

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461949

研究課題名(和文) 乳癌におけるゲノム異常と分子サブタイプ及び薬剤感受性との関連

研究課題名(英文) Genomic alteration, molecular subtypes and drug sensitivity in breast cancer

研究代表者

徳永 えり子 (Tokunaga, Eriko)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・乳腺科部長

研究者番号：50325453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム異常の程度は乳癌のサブタイプによって大きく異なることが示された。ホルモン受容体(HR)陽性/HER2陰性タイプで悪性度が低いと考えられる症例では、ゲノム異常は著明に低頻度であった。一方、HER2タイプやトリプルネガティブタイプではゲノム異常は高度であったが、このような症例では化学療法が行われることが多く、ゲノム異常の多いものの中に抗癌剤感受性が高いものが含まれることから、ゲノム異常が予後に直接結びつかないことが示された。一方、HR陽性/HER2陰性タイプにおいては、ゲノム異常が高度な症例において有意に予後不良であり、このような症例においてホルモン耐性であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Extent of the genomic alterations and loss of heterozygosity (LOH) at tumor suppressor gene (TSG) loci was quite different among subtypes in the primary breast cancer. Low-grade hormone receptor (HR)-positive/HER2 negative subtype has significantly less genomic alterations and LOH at TSG loci compared with other subtypes. HER2 type and triple negative (TN) type have extensive genomic and chromosomal alterations and LOH. In these subtypes, cytotoxic chemotherapy is often used. Some tumors with high genomic alterations are sensitive to chemotherapy, thus genomic abnormalities are not always associated with poor prognosis in HER2 and TN subtypes. On the other hand, in HR-positive/HER2 negative subtype, high genomic alterations are significantly associated with poor prognosis. It suggests that tumors with high genomic alterations are probably resistant to endocrine treatment, which may lead to unfavorable outcomes.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 DNA修復

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は非常に多様性に富んだ疾患であり、網羅的遺伝子発現プロファイルにより、Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like, Claudin-low など複数の分子サブタイプに分類されることが明らかにされている(Prat A, Perou CM. Mol Oncol 2011; 5:5-23)。乳癌の治療方針を決定する上で、現在ではこのサブタイプを念頭におくことは不可欠である。しかし、網羅的遺伝子発現プロファイルによるサブタイプ分類は、日常臨床において行うことは困難であり、一般的にはER, PR, HER2, Ki67 の状況を免疫組織化学染色などにより評価し、"Luminal A"-like, "Luminal B-HER2 陰性"-like, "Luminal B-HER2 陽性", HER2, Triple negative(TN)に簡便に分類している。Basal-like, Claudin-low はTNに含まれる。それぞれのサブタイプにはその起源となる細胞が規定されていることが示されている。例えば Claudin-low は stem cell に最も近い細胞由来とされる(Prat A, Perou CM. Nat Med 2009; 15:842-44)。一方、これらのサブタイプには特徴的な染色体の変化やゲノム異常があることがわかってきた。染色体全体の変化としては Luminal A が最も少なく、HER2-enriched, Basal-like で多いが、TNである Claudin-low では染色体変化がほとんど認められない(Weigman VJ et al. Breast Cancer Res Treat 2012;133:865-880)。また、それぞれのサブタイプに特異的な遺伝子の増幅や欠失が認められているが、それぞれのサブタイプにおけるそれらのゲノム異常の意義、予後や治療効果との関連はまだ十分には解明されていない。

我々はこれまで、染色体異常の一つとして、複数の癌抑制遺伝子座のヘテロ結合性の欠失(loss of heterozygosity: LOH)と臨床病理学的因子や予後との関連を解析してきた。特に *BRCA1* 遺伝子座の LOH は乳癌の HER2 や TN タイプに多く、予後不良であることを報告した。

乳癌の薬物療法においては内分泌療法、化学療法、分子標的治療を、それぞれの症例のサブタイプや進行度を考慮して決定する。ER, PR, HER2, Ki67 からサブタイプを推測し、十分に考慮した治療方針であっても、その後の予後は様々である。その治療効果や予後の差にそれぞれのサブタイプの中でも異なるゲノム異常が関与している可能性がある。乳癌におけるゲノム異常を詳細に解析し、遺伝子発現によって分類される分子サブタイプや治療効果との関連を解明し、治療感受性や予後に関連する遺伝子異常を同定することはそれぞれのサブタイプのさらなる治療成績向上のために重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、それぞれのサブタイプのさらなる治療成績向上のために、(1)乳癌におけるゲノム異常を詳細に解析し、ゲノム異常と遺伝子

発現によって分類される分子サブタイプや内分泌療法、化学療法、分子標的療法に対する治療効果・薬剤感受性との関連を解明すること、(2)将来的にバイオマーカーとなりうる、サブタイプや治療効果に関連する特異的なゲノム異常を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 様々な癌抑制遺伝子領域の欠失・LOH

これまでの報告で、乳癌では *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* などの癌抑制遺伝子領域の欠失・LOH が比較的高頻度に認められるが、その頻度はサブタイプによって異なることが示されている。*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *RBI*, *INPP4B* などの癌抑制遺伝子領域の LOH の有無を、我々がこれまでに確立してきた高精度マクロサテライト解析法を用いて解析する。その上でこれらの遺伝子領域の LOH の頻度とサブタイプ、悪性度、予後や薬剤感受性との関連を明らかにする。

### 2) SNP-CGH による網羅的染色体解析

SNP-CGH により、ゲノムの変化を全染色体レベルで解析することが可能になってきた(Fan JB et al. Nat Rev Genet 7:632-44, 2006)。SNP-CGH により網羅的染色体解析をおこない、各サブタイプと染色体変化の関連を解明する。また、1)で解析した様々な癌抑制遺伝子領域のアリルバランスやコピー数の変化などゲノムレベルでの詳細な情報を解析する。また、これまで全染色体レベルでの変化に乏しいとされている Claudin-low や Luminal A タイプなどに特異的なゲノム変化がないかを詳細に解析する。

### 3)染色体異常と予後、治療効果との関連

1), 2)で解析した染色体変化とそれぞれのサブタイプにおける内分泌療法、化学療法、分子標的治療の効果との関連を解析する。特に、ホルモン受容体陽性症例における内分泌療法、HER2 陽性症例における抗 HER2 療法(Trastuzumab)、TN 症例における化学療法の効果、予後との関連を詳細に検討する。

### 4) DNA 修復関連因子の発現と遺伝子変異、臨床病理学的因子との関連

がんにおいて遺伝子変異を起こす重要な要因として知られる APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) 3B 及び、「誤りがちな」ポリメラーゼ Polθ の原発性乳癌における mRNA 発現を定量的 RT-PCR にて解析し、臨床病理学的因子、治療効果や予後との関連を解析する。

## 4. 研究成果

### 1) 様々な癌抑制遺伝子領域の欠失・LOH

原発性浸潤性乳癌 363 例において、主要な癌抑制遺伝子 *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RBI*, *PTEN*, *INPP4B* の遺伝子座の LOH を自動シーケンサーによるフラグメント解析で評

価した。また、全ゲノムの染色体不安定性を SNP-CGH で評価した。

LOH の有無について評価可能であった症例での癌抑制遺伝子座の LOH の頻度は、*BRCA1* 113/302 (37.4%), *BRCA2* 96/282 (34.0%), *TP53* 159/278 (57.1%), *RBI* 112/267 (41.9%), *PTEN* 76/295 (25.8%), *INPP4B* 43/239 (18.0%) だった。LOH の頻度はホルモン受容体(HR)陽性/HER2 陰性群で最も低く、HER2 陽性、TN タイプで著明に高かった。これらの癌抑制遺伝子座に LOH を認める症例では、核グレードが高く、ER 陰性、PR 陰性である症例が有意に多かった。*INPP4B* 遺伝子座の LOH は TN サブタイプと有意に相関していた。また、これらの癌抑制遺伝子座の LOH と予後との関連はサブタイプによって異なっていた。特に *BRCA1* と *TP53* 遺伝子座の両方に LOH を認める症例では、特に悪性度が高く、染色体不安定性が高度で、予後も不良であった。サブタイプ別では、HR 陽性/HER2 陰性サブタイプでは *BRCA1*, *TP53*, *INPP4B* 遺伝子座に LOH を認める症例では有意に予後不良であったが、ほかのサブタイプでは各遺伝子座の LOH の有無と予後に有意な相関は認められなかった。このことから、染色体不安定性を示す HR 陽性/HER2 陰性乳癌においては、ホルモン療法の効果が低い(ホルモン耐性)可能性が示された。また、TN サブタイプの多くは高度の染色体不安定性を示したが、非常に予後不良であった TN 症例の中に染色体異常をほとんど示さないものがあり、Caudin low タイプとの関連が示唆された。

## 2) *APOBEC3B* mRNA の発現と臨床病理学的因子との関連

*APOBEC3B* は、シチジンデアミナーゼの一つであり、がんにおいて遺伝子変異を起こす重要な要因として知られるようになった。我々は、*APOBEC3B* mRNA の発現と乳癌における遺伝子異常や臨床病理学的因子、および治療感受性との関連を解析した。

RNA の抽出が可能であった 305 例の浸潤性乳癌において、*APOBEC3B* mRNA の発現を定量的 RT-PCR にて解析した。28 例では *APOBEC3B* mRNA の発現は全く検出されなかった。*APOBEC3B* mRNA 高発現群では ER 陰性、PgR 陰性、高グレード、高 Ki67 の症例が多く、*APOBEC3B* mRNA 高発現は悪性度が高いことと関連していると考えられた。サブタイプ別では TN 乳癌で *APOBEC3B* mRNA 発現が高く、HR 陽性/HER2 陰性サブタイプで最も低かった。*APOBEC3B* mRNA 高発現群では、遺伝子変異が起こりやすいことが予測されたが、やはり低発現および無発現群に比較して *TP53* 遺伝子変異の頻度が有意に高かった。さらに、*APOBEC3B* mRNA 高発現群は低発現群に比較して有意に予後不良であり、特に ER 陽性症例、ホルモン療法施行例で顕著であった。*APOBEC3B* mRNA 高発現であることにより、様々な遺伝子に変異が蓄積し、

治療抵抗性になることが示唆された。*APOBEC3B* mRNA の発現が全く検出されなかった症例においては、SNP-CGH で *APOBEC3B* 遺伝子座の欠失が認められた。この欠失には民族差があることが知られており、発癌の民族差にも関与している可能性が示唆された。

## 3) *POLQ* 遺伝子発現と臨床病理学的因子との関連

正確性の高い DNA 修復経路である相同組換え系に異常がある場合、非相同末端結合(NHEJ)による誤りがちな(error-prone)DNA 修復経路がその代替として使われることが知られている。最近、「誤りがちな」ポリメラーゼ *Polθ* をコードする哺乳類の *POLQ* 遺伝子が、非相同末端結合(NHEJ)に関与していること、悪性度の高いがんで *Polθ* の発現が高いことが示されている。我々は *APOBEC3B* mRNA 発現の解析を行った症例を対象に、*Polθ* mRNA 発現を定量的 RT-PCR を用いて解析し、染色体不安定性、遺伝子変異、治療効果との関連について解析した。

*Polθ* 発現は ER 陰性、PgR 陰性、高核グレード、高増殖活性、HER2 タイプや TN タイプと関与し、*Polθ* 高発現症例では *TP53* 遺伝子変異を高頻度に認めた。解析した症例全体では *Polθ* mRNA 発現と予後に明らかな相関は認められなかったが、高グレード症例においては、高 *Polθ* mRNA 発現症例は予後良好であった。低グレード症例では主に内分泌療法、高グレード症例では化学療法が選択されることがあり、グレードによって治療感受性が異なるためと考えられた。

以上のように、ゲノム異常の程度は乳癌のサブタイプによって大きく異なることが示された。HR 陽性/HER2 陰性タイプ、特に“Lumina-A” like と考えられる症例ではゲノム異常は少ないことが示された。HER2 タイプや TN タイプではゲノム異常は高度であったが、このような症例では化学療法が行われることが多く、ゲノム異常の多いものの中に抗癌剤感受性が高いものも含まれることから、ゲノム異常が直接予後に結びつかないことが示された。一方、本来低悪性度のものが多い HR 陽性/HER2 陰性タイプにおいては、ゲノム異常が高度な症例において有意に予後不良であり、このような症例においてホルモン耐性であることが示された。特異的ゲノム異常と治療感受性との関連についてさらなる追求が必要と考えられる。

## 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 9 件)

1. Tokunaga E, Nakashima Y, Yamashita N,

- Hisamatsu Y, Okada S, Akiyoshi S, Aishima S, Kitao H, Morita M, Maehara Y. Overexpression of metadherin/MTDH is associated with an aggressive phenotype and a poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer*,21:341-9, 2014
2. Tanaka K, Tokunaga E, Yamashita N, Taketani K, Akiyoshi S, Morita M, Maehara Y. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist plus aromatase inhibitor as second-line endocrine therapy in premenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Surg Today*, 44:1678-84, 2014
  3. Taketani K, Tokunaga E, Yamashita N, Tanaka K, Akiyoshi S, Okada S, Ando K, Kimura Y, Saeki H, Oki E, Morita M, Kusumoto T, Maehara Y. The early discontinuation of adjuvant hormone therapy is associated with a poor prognosis in Japanese breast cancer. *Surg Today*, 44(10):1841-6, 2014.
  4. Hisamatsu Y, Tokunaga E, Yamashita N, Akiyoshi S, Okada S, Nakashima Y, Taketani K, Aishima S, Oda Y, Morita M, Maehara Y. Impact of GATA-3 and FOXA1 expression in patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*, 22(5):520-8,2015
  5. Tokunaga E, Yamashita N, Kitao H, Tanaka K, Taketani K, Inoue Y, Saeki H, Oki E, Oda Y, Maehara Y. Biological and clinical significance of loss of heterozygosity at the INPP4B gene locus in Japanese breast cancer. *The Breast*, 26:62-68, 2015
  6. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hitchins M, Inoue Y, Tanaka K, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, Okada S, Oda Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Epigenetic Inactivation of BRCA1 Through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 15(6): 498-504, 2015
  7. Tanaka K, Tokunaga E, Inoue Y, Yamashita N, Saeki H, Okano S, Kitao H, Oki E, Oda Y, Maehara Y. Impact of Expression of Vimentin and Axl in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* vol.16 ( 6 ) :520-526,2016
  8. Tanaka K, Tokunaga E, Yamashita N, Sagara Y, Ohi Y, Taguchi K, Ohno S, Okano S, Oda Y, Maehara Y. The relationship between the expression of FOXA1 and GATA3 and the efficacy of neoadjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer*. (e-pub ahead: Jul 29,2016) ,24:384-392,2017
  9. Tokunaga E, Yamashita N, Tanaka K, Inoue Y, Akiyoshi S, Saeki H1, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Expression of APOBEC3B mRNA in Primary Breast Cancer of Japanese Women. *PLoS One*, 11:e0168090,2016
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 徳永えり子, 山下奈真, 田中仁寛、上尾裕紀、安藤幸滋、佐伯浩司、沖英次、森田勝、前原喜彦. 乳癌の予防変遷とサブタイプとの関連. 第 52 回日本癌治療学会学術集会 (2014 年 8 月 28 日 - 8 月 30 日、横浜)
  2. 徳永えり子, 山下奈真, 森田勝、前原喜彦. 術前薬物療法のトランスレーショナルリサーチ. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (招待講演)(2014 年 7 月 10 日 - 12 日、大阪)
  3. 徳永えり子, 山下奈真, 田中仁寛、井上有香、安藤幸滋、中島雄一郎、大垣吉平、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦. Trends in the outcomes of breast cancer according to the subtypes. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 (2015 年 4 月 16 - 18 日、名古屋)
  4. 徳永えり子, 山下奈真, 田中仁寛、井上有香、前原喜彦. 原発性乳癌における

- APOBEC3B mRNA 発現の生物学的意義. 第 23 回日本乳癌学会学術総会(2015 年 7 月 2 - 4 日、東京)
5. 徳永えり子、山下奈真、佐伯浩司、沖英次、北尾洋之、前原喜彦. 乳癌における APOBEC3B 発現の意義. 第 74 回日本癌学会学術総会( 2015 年 10 月 8 日 - 10 日、名古屋 )
  6. 徳永えり子、秋吉清百合、中村吉昭、古閑知奈美、石田真弓. ゲノム解析に基づく乳がんトランスレショナルリサーチの最前線. 第 53 回日本癌治療学会学術集会 ( 2015 年 10 月 29 - 31 日、京都 )
  7. Tokunaga E, Akiyoshi S, Koga C, Nakamura Y, Taguchi K, Ishida M, Ohno S. Clinical outcome of pathological T1N0 breast cancer according to the hormone receptor and HER2 status and adjuvant therapy. The 2015 San Antonio Breast Cancer Symposium ( 2015 年 12 月 8 - 12 日、San Antonio )
  8. 徳永えり子、秋吉清百合、古閑知奈美、中村吉昭、田口健一、石田真弓. トリプルネガティブ乳癌における癌幹細胞マーカー CD44v9 発現と術前化学療法の効果及び予後との関連. 第 116 回日本外科学会定期学術集会( 2016 年 4 月 14 - 16 日、大阪 )
  9. 徳永えり子、秋吉清百合、古閑知奈美、中村吉昭、石田真弓. ゲノム解析による乳癌個別化医療の展望. 第 24 回日本乳癌学会学術総会(2016 年 6 月 16 - 18 日、東京)
  10. 徳永えり子、井上有香、山下奈真、佐伯浩司、沖英次、北尾洋之、前原喜彦. 乳癌における polymerase $\theta$  発現の臨床的意義. 第 75 回日本癌学会学術総会( 2016 年 10 月 6 - 8 日、横浜 )
  11. 山下奈真、徳永えり子、井上有香、田中仁寛、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦. Epithelial paradox ; 浸潤性乳管癌における

浸潤形態の heterogeneity について. 第 75 回日本癌学会学術総会 ( 2016 年 10 月 6 - 8 日、横浜 )

12. 井上有香、山下奈真、徳永えり子、田中仁寛、北尾洋之、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦. 乳がんにおける Wild-type p53 inducible phosphatase1 ( Wip1 ) 発現の生物学的意義についての検討. 第 75 回日本癌学会学術総会 ( 2016 年 10 月 6 - 8 日、横浜 )
13. 徳永えり子、秋吉清百合、古閑知奈美、増田隆伸、伊地知秀樹、神代竜一、田中旬子、中村吉昭、石田真弓. ER 陽性転移再発乳癌の治療成績と予後規定因子に関する研究. 第 54 回日本癌治療学会学術集会 ( 2016 年 10 月 20 - 22 日、横浜 )

〔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：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
 徳永 えり子 ( Eriko Tokunaga )  
 国立病院機構九州がんセンター・部長  
 研究者番号：50325453

(2)研究分担者  
 北尾 裕之 ( Hiroyuki Kitao )

九州大学医学研究院・准教授  
研究者番号：30368617

山下 奈真 ( Nami Yamashita )  
九州大学医学研究院・助教  
研究者番号：60608967

佐伯 浩司 ( Hiroshi Saeki )  
九州大学医学研究院・准教授  
研究者番号：80325448

(3)連携研究者

(4)研究協力者

( )