

乳癌の術後解析

平野 明

日本医科大学 老人病研究所分子生物学部門

Molecular Diagnosis of Breast Cancer

Akira Hirano

Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

はじめに

乳癌はホルモン療法、化学療法が奏効する癌であり、術後の治療方針を決定するうえで再発や治療感受性の予測は不可欠である。乳癌における従来の予後因子としては腋窩リンパ節転移、腫瘍径、ホルモン（エストロゲン、プロゲステロン）レセプター活性などが挙げられる。しかし予後が良いとされる n0(組織学的リンパ節転移陰性)乳癌でも 10~20% の術後再発が認められ、予後の正確な予測は困難である。そこで補助療法を効果的に行うために術後再発の high risk group を選別するための新しい予後診断法が求められている。

われわれは乳癌における染色体欠失と予後の相関について大規模な前向き研究を行い、特定の領域の染色体欠失が予後因子となることを明らかにした。さらに、昨年より東大医科学研究所と共同で cDNA マイクロアレイを用いた乳癌の発現解析を行っている。ここでは乳癌の分子生物学的診断、というテーマで(1)予後因子としての染色体欠失と(2)cDNA マイクロアレイを用いた乳癌遺伝子発現解析の2点についてわれわれの施設の研究結果を中心に紹介する。

(1) 乳癌における染色体欠失と予後

染色体異常はさまざまな癌で高頻度に認められる。なかでも癌組織における染色体共通欠失領域には癌抑制遺伝子の存在が示唆される。われわれは、150以上の DNA マーカーを用い、乳癌組織の染色体欠失を調べた結果、18の共通欠失領域を同定した。さらに504例の乳癌手術症例の癌組織の染色体欠失(LOH:ヘテロ接合性の消失)を18領域にて検索し、LOHの有無と生存率との関連を検討した。その結果、1p34、3p25、8p22、13q12、17p13.3、17q21.1の各領域でLOHを認める症例がLOHを認めない症例に比べ有意に生存率が低率であった(図1)。多変量解析においても、1p34、

3p25、17p13.3のLOHが腫瘍径、リンパ節転移と同様に乳癌の独立した予後因子であることが確認された(表1)。予後(癌死亡)に関して各領域のLOH(+)症例のLOH(-)症例に対する相対危険度は2倍であった。

(2) マイクロアレイを用いた乳癌の遺伝子発現解析

ヒトゲノムプロジェクトの進展により現在数万個の遺伝子が単離されつつあるが、従来の手法では数万遺伝子の発現を同時に解析することは不可能であった。しかし、マイクロアレイの実用化により多数の遺伝子発現を同時に解析することが可能となり、ここ数年マイクロアレイを用いた研究の報告が散見されるようになった。われわれは東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村研究室の協力を得て9216遺伝子を解析可能なcDNA マイクロアレイを用いて乳癌10例の遺伝子発現解析を行い、新規乳癌関連遺伝子群を同定した。

ここではわれわれの行っている方法について簡略に述べる。

表1 多変量解析:6領域のLOHと病学的リンパ節転移、腫瘍径の8項目を共変量として解析した

因子	生存率		
	p	相対危険度	95%CI
腫瘍径	0.0405	3.7	1.1 13.2
リンパ節転移	0.0002	5.0	2.2 11.5
1p34; LOH	0.0421	2.1	1.0 4.2
3p25; LOH	0.0129	2.1	1.2 3.9
8p22; LOH	0.1121	1.8	0.9 3.5
13q12; LOH	0.0636	1.9	1.0 3.8
17p13.3; LOH	0.0242	2.0	1.0 3.6
17q21.1; LOH	0.0515	1.8	1.0 3.2

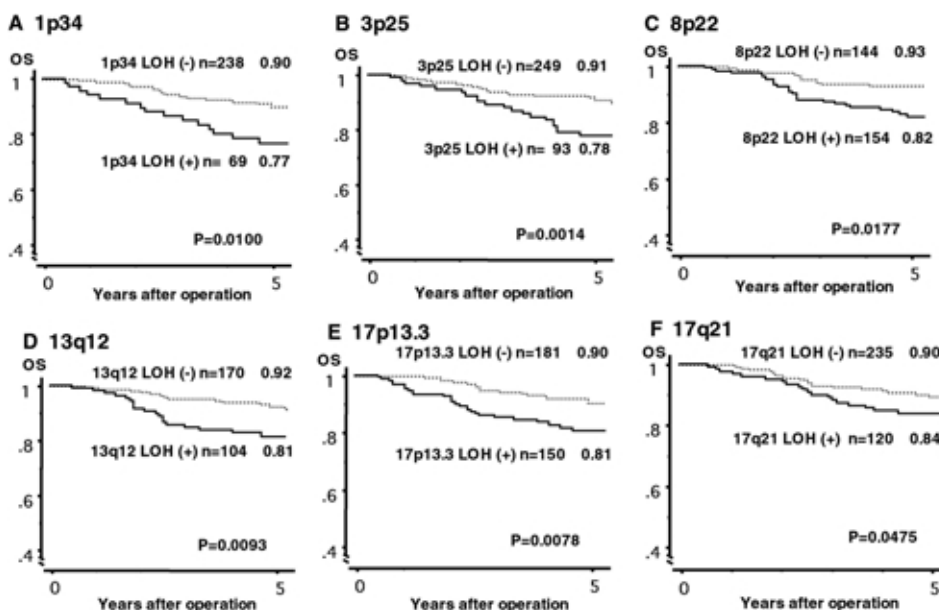


図1 LOHの有無による生存曲線の比較: Kaplan-Meier法による生存率曲線の比較をlog-rank testを用いて行った。

マイクロアレイの実際

まずターゲット cDNA として 9216 遺伝子を選択し, RT-PCR 法で増幅, 精製した. cDNA は Generation III microarray spotter を用いて Type 7 glass slide 上に duplicate でスポットした. 腫瘍組織および正常乳腺組織から Trizol を用いて total RNA を抽出・精製した後, total RNA 2 mg を T 7 RNA polymerase にて 2 回増幅した. 10 mg の増幅 RNA を Cy 3-もしくは Cy 5-dCTP にてラベルした後 40 で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った. スライドは 1×SSC と 0.2% SDS, 0.1×SSC と 0.2% SDS, 0.1×SSC の順でウォッシュした後, GenePix 4,000A にて Cy3 と Cy5 の波長をスキャンした(図2). 各スポットの信号強度は GenePix Pro version 3.0 にて数値化し, housekeeping gene とソフトウェアの normalization factor を用いて補正した. 正常乳腺組織に比して発現比 2.0 以上を過剰発現, 0.5 以下を発現低下とした. 全症例の発現比をマイクロアレイデータの解析ソフト, Genespring でクラスター解析した(図3).

その結果, 10 例中 6 例以上で発現上昇を認めた 92 遺伝子と 10 例中 9 例以上で発現低下を認めた 189 遺伝子を乳癌関連遺伝子として同定した. 全例で発現上昇を認めたのは 8 遺伝子, 全例で発現低下を認めたのは 67 遺伝子であった. また, c-erbB 2 発現上昇例は 4 例であった.

共通して発現の上昇する遺伝子群の中でも X box binding protein-1 (XBP-1) は estrogen receptor α (ER α) と連動して発現上昇する転写因子であり, 乳癌のホルモン依存性に関わっている可能性が示唆され

た. また CAB1 は 17q12 に位置し c-erbB 2 と共に遺伝子増幅のみられる遺伝子であるが, erbB 2 陰性乳癌でも過剰発現していることから遺伝子増幅以外の機序で発現が上昇している可能性も考えられた. また, 共通して発現の低下する遺伝子群の中に TGF β II Receptor が含まれていた. 同遺伝子は腫瘍増殖を抑制する一種の癌抑制遺伝子として作用することが知られている. TGF β II Receptor の発現低下は乳癌のみならず卵巣癌においてもみられることから, 同遺伝子の失活は多種の癌と密接に関係していると思われる. 乳癌の 10~30% に過剰発現を認める c-erbB-2 は Growth Factor Receptor の一種で oncogene である. 今回の検討では 10 例中 4 例で過剰発現を認めた. 他に複数の oncogene や Matrix-metalloprotease が乳癌において高率に過剰発現していることが示された.

今回のマイクロアレイ解析により同定した乳癌関連遺伝子の中には既知の oncogene や tumor suppressor gene の他に, その機能から癌関連候補と考えられる遺伝子が多数含まれており, これらの遺伝子は乳癌の分子生物学的診断に有用なマーカーとなる可能性を秘めている. 今後は症例を増やして各遺伝子の発現定量や大規模クラスターリング解析を行う予定である.

おわりに

乳癌の分子生物学的研究はマイクロアレイ等の新技術の導入により新たな局面を迎えつつある. 今後, 発癌や癌進展のメカニズムの解明がさらに進み, 効果的な予後診断法, 治療法が確立されることを期待したい.

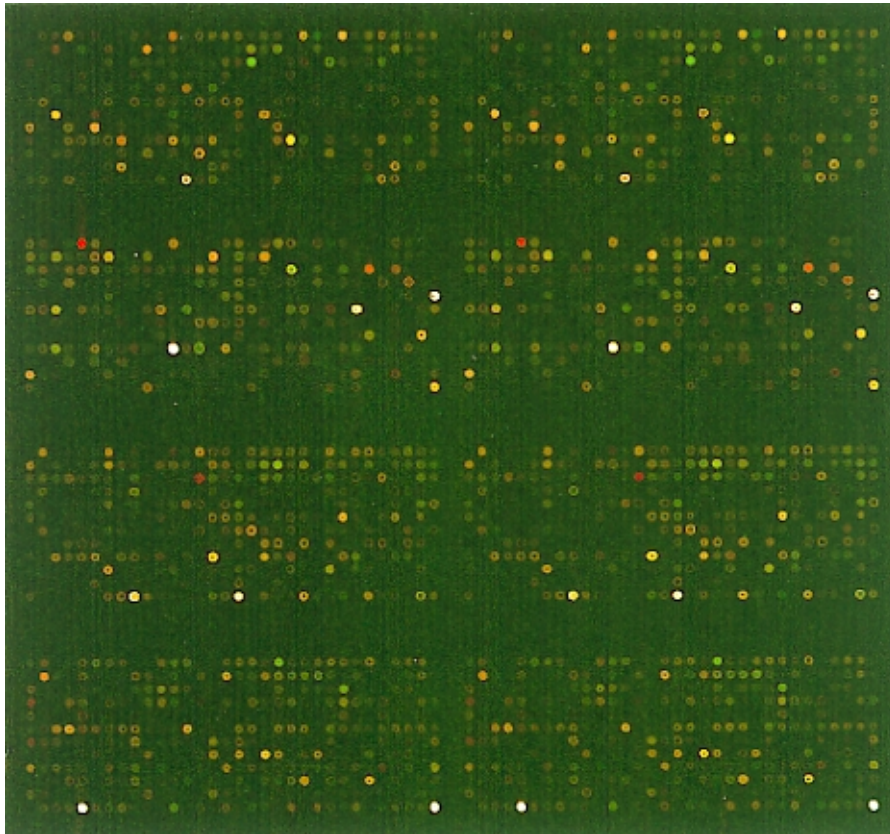


図2 マイクロアレイのイメージ画像：実際に蛍光強度をスキャンしたスライドガラスをイメージ画像化したものである。緑のスポットは癌で発現が増えている遺伝子，赤は発現が減っている遺伝子，黄色は正常と同程度の遺伝子を表している。

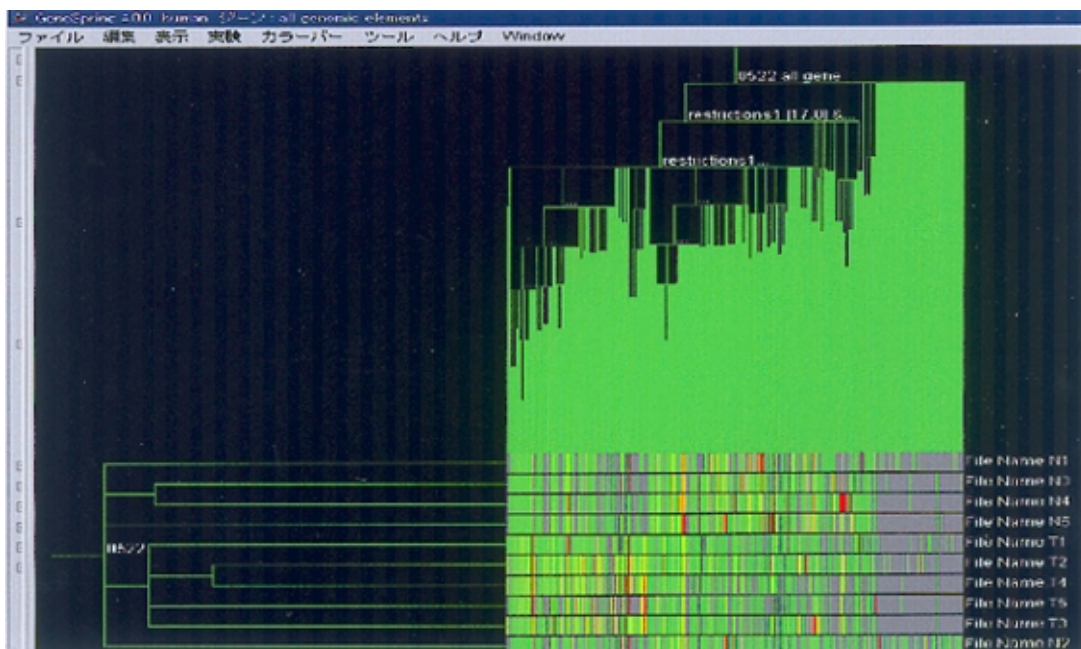


図3 クラスタ解析：データ解析ソフト，Genespring を用いたクラスタ解析の結果で，横軸に遺伝子のクラスタ，縦軸に症例のクラスタを並べたものである。

(受付：2001 年 8 月 16 日)

(受理：2001 年 8 月 16 日)