

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591549

研究課題名（和文） 日本人トリプルネガティブ乳癌の分子機序の解明と革新的治療法の開発に関する研究

研究課題名（英文） Clarification of the molecular mechanism of Japanese triple negative breast cancers and the development of innovative therapy for them

研究代表者

徳永 えり子 (TOKUNAGA ERIKO)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：50325453

研究成果の概要（和文）：

トリプルネガティブ(TN)乳癌は有効な治療が確立されておらず、その分子機序の解明と新たな治療標的の同定が急務である。本研究では TN 乳癌と BRCA/ファンconi貧血(FA)経路の異常との関連について解析した。TN 乳癌では種々の遺伝子座の LOH の頻度が高く、悪性度と関連していた。また、BRCA1 LOH を認める症例では BRCA2, TP53, PTEN など癌抑制遺伝子の LOH の頻度が高く、染色体不安定性が高度で、予後不良だった。TN 乳癌の中には BRCA/FA 経路の異常が関与する症例が多く、この経路は重要な治療標的と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The lack of efficient treatment for triple negative breast cancers (TNBCs) results in their poor prognosis, and it is necessary to clarify the biological features and molecular mechanism of TNBCs in order to develop new efficient strategies. In this study, we investigated the relationships between TNBCs and abnormalities in BRCA/fanconi anemia (FA) pathway. The incidence and frequency of LOH was significantly higher in TN groups, and the incidence and frequency of LOH was increased as the nuclear grade was elevated. In the tumors with BRCA1 LOH, the incidence of LOH at tumor suppressor genes such as BRCA2, TP53, PTEN was higher and they were genetically unstable. The prognosis of the patients with tumors with BRCA1 LOH was significantly poor. There is a close correlation between TNBCs and abnormalities in BRCA/FA pathway, and this pathway is considered important therapeutic targets for TNBCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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、トリプルネガティブ、basal-like、BRCA/FA 経路、cancer stem cell

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の乳癌罹患率の上昇は著しく、死亡率も増加の一途をたどっている。現在薬物療法は乳癌治療の大きな柱となっている。続々と新規薬剤が開発され、乳癌全体の治療効果は向上しているが、どの薬剤もすべての乳癌に有効なわけではないため、個々の症例にとって最も有効な治療を選択することが、更なる治療成績向上のためには非常に重要である。

(2) ホルモン受容体（エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR））発現、HER2 発現、遺伝子増幅は内分泌治療およびトラスツズマブなどの抗 HER2 療法の治療効果予測因子として治療法選択上重要なバイオマーカーとなっている。しかし、ER 陰性、PR 陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ乳癌に対しては、化学療法しか治療法がないのが現状である。

(3) 近年、DNA マイクロアレイ法を利用した遺伝子プロファイルに基づき、分子レベルで乳癌を分類する試みが行われている。Sorlie らは散発性乳癌を5つのサブグループ、すなわち luminal A、luminal B、normal breast-like、HER2 過剰発現、basal-like に分類した (Sorlie et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003)。この中で basal-like 乳癌は細胞増殖能や悪性度が高く予後不良なタイプであり、内分泌療法やトラスツズマブに抵抗性を示し、化学療法には比較的反応するが、短期間で治療抵抗性を獲得する。basal-like 乳癌は種々の特徴がトリプルネガティブ乳癌と

ほぼ一致している。この群に奏効する治療法の開発は、乳癌全体の予後向上に不可欠である。

(4) 最近、日本人乳癌においては basal-like 乳癌の頻度が他の人種よりも低いことが報告された (Kurebayashi et al, *Breast* 2007)。トリプルネガティブ乳癌の生物学的特性にも人種間差のある可能性がある。我が国でトリプルネガティブ乳癌に関する研究報告は非常に少なく、日本人乳癌におけるトリプルネガティブ乳癌の生物学的特性について詳細に研究を行い、その分子機序を明らかにすることは、有効な治療法開発のためには必要であり、急務である。

(5) 我々は乳癌における DNA 修復異常と薬物療法の感受性予測因子の解明を主なテーマとして種々の研究を行ってきた。①高精度マイクロサテライト解析系を用いて日本人散発性乳癌におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) の頻度、MSI の二つのタイプとミスマッチ修復異常との関連を報告した (Tokunaga E, et al. *Oncology*, 2000)。②原発性乳癌における Akt 経路の活性化が術後ホルモン治療を行った症例の予後不良因子となることを報告した (Tokunaga E, et al *Int J Cancer*, 2006)。③転移性乳癌において Akt 経路の活性化はホルモン治療抵抗性と関連することを報告した (Tokunaga E, et al *Eur J Cancer*, 2006)。④ 原発性乳癌において HER2 過剰発現と PTEN LOH は Akt 経路を活性化させ、さらにプロゲステロン発現を減弱させる

ことを明らかにした(Tokunaga E, et al *Breast Cancer Res Treat*, 2007)。

2. 研究の目的

トリプルネガティブ乳癌の生物学的特性、特にBRCA/ファンconi貧血経路、Akt経路の異常を解析し、その分子機序を解明することにより、この群の予後を改善する革新的治療法開発、新たな治療標的の探索をこの研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)BRCA/ファンconi貧血関連経路の異常の解析

トリプルネガティブ乳癌とはほぼ一致しているbasal-like乳癌は、BRCA1経路の機能不全がその原因と考えられている。散发性乳癌においてBRCA1遺伝子変異の頻度は低く、そのほかの原因によるBRCA1経路の機能不全が生じていると考えられる。そこで、BRCA1関連経路の機能不全の原因となる因子について以下の項目について解析する。

- (1) *BRCA1*mRNA 発現解析: 定量的 RT-PCR により解析する。
- (2) BRCA1 遺伝子座の LOH: 我々が開発、確立した自動シーケンサーと蛍光プライマーをもちいた高精度マイクロサテライト解析系を用いて、LOHを解析する。
- (3) *FANCF* プロモーターメチル化: メチル化特異的 PCR 法により解析する。
- (4) *FANCF* mRNA 発現解析: 定量的 RT-PCR により解析する。

(2) 染色体不安定性の解析

我々が開発し、確立した自動シーケンサーと蛍光プライマーをもちいた高精度マイクロサテライト解析系を用いて、ランダムに選択した複数のマイクロサテライトマーカーについて LOHの有無を解析し、トリプルネガティブ乳癌において、ほかの乳癌と

比較してLOHの頻度が高いのか、検証する。

(3) Akt 経路の活性化の解析

basal-like 乳癌では、その他の乳癌に比較して Akt 経路が活性化されているとの報告がある。Akt 経路の活性化に関連すると考えられる PTEN LOH や PIK3CA 体細胞変異の有無、Akt 経路の活性化の解析をおこない、トリプルネガティブ乳癌とその他の乳癌との比較を行う。

- ① Akt 経路の活性化の解析: ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、リン酸化 Akt の発現を免疫組織化学的に解析する
- ② PTEN LOH: D11S1765, D11S1173 の二つのマイクロサテライトマーカーを用いて上記と同じ解析系で PTEN 遺伝子座の LOH を解析する。
- ③ PIK3CA 体細胞変異の有無: 乳癌組織から抽出したゲノム DNA を用いて、PIK3CA の exon9, 20 の変異の有無を自動シーケンサーにより解析する。

4. 研究成果

(1) *BRCA1*, *BRCA2* LOH の解析: ① *BRCA1* LOH は ER 陰性, PR 陰性, 高核グレードと関連していた。② *BRCA2* にのみ LOH を認める症例の生物学的特徴は *BRCA1*, *BRCA2* ともに LOH を認めない症例と有意な差は認められなかった。③ *BRCA1*, *BRCA2* ともに LOH を認める症例ではより悪性度が高く、トリプルネガティブ乳癌の頻度が高かった。④ *BRCA1*, *BRCA2* ともに LOH を認める症例の生物学的特徴は *BRCA1* にのみ LOH を認める症例と共通点が非常に多く、*BRCA1* に LOH を生じた乳癌では染色体不安定性が高度となり、*BRCA2* など他の遺伝子座にも LOH を生じやすくなる可能性が示唆された。⑤ トリプルネガティブ乳癌では種々の遺伝子座の LOH の頻度が有意に高く、悪性度と関連していた。特に、*BRCA1* に LOH

を認める症例では *TP53*, *P TEN*, *MSH2* など他の遺伝子座での LOH の頻度が有意に高かった。

⑥多変量解析では *BRCA1* の LOH は独立した予後不良因子だった。

(2) *BRCA1* 機能不全は染色体不安定性の誘因となる。高頻度の LOH は染色体不安定性の指標になるため、高精度マイクロサテライト解析系を用いて、複数の領域で LOH の有無を解析した。その結果、トリプルネガティブ乳癌ではほかのサブタイプより LOH の頻度が有意に高く、悪性度と関連していることが明らかになった。特に *BRCA1* 変異家族性乳癌で LOH の頻度が高いとされる遺伝子座での LOH 頻度が高く、トリプルネガティブ乳癌と *BRCA1* 経路機能不全との関連が示唆された。

(3) *BRCA*/ファンconi貧血経路の中で *FANCF* のメチル化は乳癌においては極めて低頻度であることが明らかになった。

(4) *FANCF* mRNA 発現はトリプルネガティブ乳癌で有意に高く、ER 陰性、高悪性度と関連していた。

(5) 我々の解析した症例ではトリプルネガティブ乳癌が他のサブタイプに比較して特に Akt の活性化が高いという結果は得られなかった。また、*P TEN* LOH も多くは認められなかった。しかし、症例数は少ないもののトリプルネガティブ乳癌の中で *PIK3CA* exon 20 に変異を認めるものでは Akt が活性化されていた。

以上の結果より TN 乳癌の中には *BRCA*/ファンconi貧血経路の異常が関与する症例が多く、治療戦略上考慮すべき因子であると考えられる。

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 6 件)

1. Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, Akiyoshi S, Kitao H, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*, in press. PubMed PMID: 21063923. (査読有)
2. 徳永えり子、北尾洋之、前原喜彦 *BRCA* 変異乳癌 *Current Therapy* 2011, 29(5):360-366 (査読無)
3. 徳永えり子、秋吉清百合、山下奈真、岡田敏子、前原喜彦 乳癌の intrinsic subtype と治療感受性 *最新医学* 65:1275-1289, 2010 (査読無)
4. Tokunaga E, Okada S, Kitao H, Shiotani S, Saeki H, Endo K, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Low incidence of methylation of the promoter region of the *FANCF* gene in Japanese primary breast cancer. *Breast Cancer*. 2011, 18(2):120-3. PubMed PMID: 19813073. (査読有)
5. Tokunaga E, Oki E, Egashira A, Sadanaga N, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008, 8(1):27-36. PubMed PMID: 18288941. (査読有)
6. 北尾洋之、藤中良彦、久保信英、中ノ子智徳、吉永敬士、徳永えり子、佐伯浩司、遠藤和也、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦 ファンconi貧血とゲノム不安定性 *福岡医学雑誌* 2008, 99(6):115-22 PubMed PMID:18833937. (査読無)

[学会発表] (計 14 件)

1. Tokunaga E., Cytoplasmic MTDH overexpression promotes metastasis and chemoresistance and leads to poor prognosis in breast cancer., 第 69 回 日本癌学会学術総会, 平成 22 年 9 月 22-24 日, 大阪
 2. Yamashita N, Significance of the FANCI/BRIP1 expression in Triple-Negative Breast Cancer, 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, 平成 22 年 10 月 21-24 日, ミネアポリス
 3. 山下 奈真, triple negative 乳癌と EMT の関連についての検討, 第 48 回日本癌治療学会学術総会, 平成 22 年 10 月 28-30 日, 京都
 4. 徳永えり子, MTDH 過剰発現と遠隔転移、抗癌剤耐性との関連: 新たな分子標的としての可能性, 第 48 回日本癌治療学会学術総会, 平成 22 年 10 月 28-30 日, 京都
 5. Okada S, Different impact of loss of heterozygosity at *BRCA1* and *BRCA2* loci on breast cancer prognosis by the subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor and HER2, AACR/JCR joint conference, February 5-9, 2010, Hawaii
 6. 徳永えり子, 日本人若年者乳がんの生物学的特徴と予後規定因子の解明, 第 47 回 日本癌治療学会学術集会, 平成 21 年 10 月 22-24 日, 横浜
 7. 岡田敏子, 日本人乳癌における BRCA1, BRCA2 の LOH と Molecular subtype との関連, 第 47 回 日本癌治療学会学術集会, 平成 21 年 10 月 22-24 日, 横浜
 8. 徳永えり子, 乳癌において MTDH の活性化により遠隔転移が促進され、予後不良となる, 第 68 回 日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 1-3 日, 横浜
 9. 岡田敏子, 日本人乳癌症例における BRCA1, BRCA2 の LOH に関する研究, 第 17 回 日本乳癌学会学術総会, 平成 21 年 7 月 3-4 日, 東京
 10. 岡田敏子, 日本人乳癌症例における BRCA1, BRCA2 の LOH に関する研究, 第 109 回 日本外科学会定期学術集会, 平成 21 年 4 月 2-4 日, 福岡
 11. 徳永えり子, トリプルネガティブ乳癌における染色体不安定性と抗癌剤の選択, 第 46 回日本癌治療学会総会, 2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 名古屋
 12. 徳永えり子, トリプルネガティブ及び and HER2 過剰発現乳癌における高頻度 LOH と高悪性度との関連, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋
 13. 徳永えり子, トリプルネガティブ乳癌における染色体不安定性, 第 16 回日本乳癌学会学術総会, 2008 年 9 月 26, 27 日, 大阪
 14. Tokunaga E, et al. Basal type breast cancers are most genetically unstable among breast cancer subtypes approximated by estrogen receptor, progesterone receptor and HER2. The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research. Sep 22-24, 2008, Kurashiki, Japan
6. 研究組織
(1) 研究代表者
徳永 えり子 (Tokunaga Eriko)
九州大学・大学病院・学術研究員
研究者番号: 50325453

(2) 研究分担者

塩谷 聡子 (Shiotani Satoko)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：90419549

沖 英次 (Oki Eiji)
九州大学・医学研究院・非常勤講師
研究者番号：70380392

定永 倫明 (Sadanaga Noriaki)
九州大学・医学研究院・非常勤講師
研究者番号：20304826

岡田 敏子 (Okada Satoko)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：50546562

秋吉 清百合 (Akiyoshi Sayuri)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：50567360