判定結果 >

H-SCORE

症例 1	30
症例 2	10
症例 3	70

症例 4	10
症例 5	100
症例 6	70
症例 7	0
症例 8	100
症例 9	240
症例 10	80
症例 11	110
症例 12	120
症例 13	60
症例 14	70
症例 15	30
症例 16	90
症例 17	240
症例 18	0
症例 19	10
症例 20	0
症例 21	150
症例 22	130
症例 23	60
症例 24	180
症例 25	40
症例 26	0
症例 27	0
症例 28	290
症例 29	150
症例 30	210
症例 31	210
症例 32	10
症例 33	30
症例 34	20
症例 35	0
症例 36	110
症例 37	230
症例 38	150
症例 39	210
症例 40	200
症例 41	10
症例 42	120
症例 43	180
症例 44	20
症例 45	30
症例 46	0
症例 47	130

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山内 清明 (YAMAUCHI, Akira)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第

1 研究部・部長

研究者番号：00291427

##### (2)研究分担者

上野 貴之 (UENO, Takayuki)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：40452362