

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591513  
 研究課題名（和文） 転写モジュレーターによる乳癌内分泌療法の効果増強に関する研究  
 研究課題名（英文） The study on the sensitization of transcriptional modulator to endocrine therapy for breast cancer  
 研究代表者  
 岩瀬 弘敬（IWASE HIROTAKA）  
 熊本大学・医学薬学研究部・教授  
 研究者番号：40211065

## 研究成果の概要：

乳癌臨床例において、NCoR1高発現例は内分泌療法に反応しやすく、AIB1高発現例は内分泌療法の効果が明らかでなかった。培養細胞系では転写モジュレーターと内分泌療法の関連は明らかにすることはできなかった。FISH法にて判定したER 遺伝子の増幅が、臨床例の約20%に認められ、増幅例はER蛋白発現と強い相関があり、内分泌療法の効果と関連があった。この増幅の有無によりホルモン依存性をさらに正確に予測できる。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、転写共役因子、NCoR1、HDAC6、ER 遺伝子増幅

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は前立腺癌、子宮内膜癌と並んで代表的なホルモン依存性腫瘍である。乳癌全体の70%はエストロゲンレセプター（ER）もしくはプロゲステロンレセプター（PgR）が陽性であり、これらはエストロゲン依存性癌であるとされ、様々な内分泌療法が行われている。しかしながら、ER、PgR だけではホルモン反応性を予測することは十分ではなく、転写共役因子やki-67による増殖能評価が重要とされている。さらに最近では遺伝子プロフ

アイリングを用いた予後および効果予測ツールが開発されている。特に、転写共役因子は内分泌療法の効果予測だけでなく、それ自身の発現量が内分泌療法に影響を与えている可能性がある。

(2) 一方、ER 蛋白発現が ER 遺伝子増幅と関わりがあることが報告されたが、ホルモン依存性増殖と ER 遺伝子増幅との関連についても検討が必要である。さらに ER 遺伝子増幅のもつ臨床的な重要性については未知である。

## 2. 研究の目的

(1) 乳癌組織内ではエストロゲンレセプター (ER) 発現とそれに伴う転写共役因子の発現がホルモン依存性増殖と関連がある。我々はこれら転写共役因子やそれらの阻害剤を含めた転写モジュレーターが内分泌療法の効果増強あるいは耐性の克服として重要であると仮定した。我々臨床の乳癌組織から mRNA レベルもしくは蛋白レベルにおいて、転写共役因子のうち NCoR1 や AIB1 に焦点を当て、内分泌療法効果予測因子における有用性について検討を進める。また、HDAC 阻害薬をはじめとした転写モジュレーターと内分泌療法薬との相加、相乗効果を検索すべく検討を試みた。

(2) タモキシフェンで術後補助療法が行ってある症例群において ER 蛋白発現と ER 遺伝子増幅を検討し、後者のもつ臨床的重要性について検討した。

## 3. 研究の方法

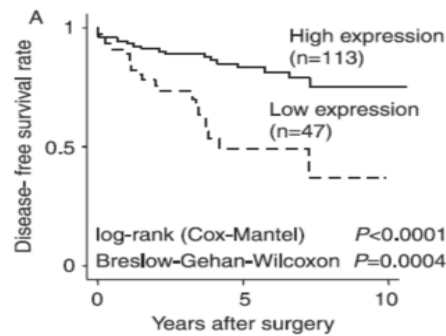
(1) ホルモン療法の効果が判明している乳癌臨床例において初回手術癌細胞における転写共役因子の発現を RT-PCR あるいは免疫染色法にて半定量化し、これらの臨床的重要性について検討した。副次的に、ER 遺伝子増幅のある症例をまた、MCF7、T47D、BT-20 などの培養細胞系を用いて HDAC 阻害薬の影響の検討を試みた。

培養細胞は培養液にエタノールに溶解したエストラジオールを  $10^{-6}$  から  $10^{-10}$  Mol/L の濃度で 6 時間から 72 時間培養し、転写共役因子の発現を RT-PCR で半定量化した。また、タモキシフェンに HDAC 阻害薬であるトリコスタチン A (TSA)、アピシジン併用もしくは単剤投与し、細胞増殖に与える影響を検討した。

(2) 遺伝子増幅はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い SPEC ESR1/CEN6 Dual Color Probe kit (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) を用いた FISH 法にて行った。遺伝子増幅は 6 番染色体のセントロメアを認識するプローブを内部コントロールとし、2 倍以上の発光が認められたものを増幅あり、1.5 ~ 2 倍までのものを gain と判定し、臨床病理学的因子、ホルモン療法を行ってある症例での再発検討から、再発予防効果につて検討した。

## 4. 研究成果

NCoR1 についてはヒト乳癌組織にて mRNA および蛋白レベルでの発現を検討し、抗エストロゲン剤の反応性が高い症例では NCoR1 の発現が高いことを証明した。



しかしながら、同じような転写共役因子である AIB1 では逆に高発現例で抗エストロゲン剤の効果が明らかでないことも判明した。さらにこれまで HDAC6、HDCA1、IGFBS4/5 がやはりホルモン反応性を評価するのに重要であることも報告しており、今回の NCoR1 の結果はこれら転写共役因子やエストロゲン応答遺伝子のエストロゲン反応性腫瘍を分別することに重要である。

しかしながら、培養細胞系において HDAC 阻害薬がタモキシフェンによる内分泌療法に与える影響は明らかでなかった。すなわち、細胞レベルの HDCA 阻害薬の内分泌療法に与える影響の解析においては、効果判定のモデル作成が困難であり、結果の解釈には制限がある。

一方、ES 遺伝子 (ESR1) の増幅は散発性乳癌の約 20% 程度に認められ、ER 蛋白の発現と強い関連があることが判明した。

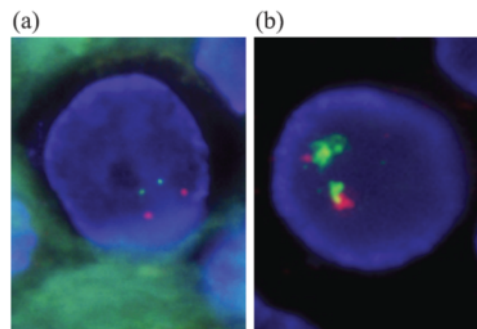
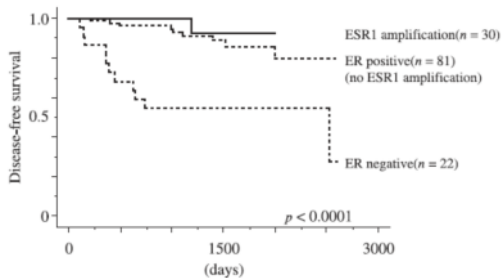


Table 2. Comparison of estrogen receptor (ER) amplification and expression

Expression	ESR1 FISH (n)	ER immunohistochemistry results (Allred score)						
		0-2	3	4	5	6	7 8%	
Normal	86	27.9	2.3	3.5	4.7	7.0	9.3	45.3
Gain	14	7.1	0	7.1	0	7.1	21.4	57.1
Amplified	30	0	0	0	0	0	10.0	90.0

FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

また、術後にタモキシフェン治療が行ってある症例群に対して ER 遺伝子の効果と関連があることが判明した。特に、遺伝子増幅例は再発が 1 例しかなく、予後因子としても重要と思われた。



今後の研究の展開として、ER 遺伝子増幅を検討し、さらなるホルモン療法効果予測因子としての価値を高める必要がある。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Tomita S, Zhang Z, Nakano M, Ibusuki M, Kawasoe T, Yamamoto Y, Iwase H: Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. *Cancer Sci* 100:1012-1017, 2009, 査読有

Yamamoto Y, Iwase H: Safety profiles of aromatase inhibitors and selective estrogen-receptor modulators in the treatment of early breast cancer. *Int J Clin Oncol* 13: 384-394, 2008, 査読有

Okumura, Yamamoto Y, Zhang Z, Toyama T, Kawasoe T, Ibusuki M, Honda Y, Iyama K, Yamashita H, Iwase H: Identification of biomarkers in ductal carcinoma in situ of the breast with microinvasion. *BMC cancer* 2008 [E-pub], 査読有

岩瀬弘敬、山本 豊: 内分泌療法の効果予測 遺伝子プロファイリングから 日本臨床 65:549-554, 2007, 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

富田さおり、山本豊、岩瀬弘敬: 乳癌における ER 遺伝子増幅の検討 第 9 回ホルモンと癌研究会 2008 年 6 月 20 日 (岐阜)

山下啓子、岩瀬弘敬: 乳癌ホルモン療法の効果予測因子の解析 日本癌治療学会 2008 年 10 月 31 日 (名古屋)

山下啓子、岩瀬弘敬: エストロゲンレセプターと Luminal 乳癌 日本癌学会 2008 年 10 月 23 日 (名古屋)

富田さおり、山本 豊、岩瀬弘敬: NCoR1 蛋白発現は進行再発乳癌における内分泌療法の効果と関連する 日本乳癌学会 2008 年 9 月 26 日 (大阪)

岩瀬弘敬: エストロゲンレセプターの分子機構解析と乳癌内分泌療法 第 18 回日本内分泌外科学会 2007 年 5 月 31 日 (名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

Iwase H, Yamamoto Y, Zhang Z: Estrogen receptor structure and function in breast cancer pathogenesis. Editor Fujimoto J, *Reproductive Oncol* (2007) p121-134

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩瀬 弘敬 (IWASE HIROTAKA)

熊本大学・医学薬学研究部・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・助教

研究者番号: 20398217

(3) 連携研究者

なし