



Title	エストロゲン受容体陽性乳癌の生物学的特性と予後に関する研究
Author(s)	石田, 直子
Description	配架番号 : 2359
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12980号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12980
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70258
Type	doctoral thesis
File Information	Naoko_Ishida.pdf



学 位 論 文

エストロゲン受容体陽性乳癌の生物学的特性 と予後に関する研究

(Analysis of biological characteristics and prognosis in
estrogen receptor-positive breast cancer)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

石田 直子

学 位 論 文

エストロゲン受容体陽性乳癌の生物学的特性 と予後に関する研究

(Analysis of biological characteristics and prognosis in
estrogen receptor-positive breast cancer)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

石田 直子

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
緒言	3 項
略語表	11 項
実験方法	12 項
実験結果	17 項
考察	43 項
総括および結論	47 項
謝辞	48 項
引用文献	49 項

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の学術雑誌に投稿中である

1. Naoko Ishida, Motoi Baba, Yutaka Hatanaka, Kanako Hagio, Hiromi Okada, Kanako C Hatanaka, Kenichi Togashi, Yoshihiro Matsuno, Hiroko Yamashita
PIK3CA mutation, reduced AKT serine 473 phosphorylation, and increased ER α serine 167 phosphorylation are positive prognostic indicators in postmenopausal estrogen receptor-positive early breast cancer
Oncotarget

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 石田 直子、細田 充主、馬場 基、市之川 一臣、郭 家志、萩尾 加奈子、畑中 豊、岡田 宏美、松野 吉宏、山下 啓子：
ER 陽性 HER2 陰性乳癌におけるアンドロゲン受容体、ビタミン D 受容体発現の意義
第 23 回日本乳癌学会総会 2015 年 7 月 2-4 日（東京）
2. 石田 直子、畑中 豊、富樫 謙一、松野 吉宏、山下 啓子
ホルマリン固定・パラフィン包埋（FFPE）乳癌組織を用いた *PIK3CA* 遺伝子変異の検討
第 61 回日本病理学会秋期特別総会 2015 年 11 月 5-6 日（東京）
3. 石田 直子、馬場 基、萩尾 加奈子、郭 家志、押野 智博、笠原 里紗、奈良 美也子、畑中 豊、松野 吉宏、山下 啓子
ER 陽性乳癌組織における *PIK3CA* 遺伝子変異、AKT および ER のリン酸化の検討
第 25 回日本乳癌学会総会 2017 年 7 月 13-15 日（福岡）

4. Naoko Ishida, Motoi Baba, Yutaka Hatanaka, Kanako Hagio, Hiromi Okada, Kanako C Hatanaka, Kenichi Togashi, Yoshihiro Matsuno, Hiroko Yamashita

PIK3CA mutation, reduced AKT serine 473 phosphorylation, and increased ER α serine 167 phosphorylation are positive prognostic indicators in postmenopausal estrogen receptor-positive early breast cancer.

San Antonio breast cancer symposium (SABCS)

December, 5-9, 2017. San Antonio, USA

緒言

① 論文の背景

1) 乳癌の intrinsic subtype と免疫組織化学法による代替定義

乳癌の臨床ではこれまで、原発巣腫瘍径、所属リンパ節転移、核グレード、乳癌組織における ER、PgR、HER2 の発現を評価して、予後予測・補助薬物療法の決定がなされてきた。2000 年に Perou らがマイクロアレイを用いて乳癌組織における遺伝子発現プロファイリングを行い、乳癌は生物学的に異なる複数のサブタイプに分けられるという intrinsic subtype の概念を提唱した¹。その後の研究により、luminal A、luminal B、HER2 陽性、basal like の 4 つのサブタイプに分けられた(図 1 参照)²。サブタイプ毎に予後や薬物療法の感受性が異なることが示され、サブタイプ分類は補助薬物療法選択に有用とされた。しかし、日常臨床において遺伝子発現プロファイリングを行うことは困難であるため、一般的な病理検査で得られる免疫組織化学法を主体とした ER/PgR/HER2/Ki67 情報に基づく代替的 intrinsic subtype 分類³が提唱された⁴。現在、実臨床においてはこの代替的 intrinsic subtype 分類を考慮して治療選択が行われている(表 1)。

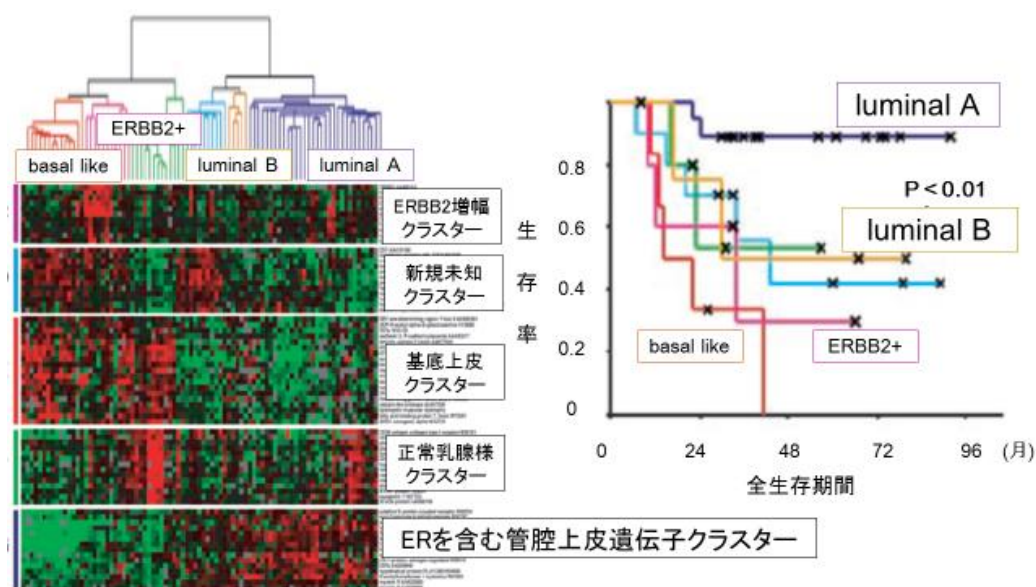


図 1. 乳癌の intrinsic subtype
(文献²より引用・改編)

表 1. 乳癌の intrinsic subtype と代替定義および推奨療法

intrinsic subtype	臨床病理学的代替定義	推奨療法	特記事項
luminal A	`luminal A-like` ①—③すべてを満たす ① ER 陽性かつ PgR 陽性 ② HER2 陰性 ③ Ki67`低値` 多遺伝子診断で再発リスク低	大部分で 内分泌療法単独	以下は化学療法 を考慮 ① 組織学的異型度 3 ② リンパ節転移 4 個 以上など
luminal B	`luminal B-like (HER2 陰性)` ER 陽性かつ HER2 陰性 かつ以下のいずれかが該当 Ki67`高値` PgR`陰性か低値` 多遺伝子診断で再発リスク高 `luminal B-like (HER2 陽性)` ER 陽性かつ HER2 陽性	内分泌療法 大部分で 化学療法追加 化学療法 + 抗 HER2 療法 + 内分泌療法	
HER2 -過剰発現	`HER2 陽性 (非 luminal)` HER2 陽性かつ ER 陰性かつ PgR 陰性	化学療法 + 抗 HER2 療法	抗 HER2 療法は pT1b 以上 または リンパ節転移陽性 症例に適応
basal-like	`Triple negative (ductal)` ER 陰性かつ PgR 陰性かつ HER2 陰性	化学療法	

(文献⁴より抜粋・改編)

2) ER 陽性早期乳癌における補助薬物療法

早期乳癌の約 80%は ER (Estrogen receptor)陽性である⁵⁻⁷。ER 陽性乳癌はエストロゲン依存性に癌が増殖・進展する。閉経前女性の体内のエストロゲンの大部分は卵巣で産生されるが、閉経後は主に脂肪組織に存在するアロマターゼにより、副腎由来のアンドロゲンからエストロゲンに変換される。ER 陽性早期乳癌における標準補助内分泌療法は、閉経前症例は ER におけるエストロゲンとの競合阻害薬である Selective estrogen receptor modulator (SERM)、閉経後はアロマターゼ阻害薬の 5 年間投与である。前述した代替的 intrinsic subtype 分類では ER 陽性乳癌を luminal A-like と luminal-B like に分類する。実臨床において、代替的 intrinsic subtype 分類による luminal B-like 症例は、術後 5 年以内の早期再発リスクが高いと考えられ内分泌療法に加え補助化学療法が行われる⁴。

しかし、術後 5 年以内に再発する早期再発症例、術後 5 年経過後に再発する晩期再発症例を少なからず経験する^{8,9}。代替的 intrinsic subtype 分類による予後予測は限界があり、Oncotype DX、PAM50、Endopredict、Breast cancer index など多重遺伝子診断を用いた予後予測法・補助療法効果予測法が開発されるようになった。しかし、いずれの手法も高額であり、本邦では保険収載されておらず実臨床への導入は限定的である^{10,11}。

3) 乳癌における Androgen receptor と vitamin D receptor の発現

Androgen receptor (AR)、vitamin D receptor (VDR)は ER 同様、核内受容体である。AR、VDR とともに乳癌組織での発現が報告されている¹²⁻¹⁴。Santagata らは正常乳腺組織において上皮マーカーの系統的な分析を行い、ER、AR、VDR の発現は正常乳管上皮の分化と関連することを発見した。この情報を元に ER、AR および VDR の 3 つの Hormone receptor (HR) の発現状況により乳癌を HR0、HR1⁺、HR2⁺、HR3⁺の 4 つのタイプに分類した。さらに、長期経過観察された大規模コホート研究の症例群に、HR 分類を適用し予後との関連を検討した。その結果、ER、AR、VDR 3 つ全ての受容体が発現する HR3⁺では最も予後が良く、全ての受容体が発現しない HR0 は最も予後不良であり HR 分類は予後と関連することが示された (図 2)¹⁵。

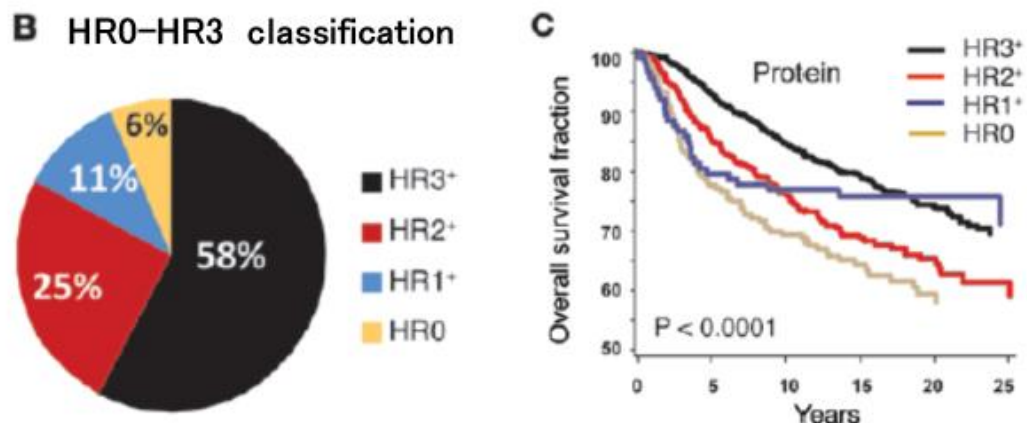


図 2. HR 分類と予後¹⁵

Santagata らは ER、AR および VDR の 3 つの HR の発現状況により乳癌を HR0、HR1⁺、HR2⁺、HR3⁺ の 4 つのタイプに分類した。大規模コホート研究の症例群に HR 分類を適用し、予後との関連を検討した。ER、AR、VDR 3 つ全ての受容体が発現する HR3⁺ では最も予後が良く、全ての受容体が発現しない HR0 は最も予後不良であった。

3) *PIK3CA* 遺伝子変異

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は p85 調節サブユニットと p110 α 触媒サブユニットから成るヘテロ二量体タンパク質である。受容体型チロシンキナーゼが増殖因子刺激などにより活性化されると細胞膜直下にリクルートされ、膜に存在する脂質をリン酸化する役割を担っている。PI3K の活性化はその下流にある分子を介して細胞分化、細胞増殖や代謝、細胞遊走、細胞骨格の再構築など多様な生物活性を引き起こすことが知られている¹⁶。

PIK3CA 遺伝子は PI3K の p110 α 触媒サブユニットをコードする遺伝子である¹⁷。近年、次世代シーケンサーの進化により大規模な症例群におけるゲノムの複数の体細胞変異が解析され、乳癌の driver 遺伝子が検索されている。中でも *PIK3CA* 遺伝子変異は特に ER 陽性乳癌において最も高頻度に報告される体細胞変異であり、40~45%に認めるとされている^{18,19}。*PIK3CA* 遺伝子変異は Helical domain の E542K, E545K と Kinase domain の H1047R という 3 つの Hot spot が知られており *PIK3CA* 遺伝子変異の 8 割以上を占めるとされる(図 3)。Hot spot のいずれも機能獲得型変異とされている^{20,21}。

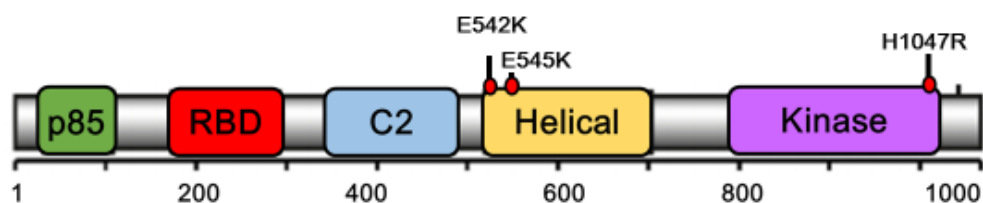


図 3. *PIK3CA* 遺伝子変異の hot spot

PIK3CA 遺伝子変異は Helical domain の E542K, E545K と Kinase domain の H1047R という 3 つの Hot spot が *PIK3CA* 遺伝子変異の 8 割以上を占め、いずれも機能獲得型変異とされている^{20, 21}。

4) PI3K/AKT/mTOR 経路と ER とのクロストーク

ER は核内受容体である。ER の古典的な作用は「Genomic action」と呼ばれ、主にリガンドであるエストロゲンが核内の ER に結合し転写因子として機能するとされる。一方、成長因子受容体経路による ER の活性化は「Non-genomic action」と呼ばれる²² (図 4)。

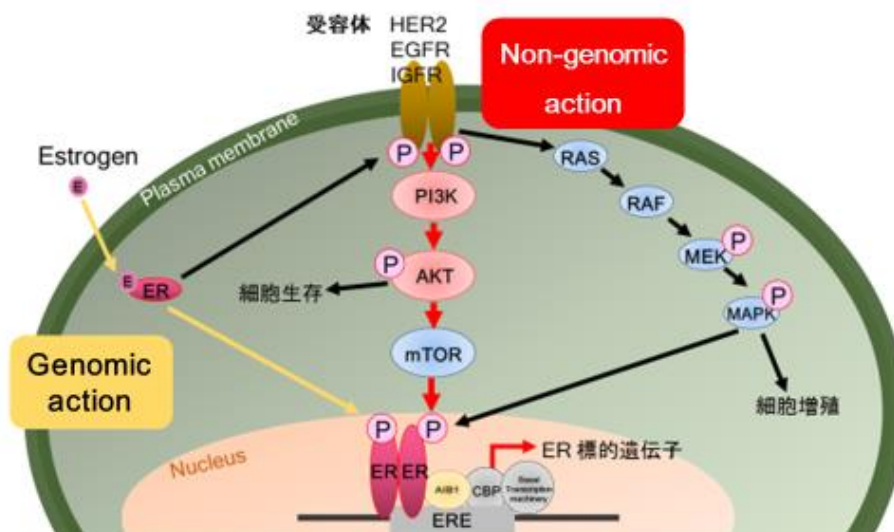


図 4. Genomic action と Non-genomic action

Genomic action : リガンドであるエストロゲンが核内の ER に結合し転写因子として機能する。**Non-genomic action** : 成長因子受容体経路により ER がリン酸化 (活性化) される²²。

ER 陽性乳癌細胞を長期間エストロゲン枯渇状態で培養するとエストロゲンがない状態でも増殖可能となる。このとき PI3K/AKT/mTOR 経路が活性化し ER の活性化を引き起こしていると考えられている²²。この「Non-genomic action」は内分泌療法耐性メカニズムの一つと考えられている。

mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害薬であるエベロリムスは

既に本邦でも進行乳癌を対象に市販されている。さらに、現在 PI3K 阻害薬、AKT 阻害薬、mTOR 阻害薬の有効性を検証する臨床試験が進行乳癌を対象に行われている段階である。PIK3CA/AKT/mTOR 経路阻害薬は早期乳癌に対し臨床でまだ用いられていない²³⁻²⁵。

ER の転写活性化領域には複数のリン酸化部位が存在する²⁶。ER α serine 167 (ER α Ser167)は主に protein kinase B (AKT) によりリン酸化され、ER α serine 118 は主に mitogen-activated protein kinase (MAPK) によりリン酸化される (図 5)^{27, 28}。我々は以前、ER 陽性早期乳癌において ER α Ser167 の高リン酸化はエストロゲン依存性のシグナル伝達を介して起こることが示唆され予後良好であること、一方 ER α serine 118 高リン酸化症例は予後不良であると報告した^{27, 29}。本研究では、ER 陽性乳癌において高頻度に認められる *PIK3CA* 遺伝子変異と ER α Ser167 および上流のシグナル伝達因子である AKT serine 473 (AKT Ser473) の活性化について検討することとした。

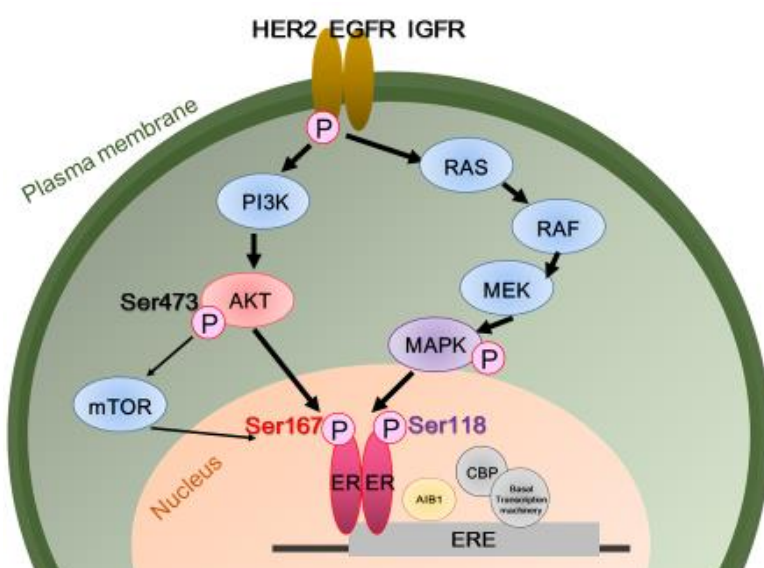


図 5. ER α Ser118、ER α Ser167 のリン酸化に関与するシグナル伝達経路

ER α serine 167 (ER α Ser167)は主に protein kinase B (AKT) によりリン酸化され、ER α serine 118 は主に mitogen-activated protein kinase (MAPK) によりリン酸化される^{27, 28}。

① テーマに関する解明されていることと解明されていないこと

ER 陽性乳癌は早期乳癌において最も多くを占める集団であるが、その再発は臨床における大きな問題である。現時点で遺伝子発現による再発リスクの予測と治療方針の決定を実臨床に用いるのは困難である。内分泌療法を含む既存の補助療法が奏効しない症例群を特定し実臨床で利用可能なバイオマーカーの同定が求められている^{8,9}。

ER 陽性乳癌の発症メカニズムと生物学的特徴は、閉経状態によって異なる可能性がある³⁰。閉経前女性の血清エストロゲンとプロゲステロンレベルは閉経後女性に比べてはるかに高い。エストロゲン依存性の増殖と ER 陽性乳癌の進行は、血清中のホルモンレベルに影響される³¹⁻³³。我々は、以前 ER 陽性 HER2 陰性乳癌組織を用いた検討を行い、閉経前乳癌と閉経後乳癌とではエストロゲン応答遺伝子 (PgR, TFF1)、プロゲステロン応答遺伝子 (RANKL)、ER 関連遺伝子 (FOXA1 および GATA3) の発現レベルが異なることを示した³⁴。

基礎研究においては PI3K/AKT/mTOR 経路が内分泌療法抵抗性に関与することが示されている³⁵。PI3K p110 α 触媒サブユニットをコードする *PIK3CA* 遺伝子の体細胞変異は特に ER 陽性乳癌で高頻度に報告され、ER 陽性乳癌の主要な Driver 遺伝子と考えられている^{19,36}。*PIK3CA* 遺伝子変異は ER 陽性乳癌における予後予測因子、上述した PI3K/AKT/mTOR 経路阻害剤の効果予測因子として期待されている。実際、*PIK3CA* 遺伝子変異の予後因子、効果予測因子としての意義について、既に多くの研究がなされているが、*PIK3CA* 遺伝子変異を測定する意義はまだ見だされていない。*PIK3CA* 遺伝子変異を有する ER 陽性乳癌において、早期乳癌における予後良好な因子としての意義と、基礎研究における内分泌療法抵抗性に関与するとの知見^{37,38}には乖離がある。

② この研究は何を明らかにするのか

今まで乳癌の臨床に用いられなかった AR、VDR の発現を測定し組み合わせること、また、ER 陽性乳癌の主要な Driver 遺伝子である *PIK3CA* 遺伝子変異に加え PI3K 下流のシグナル伝達因子の活性化を検討することにより、内分泌療法の感受性や予後を反映した ER 陽性乳癌のより適切な分類が可能かどうかを明らかにする。

③ 本研究によって何が明らかになったのか

1) ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌の生物学的特性

: 閉経前症例と閉経後症例について

- ・ *PIK3CA* 遺伝子変異は閉経前・閉経後症例ともに高頻度に生じる。
- ・ 閉経前症例は閉経後症例に比べて AKT Ser473 のリン酸化レベルは有意に高く、AR の発現レベルが有意に低かった。閉経前乳癌と閉経後乳癌とでは活性化しているシグナル伝達経路は異なることが示唆された。

2) ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌組織における生物学的特性と予後

- ・ AR 高発現症例は閉経前症例では DFS が有意に延長したが、閉経後症例では予後に関与しなかった。
- ・ VDR の発現は閉経前・閉経後症例ともに予後に関与していなかった。
- ・ 閉経後症例では、*PIK3CA* 遺伝子変異症例は wild-type と比較し有意に Disease-free survival (DFS) が長かった。一方、*PIK3CA* 遺伝子変異は閉経前では予後に関与しなかった。
- ・ 閉経後乳癌において、AKT Ser473 および ER α Ser167 のリン酸化状態によって *PIK3CA* 遺伝子変異が予後に及ぼす影響は異なることが示された。これらの結果は ER 陽性 HER2 陰性乳癌の予後の改善、および現在開発されている PI3K/AKT/mTOR 阻害薬に関して何らかの知見をもたらす可能性がある。

略語表

AKT	protein kinase B
AR	androgen receptor
BMI	body mass index
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
ER	estrogen receptor
FFPE	formalin fixed paraffin-embedded
HER	human epidermal growth factor receptor
HR	hormone receptor
IHC	immunohistochemistry
Ki67 LI	Ki67 labeling index
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
pAKT	phosphorylation of AKT serine 473
pER	phosphorylation of ER α serine 167
PgR	progesterone receptor
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,-5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
Ser	serine
VDR	vitamin D receptor

実験方法

1. 対象

2008 年から 2011 年に当院で手術を施行した ER 陽性 HER2 陰性 Stage I-III 乳癌で組織学的に浸潤性乳管癌と診断された 214 例（閉経前 62 例、閉経後 152 例）を対象とした。術前療法を受けた症例、両側乳癌症例は除外した。

2. 組織検体と免疫組織化学（IHC）法

手術検体ホルマリン固定・パラフィン包埋乳癌組織から 4 μ m の薄切切片を作製してスライドにマウントし、ER、PgR、Ki67、AR、VDR 蛋白発現およびリン酸化 ER α Ser167（phosphorylation of ER α serine 167 : pER）、リン酸化 AKT Ser473（phosphorylation of AKT serine 473 : pAKT）の IHC 法による染色を行った。

IHC 法で用いた 1 次抗体と 2 次抗体を表 2 に示す。ER、PgR、AR、VDR、pER は核染色細胞率（0-100%）を評価した。HER2 は細胞膜染色をスコア 0、1+、2+、3+ で評価した。pAKT は細胞質の染色強度（0-3）と染色細胞率（0-100）の積を Histo-score に準じて評価した。Ki67 は hot spot の陽性細胞率を計測した（labeling index）。

表 2. IHC 法で用いた抗体

	1 次抗体	Species (dilution)	2 次抗体
ER	SP1, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit
PgR	1E2, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit
HER2	4B5, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit
Ki67	MIB-1, DAKO, Glostrup, Denmark	mouse monoclonal (1:200)	Dako EnVision FLEX system
AR	AR27, Novocastra, Newcastle, UK	mouse monoclonal (1:50)	Dako EnVision FLEX system
VDR	NBP1-19478, Novus, Littleton, USA	rabbit polyclonal (1:500)	Dako EnVision FLEX system
pAKT	D9E, Cell Signaling, Beverly, USA	rabbit monoclonal (1:50)	Dako EnVision FLEX system
pER	GTX50140, GeneTex, Irvine, USA	rabbit polyclonal (1:50)	Dako EnVision FLEX system

2. DNA 抽出と *PIK3CA* 遺伝子変異の測定 (図 6)

2-1. 手術検体ホルマリン固定・パラフィン包埋切片作製

手術検体ホルマリン固定・パラフィン包埋乳癌組織 (FFPE) からコバス DNA プレパレーションキット (Roche Molecular Systems) を用い以下の方法で DNA を抽出した。まず、FFPE 10 μ m 切片 4 - 8 枚を 1.5ml チューブに入れた。腫瘍の占める面積が全体の 20%未満の場合は予め Macro-dissection を行った。

2-2. DNA の抽出

切片を入れたチューブにキシレン 1ml を加え 14500rpm で 2 分間遠心し上清を廃棄した。次に、100%エタノールを加え 14500rpm で 2 分間遠心し上清を廃棄した。室温で 10 分間風乾した後に、180 μ L の DNA tissue lysis buffer と 70 μ L の Proteinase K を加え混和した。56°C で 60 分間インキュベートし、さらに 90°C で 60 分間インキュベートした。200 μ L の DNA paraffin binding buffer を加え均一に攪拌し、室温で 10 分間放置した。イソプロパノール 100 μ L を加え攪拌した。550 μ L の反応液をコレクションチューブにセットしたフィルターチューブに移し 10000rpm で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。フィルターチューブを新しいコレクションチューブに移し DNA wash buffer I を 500 μ L 添加した。10000rpm で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。DNA wash buffer II を 500 μ L 添加した。10000rpm で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。フィルターチューブを新しいコレクションチューブに移し、更に 14000rpm で 3 分間遠心し乾燥させた。フィルターチューブを 1.5ml チューブに移し、フィルターの中心部に 100 μ L の DNA elution buffer を加え 5 分間室温でインキュベートした。10000rpm で 1 分間遠心し DNA を含む溶出液を回収した。

吸光度計 (NanoDrop 2000c、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いて DNA の濃度を測定した後に、DNA specimen diluent を用い 2ng/ μ L になるように希釈した。

2-3. リアルタイム PCR 法による *PIK3CA* 遺伝子変異の検出

Cobas *PIK3CA* mutation test (Roche Molecular Systems) を用いてアレル特異的リアルタイム PCR 法で *PIK3CA* 遺伝子変異の測定を行った。Cobas *PIK3CA* mutation test は複数のプライマー及び蛍光標識したオリゴヌクレオチド・プローブを含む 3 種類の増幅試薬と検出装置である Cobas z480 を用い標的 DNA の PCR 増幅及び検出を自動で行うことができる。検査に用い

た DNA の 5%以上に遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるように設計されており、exon 1、4、7、9、20 における以下 17 種類の *PIK3CA* 遺伝子変異の測定が 9 種類の結果で自動判定される。exon 1 は R88Q、 exon 4 は N345K、 exon 7 は C420R と 1 遺伝子変異ずつの結果で判定される。exon9 は E542K、E545X (E545A, E545D, E545G, E545K を含む) および Q546X (Q546E, Q546K, Q546L, Q546R を含む) の 3 種類の結果に判定される。exon 20 は M1043I、H1047X (H1047L, H1047R, H1047Y を含む) および G1049R の 3 種類の結果に判定される。これらの *PIK3CA* 遺伝子変異はすべてミスセンス変異である。

PIK3CA 遺伝子変異の測定の手順は以下のように行った。まずは、3 種類の増幅試薬 (Master mix 1、Master mix 2、Master mix3) を調整しマイクロウェルプレートのウェルにそれぞれ分注した。次に、DNA 希釈溶液を増幅試薬の分注された 1 ウェルに 50ng ずつ (1 検体あたり 3 ウェルの計 150ng) 氷上にて分注しピペティングにて混和した。Cobas z480 を起動しマイクロウェルプレートを設置しランを開始した。増幅・検出にあたり、無効な結果が生じた場合には、DNA 抽出の過程から再試験を行った。再試験の結果も無効な結果が生じた場合は、無効な試料として分析から除外した。

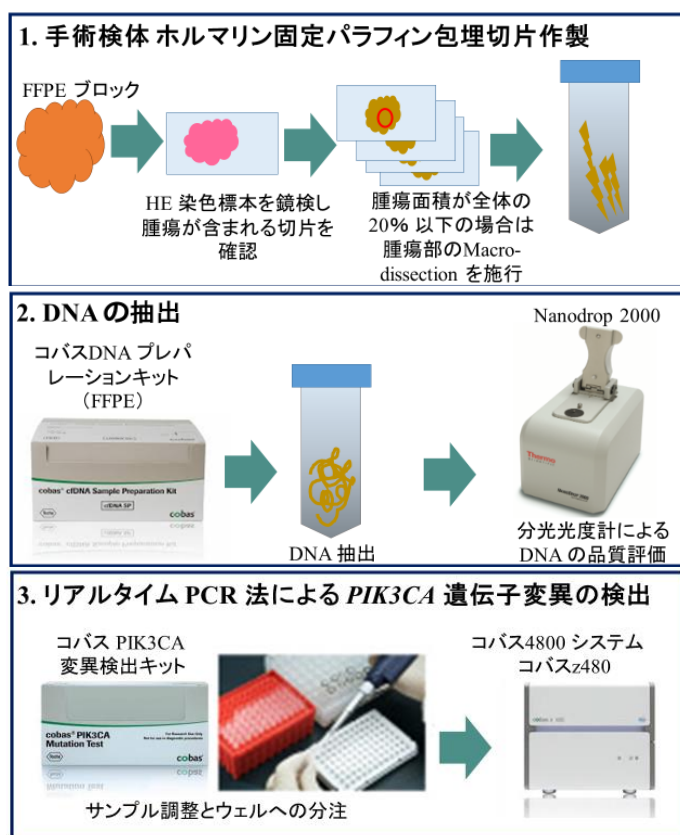


図 6. DNA 抽出と *PIK3CA* 遺伝子変異の測定

4. 統計学的解析

臨床病理学的因子および生物学的因子の2群比較に Mann-Whitney の U 検定を用いた。臨床病理学的因子と生物学的因子の相関は Spearman の順位相関係数を用いて検定し、 P 値が 0.05 未満となるものを統計学的に有意とした。生存解析には Kaplan-Meier 法を用い、生存曲線の差の検定に log-rank 検定を用いた。臨床病理学的因子および生物学的因子の多群比較は Bartlett 検定で等分散性を評価の後、パラメトリックな因子は Steel 検定、ノンパラメトリックな因子は Dunnett 検定を用いて多重比較検定をおこなった。DFS の予後予測因子を調べる単変量・多変量解析の際には Cox ハザードモデルを使用した。統計解析は全てエクセル統計を用いた。

5. 倫理的事項

本研究は院内に保管されている臨床検体を用いた retrospective な検討であり、北海道大学病院自主臨床研究に申請し受理された(臨床研究番号：自 014-0200)。

実験結果

1. 患者背景

2008 年から 2011 年に当院で手術を施行した ER 陽性 HER2 陰性 Stage I-III 原発性乳癌で組織学的に浸潤性乳管癌と診断された 214 例を対象とした。術前療法をおこなった症例と、両側乳癌症例は除外した。患者背景を表 3 に示す。閉経前が 62 例、閉経後が 152 例であった。年齢の平均値は閉経前が 44.2 歳、閉経後は 63.0 歳であった。Body mass index (BMI) の平均値は閉経前が 21.8、閉経後は 24.3 であった。腫瘍径は 2.0cm 未満の症例が閉経前 47 (75.8%) 例、閉経後 102 (67.1%) 例、2.1cm-5.0cm の症例が閉経前 13 (21.0%) 例、閉経後 45 (29.6%) 例、5cm より大きい症例は閉経前 2 (3.2%) 例、閉経後 5 (3.3%) 例であり、閉経前後ともに約 7 割の症例が 2cm 未満と T1 相当であった。リンパ節転移個数については 0 個の症例が閉経前 42 (67.7%) 閉経後 113 (74.3%) 例、1-3 個の症例は閉経前 14 (22.6%) 例 閉経後 25 (16.4%) 例、4 個以上の症例は閉経前 4 (6.5%) 例 閉経後 9 (5.9%) 例、評価していない症例が閉経前 2 (3.2%) 例 閉経後 5 (3.3%) 例であり、閉経前後ともに N0 症例が約 7 割を占めていた。核 Grade については、Grade 1 症例は閉経前 18 (29.0%) 閉経後 32 (21.1%)、Grade 2 症例は閉経前 37 (59.7%) 閉経後 107 (70.4%)、Grade 3 症例は閉経前 7 (11.3%) 閉経後 13 (8.6%) 例であり、閉経前後共に Grade 1-2 の症例が約 9 割であった。

術後に何らかの内分泌療法を受けた症例は閉経前 58 (93.5%) 閉経後 145 (95.4%) であり約 9 割の症例で術後内分泌療法を受けていた。術後化学療法を受けた症例は閉経前 16 (25.8%) 閉経後 28 (18.4%) であった。

表 3. 患者背景

	閉経前	閉経後
No. of patients	62	152
Age (years), mean $\pm$ SD (range)	44.2 $\pm$ 5.5 (27-56)	63.0 $\pm$ 8.2 (42-84)
BMI, mean $\pm$ SD (range)	21.8 $\pm$ 3.7 (15.2-	24.3 $\pm$ 4.3 (14-
Tumor size		
$\leq$ 2.0 cm	47 (75.8%)	102 (67.1%)
2.1-5.0 cm	13 (21.0%)	45 (29.6%)
$>$ 5.0 cm	2 (3.2%)	5 (3.3%)
No. of positive lymph nodes		
0	42 (67.7%)	113 (74.3%)
1-3	14 (22.6%)	25 (16.4%)
$\geq$ 4	4 (6.5%)	9 (5.9%)
Unknown	2 (3.2%)	5 (3.3%)
Tumor grade		
1	18 (29.0%)	32 (21.1%)
2	37 (59.7%)	107 (70.4%)
3	7 (11.3%)	13 (8.6%)
Ki67 LI		
$<$ 14%	40 (64.5%)	101 (66.4%)
14-30%	15 (24.2%)	41 (27.0%)
$>$ 30%	7 (11.3%)	10 (6.6%)
術後薬物療法		
なし	4 (6.5%)	7 (4.6%)
内分泌療法	58 (93.5%)	145 (95.4%)
タモキシフェンのみ	21 (36.2%)	8 (5.5%)
タモキシフェン+ LHRH アゴニスト	25 (43.1%)	0
LHRH アゴニストのみ	6 (10.3%)	0
タモキシフェン+ LHRH アゴニスト	1 (1.7%)	0
→アロマターゼ阻害薬		
タモキシフェン→ アロマターゼ阻害薬	1 (1.7%)	1 (0.7%)
アロマターゼ阻害薬	4 (6.9%)	135 (93.1%)
アロマターゼ阻害薬→タモキシフェン	0	1 (0.7%)
内分泌療法+化学療法	16 (25.8%)	28 (18.4%)
Follow-up (months), mean $\pm$ SD (range)	76.7 $\pm$ 38.3 (6-128)	77.7 $\pm$ 30.6 (6-129)

2. IHC 法の結果

手術検体乳癌組織における AR、VDR 蛋白発現の免疫染色写真を図 7 に示す。得られた腫瘍検体は全例で IHC 法による測定が可能であった。ER、PgR、AR、VDR の平均値の比較を表 4 に、分布を図 8 に示す。閉経前症例は閉経後症例と比較し有意に PgR の発現レベルが高く、AR の発現レベルが有意に低かった。

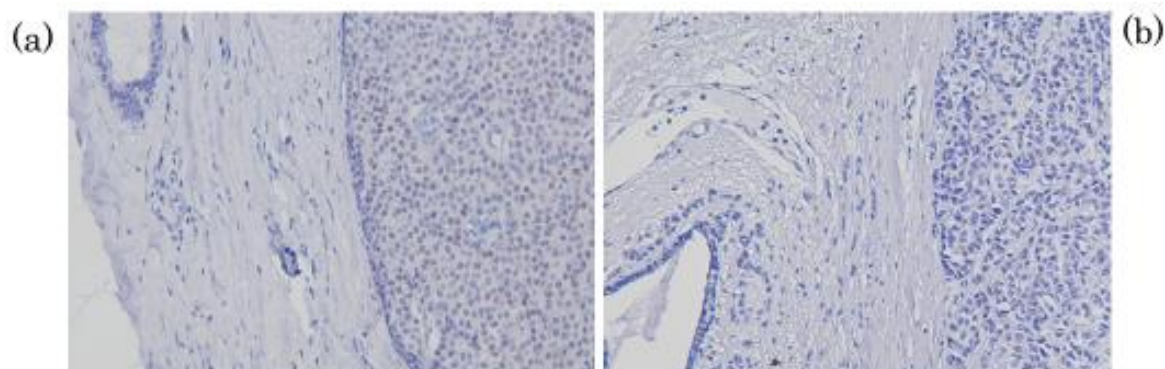


図 7. 免疫染色写真 (a)AR (b) VDR

表 4. 各生物学的因子の発現の閉経前症例と閉経後症例との比較

	閉経前 (mean ± SD)	閉経後 (mean ± SD)	<i>P</i>
ER (%)	76.6 ± 25.0	81.3 ± 22.1	0.19
PgR (%)	63.5 ± 36.1	30.2 ± 32.1	< 0.001*
AR (%)	21.9 ± 25.3	38.5 ± 31.6	< 0.001*
VDR (%)	15.3 ± 17.7	16.8 ± 14.9	0.29
Ki67 LI (%)	14.1 ± 13.1	11.9 ± 9.7	0.43
pAKT (score)	127.3 ± 86.8	94.1 ± 75.1	0.014*
pER (%)	24.1 ± 20.9	20.9 ± 18.7	0.27

閉経前症例は閉経後症例と比較し PgR の発現レベル、AKT のリン酸化レベルが高く AR の発現レベルが低い。

**P* < 0.05

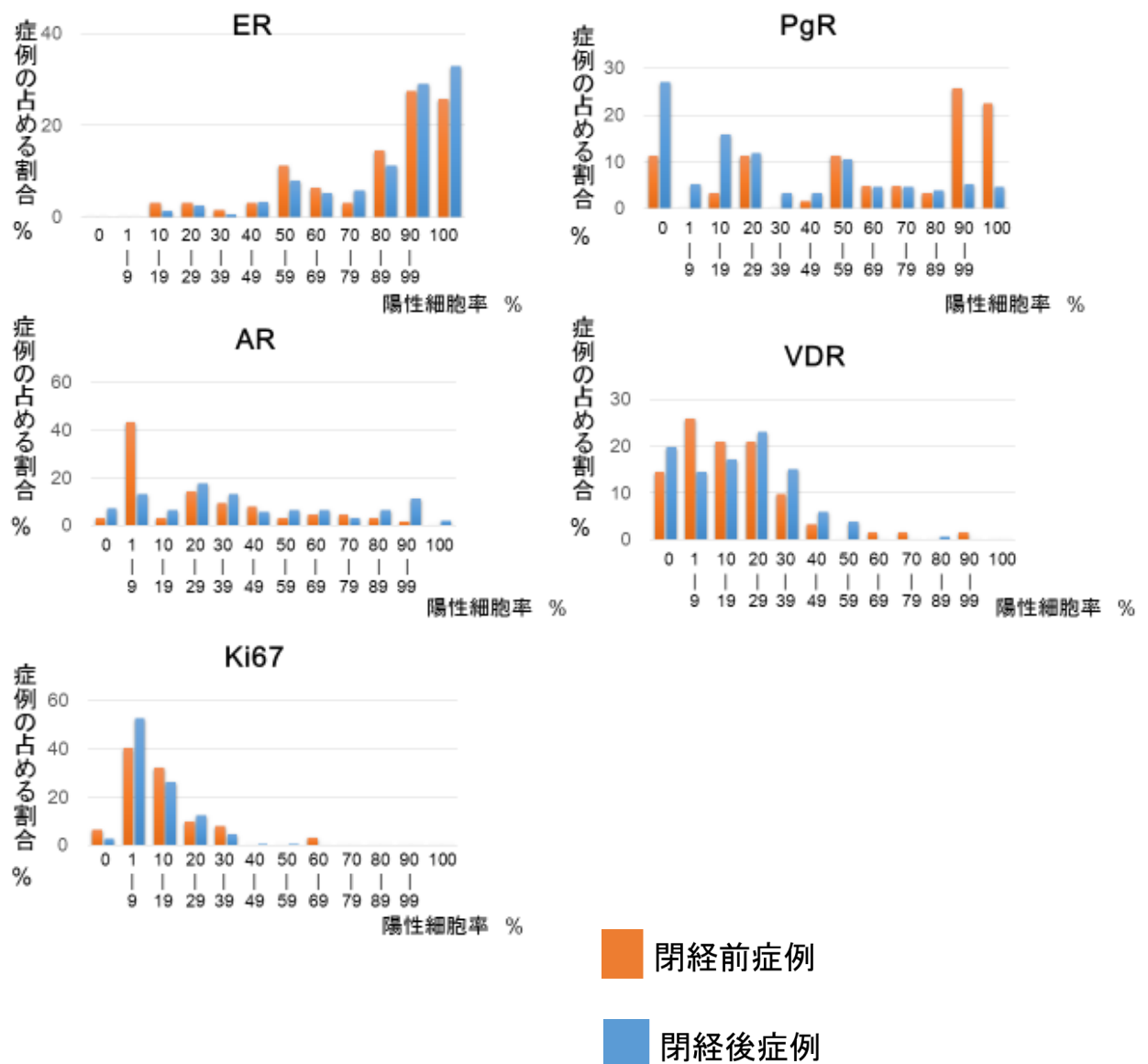


図 8. 各生物学的因子発現の分布図

閉経前症例は閉経後症例と比較し PgR の陽性細胞率が高く AR の陽性細胞率が低かった。閉経前症例、閉経後症例ともにほとんどの症例で AR が発現していた。

3. ホルモン受容体（ER、AR、VDR）の発現状況による分類と予後

背景 2 に記載した Santagata¹⁵らの報告を参考にして、ホルモン受容体の発現状況別に ER 陽性 HER2 陰性乳癌を分類し、予後が異なるかを検討した（表 5）。臨床において ER 陽陰性の閾値は 1%とされている。まず、AR、VDR の陽陰性の閾値を Santagata¹⁵らに習い 1%とした。

閉経前症例において AR 陽性例は陰性例と比較し有意に DFS が延長していた ($P = 0.0025$)。VDR 陽性例と陰性例を比較し DFS の差は認めなかった。閉経後症例においては AR、VDR とともに陽性例と陰性例を比較し DFS の差は認めなかった。

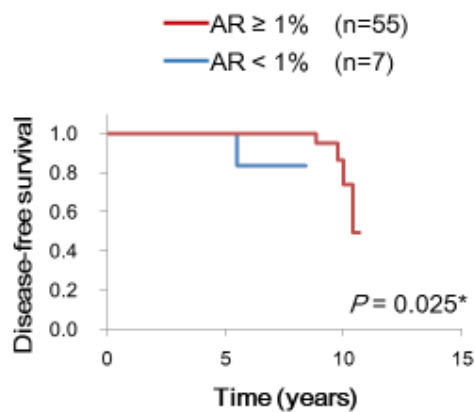
ホルモン受容体陽性数で HR 1⁺~3⁺に分類し予後を検討した（図 9）。閉経前症例では HR 1⁺~3⁺の 3 群間で有意に Disease-free survival (DFS) が異なっていた。しかし HR 2⁺、HR 3⁺、HR 1⁺の順に DFS が長くホルモン受容体陽性数と予後は相関していなかった。閉経後症例においては HR 1⁺~3⁺の 3 群間で DFS に差は認められなかった。さらに、閉経前・閉経後症例とも HR 1⁺症例は 3 例、1 例のみとごく少数であった。次に、ER、AR、VDR の陽陰性の閾値を 10%に変更し、ホルモン受容体陽性数と予後が相関するかを検討したが、閉経前後ともに HR 3⁺、HR 2⁺、HR 1⁺の 3 群間の DFS に統計学的有意差は認められなかった（図 10）。さらに、ER、AR、VDR の陽陰性の閾値をさらに変更して検討を行ったがホルモン受容体陽性数と予後とに相関は認めなかった。

表 5. AR、VDR 発現陽性を判定する閾値 (1%、10%) と症例数

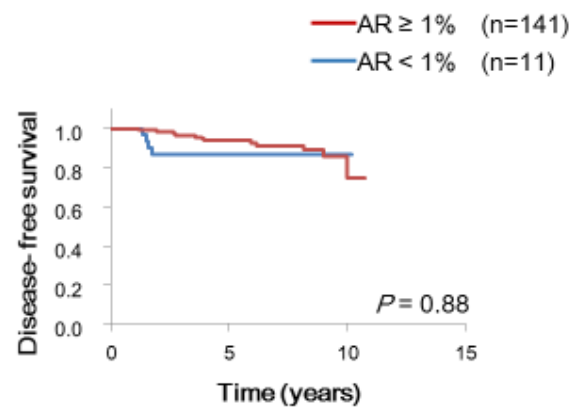
閾値 1%				閾値 10%			
		閉経前 n=62	閉経後 n=152			閉経前 n=62	閉経後 n=152
AR	≥ 1%	55 (88.7%)	141 (92.8%)	AR	≥ 10%	33 (53.2%)	121 (79.6%)
	< 1%	7 (11.3%)	11 (7.2%)		< 10%	29 (46.8%)	31 (20.4%)
VDR	≥ 1%	53 (85.5%)	122 (80.3%)	VDR	≥ 10%	37 (59.7%)	100 (65.8%)
	< 1%	9 (14.5%)	30 (19.7%)		< 10%	25 (40.3%)	52 (34.2%)
HR	3 ⁺	49 (79.0%)	112 (73.7%)	HR	3 ⁺	21 (33.9%)	82 (53.9%)
	2 ⁺	10 (16.1%)	39 (25.7%)		2 ⁺	28 (45.2%)	57 (37.5%)
	1 ⁺	3 (4.8%)	1 (0.7%)		1 ⁺	13 (21.0%)	13 (8.6%)

ホルモン受容体陽陰性の閾値を 1%とすると HR³⁺が閉経前・閉経後症例ともに 7 割以上となった。

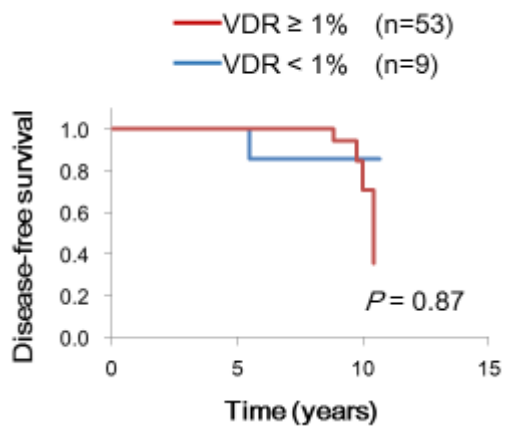
(a) 閉経前



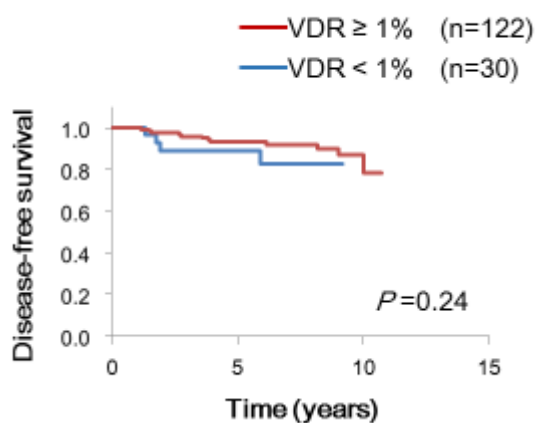
(b) 閉経後



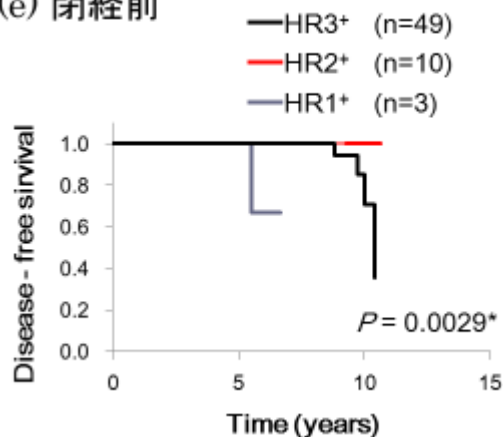
(c) 閉経前



(d) 閉経後



(e) 閉経前



(f) 閉経後

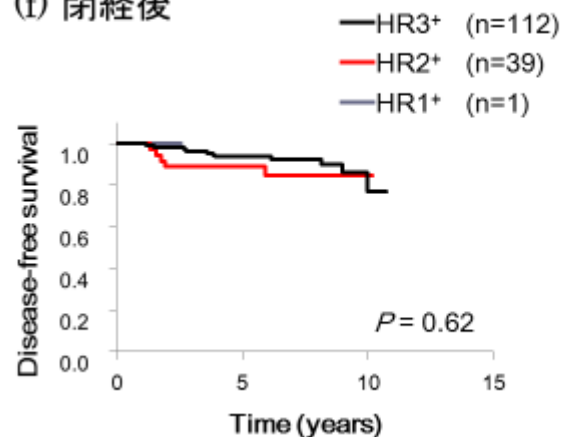
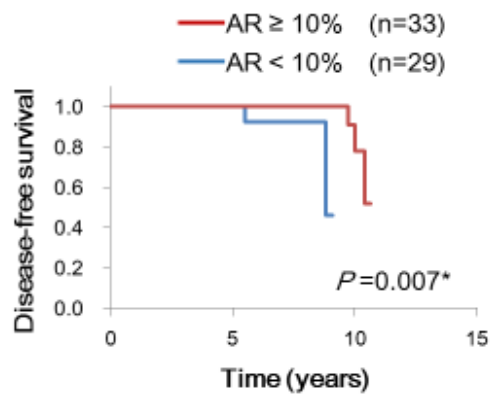


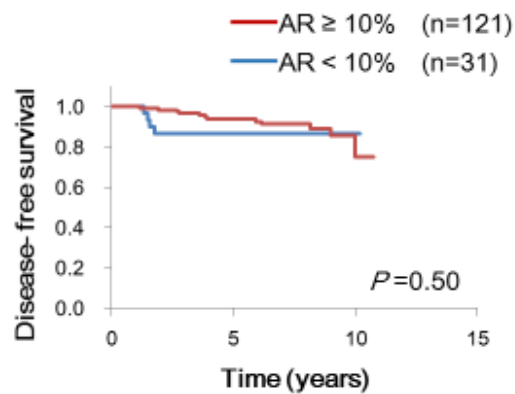
図 9. ホルモン受容体発現状況（閾値 1%）と DFS

文献¹⁵に習い HR 陽陰性の閾値を 1%とし予後を検討した。閉経前症例では AR 陽性群で有意に予後良好 ($P=0.025$) だが、VDR は予後に相関せず、閉経後症例は AR、VDR とともに予後と相関しなかった。3 つの HR 陽性数と予後は相関していなかった。* $P < 0.05$

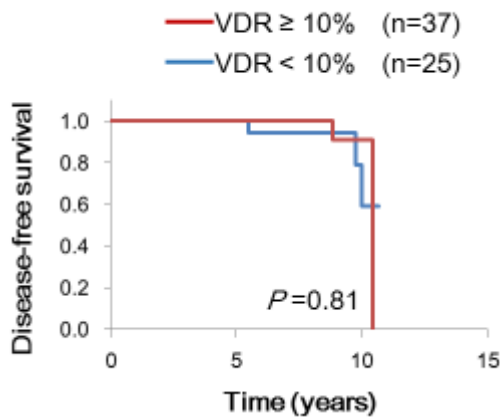
(a) 閉経前



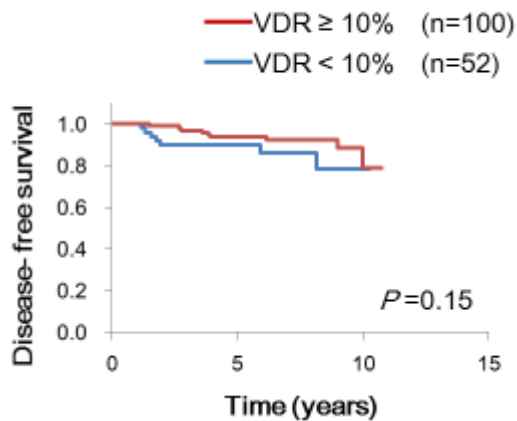
(b) 閉経後



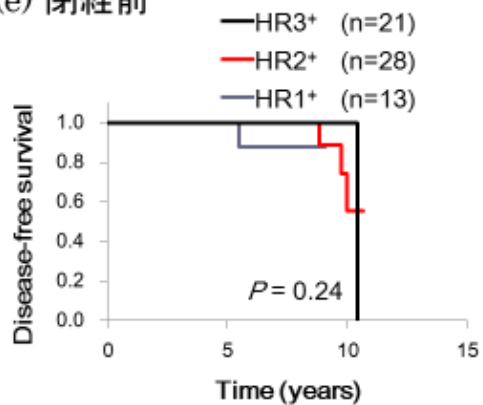
(c) 閉経前



(d) 閉経後



(e) 閉経前



(f) 閉経後

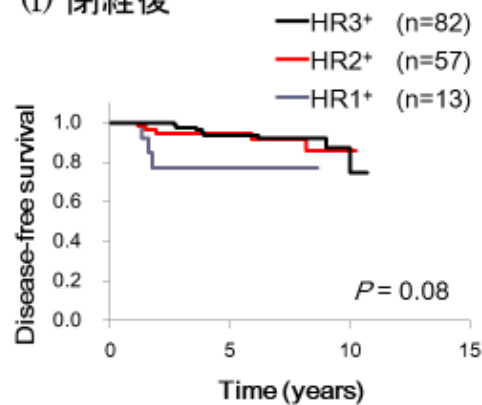


図 10. ホルモン受容体発現状況（閾値 10%）と DFS

HR 陽陰性の閾値を 10%とすると、HR 陰性症例が増えた。閉経前症例では AR 陽性群で有意に予後良好だが、VDR は予後に相関せず、閉経後症例は AR、VDR とともに予後と相関しなかった。HR 陽性数と予後は相関していなかった。

* $P < 0.05$

4. 乳癌組織における *PIK3CA* 遺伝子変異

次に *PIK3CA* 遺伝子変異の部位と頻度について表 6 に示す。214 例（閉経前 62 例、閉経後 152 例）中 *PIK3CA* 遺伝子変異が 1 か所以上に認められた症例は閉経前 29 例（46.8%）、閉経後 71 例（46.7%）であった。その内訳としては、*PIK3CA* 遺伝子変異を 1 か所認めたのは 90 例（閉経前 26 例 閉経後 64 例）、2 か所認めたのが 9 例（閉経前 3 例 閉経後 6 例）、3 か所認めたのが閉経後の 1 例であった。閉経前 31 例 閉経後 73 例の計 104 例は *PIK3CA* 遺伝子変異を認めなかった。閉経前 2 例（3.2%）、閉経後 8 例（5.3%）の計 10 例が検出不能であった。最も高頻度に変異がみられた部位は閉経前、閉経後ともに、Hot spot のひとつである H1047X であった。

表 6. *PIK3CA* 遺伝子変異の部位と頻度

				閉経前	閉経後
No. of patients				62	152
Wild-type				31 (50.0%)	73 (48.0%)
Mutant				29 (46.8%)	71 (46.7%)
Invalid				2 (3.2%)	8 (5.3%)
<i>PIK3CA</i> domain	Exon	Nucleotide change	Amino acid mutation		
Single mutation				26	64
p85-regulatory subunit-binding					
	1	263 G>A	R88Q	0	0
C2	4	1035 T>A	N345K	2	6
	7	1258 T>C	C420R	1	2
Helical	9	1624 G>A	E542K	2	1
	9	1634 A>C ^{a)} , 1635 G>T ^{b)} , 1634 A>G ^{c)} , or 1633 G>A ^{d)}	E545X (E545A ^{a)} , E545D ^{b)} , E545G ^{c)} , or E545K ^{d)})	4	15
	9	1636 C>G ^{e)} , 1636 C>A ^{f)} , 1637 A>T ^{g)} , or 1637 A>G ^{h)}	Q546X (Q546E ^{e)} , Q546K ^{f)} , Q546L ^{g)} , or Q546R ^{h)})	0	1
	20	3129 G>T	M1043I	0	0
	20	3140 A>T ⁱ⁾ , 3140 A>G ^{j)} , or 3139 C>T ^{k)}	H1047X (H1047L ⁱ⁾ , H1047R ^{j)} , or H1047Y ^{k)})	17	38
	20	3145 G>C	G1049R	0	1
Double mutations				3	6
C2 and kinase			N345K, H1047X	0	1
Helical and kinase			E542K, H1047X	1	2
			E545X, H1047X	1	2
			E545X, G1049R	0	1
			Q546X, H1047X	1	0
Triple mutations				0	1
Helical and kinase			E542K, Q546X, H1047X	0	1

PIK3CA 遺伝子変異は閉経前の 46.8%、閉経後の 46.7%と高頻度に認められた。最も高頻度に変異がみられた部位は閉経前、閉経後ともに H1047X であった。

5. 乳癌組織における AKT Ser473、ER α Ser167 のリン酸化

手術検体乳癌組織における pAKT、pER の免疫染色写真を図 11 に示す。得られた腫瘍検体は全例で IHC 法による測定が可能であった。平均値の比較を表 7 に、分布を図 12 に示す。閉経前症例は閉経後症例と比較し有意に AKT Ser473 のリン酸化レベルが高かった。

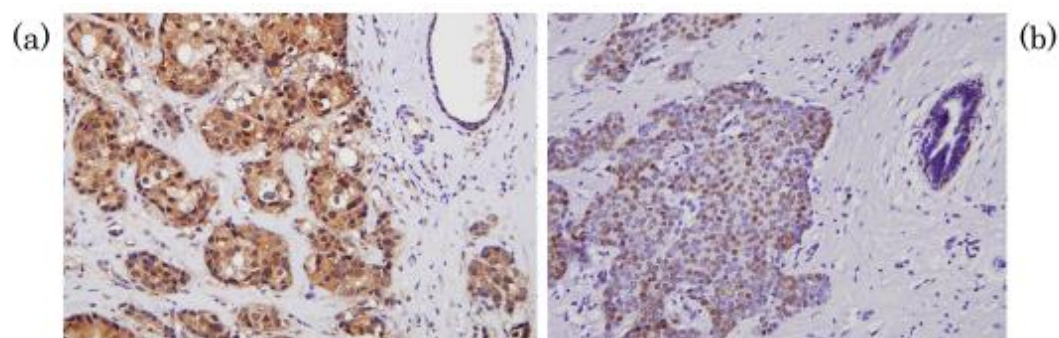


図 11. 免疫染色写真 (a)pAKT (b)pER

表 7. 各生物学的因子の発現とリン酸化の閉経前症例と閉経後症例との比較

	閉経前 (mean $\pm$ SD)	閉経後 (mean $\pm$ SD)	<i>P</i>
ER (%)	76.6 $\pm$ 25.0	81.3 $\pm$ 22.1	0.19
PgR (%)	63.5 $\pm$ 36.1	30.2 $\pm$ 32.1	< 0.001*
AR (%)	21.9 $\pm$ 25.3	38.5 $\pm$ 31.6	< 0.001*
VDR (%)	15.3 $\pm$ 17.7	16.8 $\pm$ 14.9	0.29
Ki67 LI (%)	14.1 $\pm$ 13.1	11.9 $\pm$ 9.7	0.43
pAKT (score)	127.3 $\pm$ 86.8	94.1 $\pm$ 75.1	0.014*
pER (%)	24.1 $\pm$ 20.9	20.9 $\pm$ 18.7	0.27

閉経前症例は閉経後症例と比較し pAKT（染色強度 $\times$ 陽性細胞率）が高かった。

**P* < 0.05

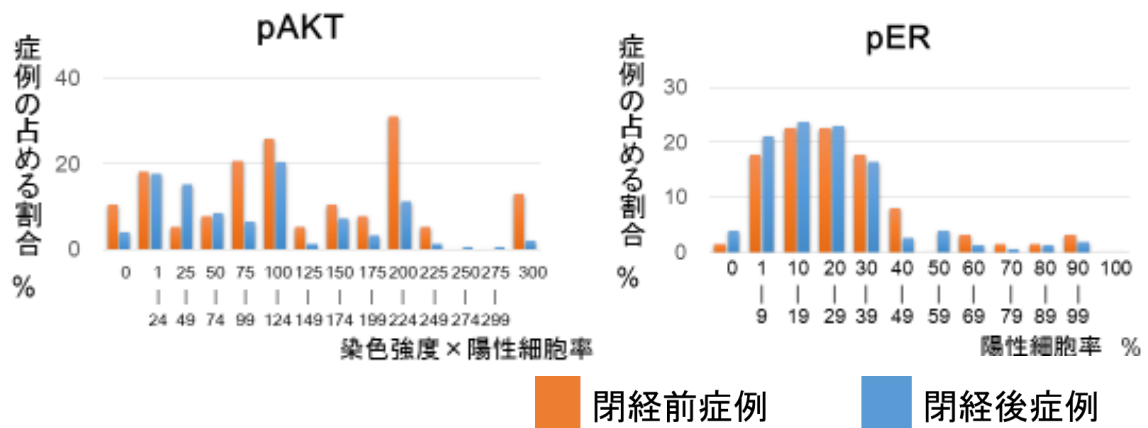


図 12. AKTSer473 のリン酸化 (pAKT) および ER α Ser167 のリン酸化 (pER) の分布図

6. 生物学的因子と臨床病理学的因子との相関

各生物学的因子同士の相関について表 8 に示す。閉経前症例において ER と PgR は正の相関 ($P = 0.005$)、pAKT は AR と負の相関 ($P = 0.004$)、Ki67 と正の相関 ($P = 0.009$) を認めた。閉経後症例において、ER と pER および AR は正の相関を認めた (それぞれ $P = 0.032$ 、 $P = 0.035$)。pAKT は pER および Ki67 と正の相関を認めた (それぞれ $P = 0.021$ 、 $P = 0.022$)。pER は AR と正の相関 ($P < 0.001$)、Ki67 と負の相関 ($P = 0.015$) を認めた。

各生物学的因子と臨床病理学的因子との相関について表 9 に示す。閉経前症例において ER、pER、PgR は臨床病理学的因子との相関は認めなかった。pER は腫瘍径、リンパ節転移と負の相関を認めた (それぞれ $P = 0.003$ 、 $P = 0.003$)。AR は Grade と正の相関を認めた ($P = 0.02$)。Ki67 は Grade と正の相関を認めた ($P = 0.006$)。閉経後症例において ER は年齢と正の相関を認めた ($P = 0.03$)。pAKT および PgR は臨床病理学的因子との相関を認めなかった。pER は腫瘍径、Grade と負の相関を認めた (それぞれ $P < 0.001$ 、 $P = 0.003$)。AR は腫瘍径および Grade と負の相関を認めた (それぞれ $P = 0.009$ 、 $P = 0.046$)。VDR は年齢、腫瘍径およびリンパ節転移と負の相関を認めた (それぞれ $P = 0.03$ 、 $P = 0.008$ 、 $P < 0.001$)。Ki67 は腫瘍径および Grade と正の相関を認めた (それぞれ $P = 0.002$ 、 $P < 0.001$)。

表 8. 各生物学的因子同士の相関

	ER	pAKT	pER	PgR	AR	VDR
閉経前						
pAKT	+0.20 ^a 0.13 ^b					
pER	+0.18 0.17	+0.11 0.41				
PgR	+0.35 0.005*	+0.14 0.28	+0.008 0.95			
AR	-0.02 0.88	-0.36 0.004*	+0.09 0.48	-0.08 0.54		
VDR	+0.05 0.71	-0.19 0.13	+0.17 0.18	+0.11 0.41	+0.15 0.24	
Ki67	-0.01 0.93	+0.33 0.009*	-0.06 0.62	-0.0001 0.1	-0.10 0.42	-0.19 0.13
閉経後						
pAKT	+0.08 0.35					
pER	+0.17 0.032*	+0.19 0.021*				
PgR	+0.28 < 0.001*	-0.03 0.73	-0.07 0.40			
AR	+0.17 0.035*	+0.15 0.06	+0.34 < 0.001*	+0.08 0.33		
VDR	+0.11 0.17	-0.003 0.97	+0.11 0.17	-0.04 0.60	+0.17 0.039*	
Ki67	+0.11 0.19	+0.19 0.022*	-0.2 0.015*	-0.04 0.59	+0.06 0.47	-0.16 0.004*

^aSpearman's correlation coefficient ^bSpearman's rank correlation test * $P < 0.05$

表 9. 各生物学的因子と臨床病理学的因子の相関

	Age	BMI	Tumor size	Lymph node status	Tumor grade
閉経前					
ER	-0.05 ^a	-0.08	-0.03	-0.08	-0.01
	0.7 ^b	0.55	0.8	0.54	0.95
pAKT	-0.13	-0.17	0.1	-0.03	-0.11
	0.32	0.18	0.45	0.8	0.4
pER	0.07	0.05	-0.37	-0.38	-0.13
	0.57	0.68	0.003*	0.003*	0.32
PgR	-0.1	-0.09	-0.14	-0.11	0.07
	0.46	0.47	0.29	0.42	0.57
AR	0.28	0.03	0.13	-0.11	0.29
	0.03*	0.84	0.3	0.42	0.02*
VDR	0.10	0.02	-0.05	-0.08	0.06
	0.46	0.86	0.71	0.57	0.64
Ki67	-0.31	-0.14	0.11	0.08	0.35
	0.01*	0.29	0.41	0.54	0.006*
閉経後					
ER	0.18	-0.01	-0.13	-0.07	-0.09
	0.03*	0.93	0.11	0.37	0.26
pAKT	-0.05	-0.12	0.02	-0.08	0.003
	0.54	0.13	0.85	0.31	0.97
pER	-0.07	-0.16	-0.35	-0.09	-0.24
	0.39	0.051	<0.001*	0.25	0.003*
PgR	0.18	0.17	0.04	-0.13	-0.05
	0.025	0.036	0.62	0.11	0.55
AR	-0.09	-0.05	-0.21	-0.02	-0.16
	0.3	0.54	0.009*	0.85	0.046 *
VDR	-0.18	-0.08	-0.21	-0.33	-0.13
	0.03*	0.36	0.008*	<0.001*	0.11
Ki67	0.07	0.13	0.25	0.12	0.3
	0.4	0.12	0.002*	0.15	<0.001*

^aSpearman`s correlation coefficient    <sup>b</sup>Spearman`s rank correlation test * $P < 0.05$

7. *PIK3CA* 遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子、予後について

PIK3CA 遺伝子変異の有無と予後について図 13 に示す。閉経前症例において *PIK3CA* 遺伝子変異の有無は予後に影響しなかった。一方、閉経後症例において *PIK3CA* 変異症例は wild-type と比較し有意に DFS が長かった ($P = 0.007$)。

PIK3CA 遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子の相関について表 10 に示す。閉経前症例において *PIK3CA* 変異症例は wild-type と比較し有意に Grade が高く、AR の発現が高く ER の発現が低い(それぞれ $P = 0.041$, $P = 0.025$)。閉経後症例において *PIK3CA* 変異症例は wild-type と比較し有意に Ki67 および pAKT が低く pER が高かった(それぞれ $P = 0.03$, $P = 0.005$, $P = 0.018$)。

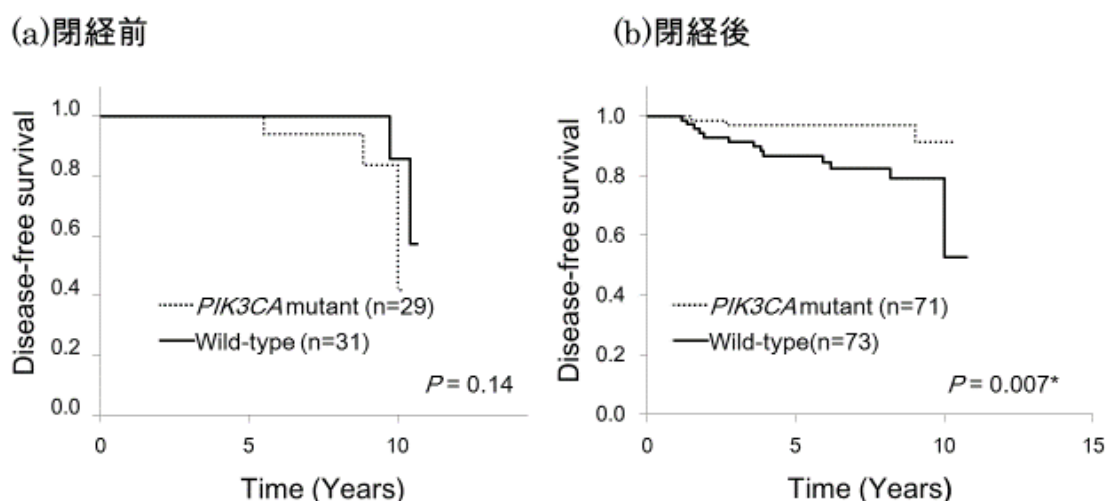


図 13. *PIK3CA* 遺伝子変異の有無による DFS

閉経前症例において *PIK3CA* 遺伝子変異の有無は予後に影響しなかった。閉経後症例において *PIK3CA* 変異症例は wild-type と比較し有意に DFS が長かった ($P = 0.007$)。

* $P < 0.05$

表 10. *PIK3CA* 遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子の相関

	閉経前		<i>P</i>	閉経後		<i>P</i>
	Mean $\pm$ SD (range) median			Mean $\pm$ SD(range) median		
	Wild-type (n=31)	<i>PIK3CA</i> any mutation (n=29)		Wild-type (n=73)	<i>PIK3CA</i> any mutation (n=71)	
Age	43.2 $\pm$ 5.9 (27-52) 42	45.4 $\pm$ 5.1 (35-56) 46	0.17	62.0 $\pm$ 8.2 (42-80) 61	63.8 $\pm$ 8.2 (47-84) 63	0.18
BMI	21.8 $\pm$ 4.1 (15.2-32.9) 20.3	21.8 $\pm$ 3.4 (16.7-32) 21.2	0.63	24.6 $\pm$ 4.4 (14-38.4) 23.6	23.8 $\pm$ 4.1 (14.2-40.9) 22.9	0.38
Tumor size (T1 T2 T3 T4)	1.2 $\pm$ 0.4 (1-2) 1	1.3 $\pm$ 0.6 (1-3) 1	0.56	1.4 $\pm$ 0.6 (1-3) 1	1.3 $\pm$ 0.5 (1-3) 1	0.34
No. of positive lymph nodes	1.0 $\pm$ 4.2 (0-23) 0	2.0 $\pm$ 4.7 (0-20) 0	0.30	0.6 $\pm$ 1.6 (0-10) 0	0.7 $\pm$ 1.9 (0-10) 0	0.90
Tumor grade	1.7 $\pm$ 0.6 (1-3) 2	2.0 $\pm$ 0.6 (1-3) 2	0.041*	2.0 $\pm$ 0.5 (1-3) 2	1.8 $\pm$ 0.6 (1-3) 2	0.051
ER (%)	83.2 $\pm$ 18.9 (40-100) 90.0	68.6 $\pm$ 29.1 (10-100) 80.0	0.025*	79.9 $\pm$ 24.1 (10-100) 90.0	83.1 $\pm$ 20.3 (20-100) 90.0	0.40
PgR (%)	65.5 $\pm$ 37.0 (0-100) 90.0	62.8 $\pm$ 34.7 (0-100) 80.0	0.44	27.7 $\pm$ 32.1 (0-100) 10.0	30.9 $\pm$ 31.1 (0-100) 20.0	0.37
pAKT (score)	146.5 $\pm$ 93.4 (0-300) 120	105.5 $\pm$ 76.9 (0-230) 100	0.14	110.2 $\pm$ 79.1 (0-300) 100	75.5 $\pm$ 65.8 (0-290) 70	0.005*
pER (%)	25.0 $\pm$ 21.3 (0-90) 20.0	23.1 $\pm$ 21.5 (1-95) 20.0	0.74	17.8 $\pm$ 17.8 (0-90) 15.0	23.4 $\pm$ 18.0 (0-90) 20.0	0.018*
AR (%)	17.4 $\pm$ 23.4 (0-80) 1.0	28.0 $\pm$ 26.8 (1-90) 20.0	0.047*	33.0 $\pm$ 28.9 (0-95) 30.0	43.6 $\pm$ 33.8 (0-100) 33.0	0.065
VDR (%)	15.4 $\pm$ 17.9 (0-95) 10.0	16.1 $\pm$ 17.9 (0-70) 10.0	0.91	15.7 $\pm$ 16.4 (0-80) 10.0	18.0 $\pm$ 13.1 (0-50) 20.0	0.13
Ki67 LI (%)	13.3 $\pm$ 13.6 (0-62.7) 10.1	15.1 $\pm$ 13.1 (1.2-61.3) 12.2	0.46	13.7 $\pm$ 10.3 (2-52.7) 10.3	10.2 $\pm$ 8.1 (0.1-35.3) 7.5	0.03*

閉経前症例で *PIK3CA* mutant は wild-type に比べて AR が高発現していた。閉経後症例で *PIK3CA* 遺伝子変異の有無と AR、VDR の発現に相関は認められなかった。**P* < 0.05

8. 閉経前症例と閉経後症例における生物学的因子と DFS の相関

閉経前症例、閉経後症例において PI3K 下流のシグナル伝達因子である AKT Ser473、ER α Ser167 のリン酸化状態と DFS の相関を検討した。高リン酸化、低リン酸化の閾値は複数検討し log rank 検定で P 値が最小となった値に設定した。pAKT の閾値は 170、pER の閾値は 15% となった。閉経前症例において pAKT、pER の高低はいずれも予後に関与しなかった。閉経後症例において pAKT が高い症例群は低い症例群と比較し有意に DFS が短かった ($P = 0.016$)。pER が高い症例群は低い症例群と比較し有意に DFS が長かった ($P = 0.0016$)。pAKT および pER と DFS との相関について図 14 に示す。

DFS に影響を及ぼす因子について Cox 比例ハザードモデルを用いた解析を表 10 に示す。単変量解析で閉経前症例において DFS に影響する有意な因子は Ki67 のみであった ($P = 0.02$)。一方、閉経後症例においてはリンパ節転移個数、Grade、Ki67、*PIK3CA* 遺伝子変異の有無、pAKT および pER が有意な因子であった (それぞれ $P = 0.04$ 、 $P = 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P = 0.02$ 、 $P = 0.02$ 、 $P = 0.02$)。これらの因子で多変量解析を行うとリンパ節転移個数、Ki67、*PIK3CA* 遺伝子変異の有無が有意な因子であり、独立した予後因子であると考えられた (それぞれ $P = 0.008$ 、 $P = 0.005$ 、 $P = 0.02$)。

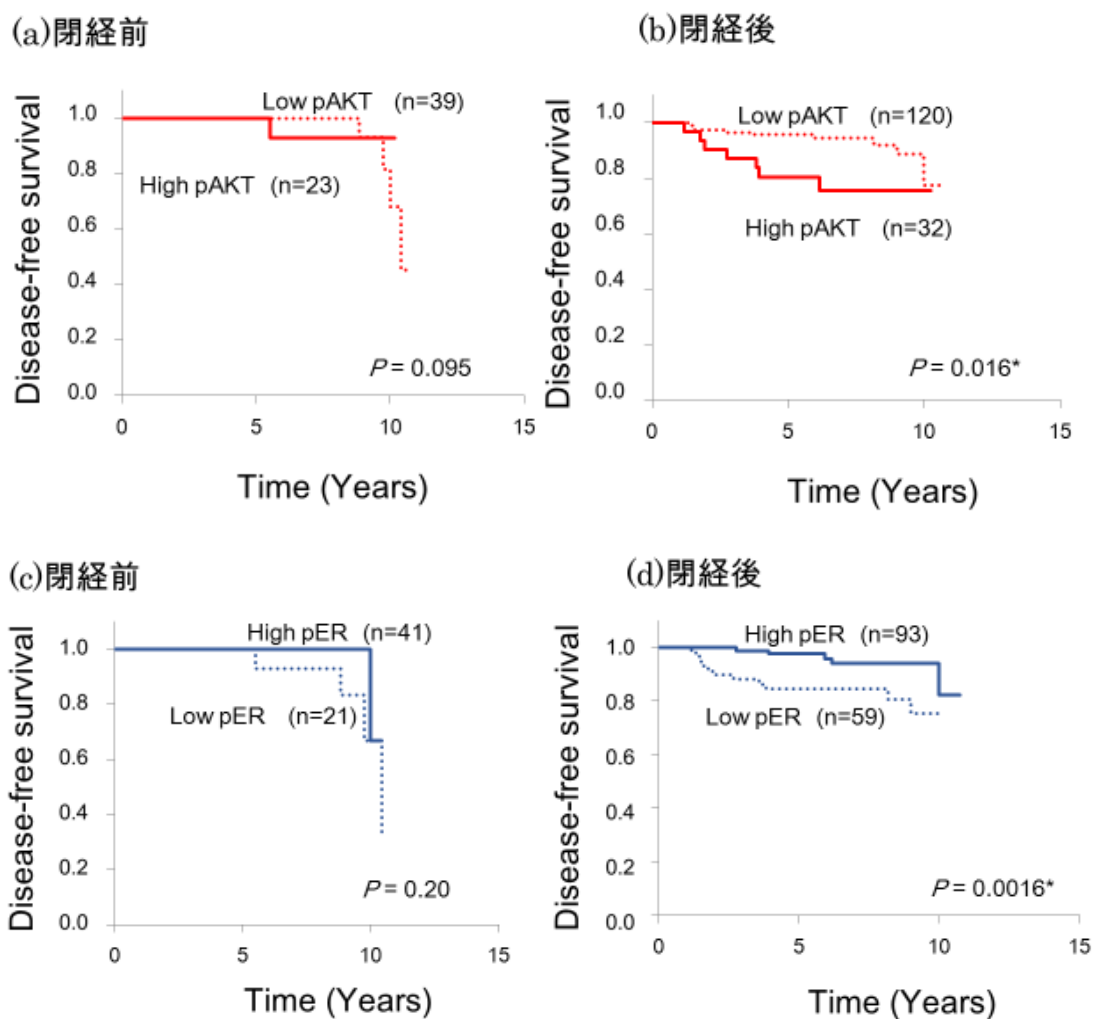


図 14. AKT Ser473、ER α Ser167 のリン酸化と DFS

AKTSer473 高リン酸化 (High pAKT) の閾値は 170、ER α Ser167 高リン酸化 (High pER) の閾値は 15%とした。閉経前症例において pAKT、pER の高低はいずれも予後に関与しなかった。閉経後症例において pAKT が高い症例群は低い症例群と比較し有意に DFS が短かった ($P = 0.016$)。pER が高い症例群は低い症例群と比較し有意に DFS が長かった ($P = 0.0016$)。

* $P < 0.05$

表 11. DFS に影響を及ぼす因子

Factor	Univariate			Multivariate		
	Hazard ratio	95% CI	P	Hazard ratio	95% CI	P
閉経前						
BMI	0.91	0.68-1.23	0.54			
Tumor size	2.16	0.65-7.10	0.21			
Lymph node status	3.23	0.87-11.9	0.08			
Tumor grade	0.6	0.13-2.77	0.52			
Ki67 LI (%)	1.08	1.01-1.16	0.02*			
PIK3CA mutation	0.21	0.02-2.07	0.18			
pAKT (<170%, 170%≥)	0.93	0.09-9.33	0.95			
pER (<15%, 15%≥)	0.26	0.03-2.35	0.23			
ER (%)	0.99	0.94-1.04	0.64			
PgR (%)	0.99	0.97-1.01	0.45			
AR (%)	0.89	0.77-1.02	0.10			
VDR (%)	1.00	0.96-1.05	0.88			
Adjuvant chemotherapy	6.53	0.70-60.85	0.10			
Adjuvant endocrine therapy	0.14	0.01-1.54	0.11			
閉経後						
BMI	1.02	0.91-1.15	0.68			
Tumor size	2.3	1.00-5.27	0.05			
Lymph node status	1.65	1.01-2.69	0.04*	1.46	1.10-1.93	0.008*
Tumor grade	3.3	1.31-8.34	0.01*	1.13	0.33-3.95	0.84
Ki67 LI (%)	1.07	1.03-1.11	< 0.001*	1.05	1.02-1.12	0.005*
PIK3CA mutation	0.21	0.06-0.73	0.02*	0.14	0.03-0.76	0.02*
pAKT (<170%, 170%≥)	3.17	1.18-8.54	0.02*	0.27	0.07-1.01	0.05
pER (<15%, 15%≥)	0.27	0.09-0.79	0.02*	2.49	0.73-8.51	0.14
ER (%)	1.01	0.99-1.04	0.40			
PgR (%)	0.98	0.96-1.00	0.05			
AR (%)	1.00	0.98-1.01	0.71			
VDR (%)	1.00	0.95-1.02	0.53			
Adjuvant chemotherapy	0.77	0.10-5.84	0.80			
Adjuvant endocrine therapy	1.5	0.48-4.66	0.48			

* $P < 0.05$

9. 閉経後症例における *PIK3CA* 遺伝子変異、AKT Ser473、ER α Ser167 のリン酸化状況別の分類

最後に、閉経後症例を *PIK3CA* 遺伝子変異、AKT Ser473、ER α Ser167 のリン酸化状況別に検討して 7 つのタイプに分類した (表 12、13)。7 つのタイプの術後 2 年再発率、術後 5 年再発率、術後 10 年再発率を表 14 に一覧表として示す。

① 閉経後 *PIK3CA* wild-type 乳癌における 4 つのタイプ

閉経後症例 *PIK3CA* wild-type における 4 つのタイプと DFS の生存曲線を図 15(a)に示す。この 4 タイプの間で多重比較検定を行い、臨床病理学的因子を比較した (表 12)。Bartlett 検定にて等分散性を評価し、ノンパラメトリックな場合は Steel 検定 (a、b、c、e、f) を、パラメトリックな場合は Dunnett 検定 (d、g) を行った。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した (a-g)。

PIK3CA wild-type/high pAKT/low pER の集団を Type A とした。Type A 症例は 8 例と少ない。Grade の中央値は 3 であり Type B の 2 と比較し有意に高い ($^aP = 0.008$)。Ki67 の平均値も 20.1 とやや高いが他のタイプと比較し有意ではなかった。リンパ節転移個数平均値は 1.6 であり有意ではないが他のタイプと比較し多い (表 12)。Type A の 2 年再発率は 37.5%、5 年再発率は 50%、全再発率も 50% であり、すべての再発は 5 年以内に生じており、再発率が高く予後不良であった (表 14)。

PIK3CA wild-type/high pAKT/high pER の集団を Type B とした。Type B は 13 例あった。前述したように Grade は Type A と比較し有意に低い。PgR の中央値は 5.0 と Type C の 30.0 と比較し有意に低い ($^bP = 0.047$)。VDR の中央値は 15.0 と Type C の 5.0 と比較し有意に高い ($^cP = 0.032$) (表 12)。13 例中 3 例が再発し、再発率は 23.1% で再発時期に特徴はなかった (表 14)。

PIK3CA wild-type/low pAKT/low pER の集団を Type C とした。Type C は 26 例あり *PIK3CA* wild type の約 1/3 を占めていた。このうち 4 例が再発し再発率は 15.4%、再発時期に特徴はなかった (表 14)。

PIK3CA wild-type/low pAKT/high pER の集団を Type D とした。Type D も 26 例で *PIK3CA* wild-type の約 1/3 を占めていた。最も予後良好な症例群であり、High pAKT/low pER 症および Low pAKT/low pER 症例と比較し有意に DFS が長かった (それぞれ $P = 0.048$ 、 $P = 0.001$)。再発率は 7.7% と低くかつすべての再発が 5 年以降の晩期に生じていた (表 14)。特徴的な臨床病理学的因子は認めなかった (表 12)。

表 12. 閉経後 *PIK3CA* wild-type 乳癌の 4 タイプと臨床病理学的因子

<i>PIK3CA</i> wild-type (n = 73)				
Type	Type A	Type B	Type C	Type D
pAKT	high	high	low	low
pER	low	high	low	high
No. of patients	8 (11%)	13 (18%)	26 (36%)	26 (36%)
	mean $\pm$ SD (range) median			
Age (years)	63.8 $\pm$ 8.0 (52-78) 63	59.4 $\pm$ 6.6 (50-74) 59	62.3 $\pm$ 9.4 (42-80) 60	62.4 $\pm$ 7.8 (50-77) 63
BMI	23.4 $\pm$ 4.2 (18.8-31.2) 22.3	23.2 $\pm$ 2.4 (19.4-28.8) 23.4	26.1 $\pm$ 4.1 (20.6-34.2) 25.7	24.0 $\pm$ 5.3 (14.0-38.4) 22.9
Tumor size (T1 T2 T3 T4)	1.6 $\pm$ 0.7 (1-3) 2	1.3 $\pm$ 0.5 (1-2) 1	1.6 $\pm$ 0.6 (1-3) 2	1.2 $\pm$ 0.4 (1-2) 1
No. of positive lymph nodes	1.6 $\pm$ 2.4 (0-6) 1	0.2 $\pm$ 0.4 (0-1) 0	0.6 $\pm$ 1.1 (0-4) 0	0.6 $\pm$ 2.0 (0-10) 0
Tumor grade	2.5 $\pm$ 0.5 ^a (2-3) 3	1.8 $\pm$ 0.4 ^a (1-2) 2	2.0 $\pm$ 0.3 (1-3) 2	1.8 $\pm$ 0.6 (1-3) 2
Ki67 LI (%)	20.1 $\pm$ 13.0 (6.8-39.8) 18.8	17.6 $\pm$ 13.3 (3.5-52.7) 19.5	10.5 $\pm$ 7.0 (2-31.7) 9.1	13.0 $\pm$ 9.6 (2-31.4) 11.0
ER (%)	80.0 $\pm$ 28.3 (20-100) 90.0	84.6 $\pm$ 24.0 (10-100) 90.0	74.2 $\pm$ 25.3 (10-100) 80.0	83.1 $\pm$ 21.9 (20-100) 90.0
PgR (%)	35.0 $\pm$ 38.2 (0-100) 20.0	16.5 $\pm$ 25.1 ^b (0-80) 5.0	42.3 $\pm$ 38.1 ^b (0-100) 30.0	16.5 $\pm$ 19.6 (0-70) 10.0
AR (%)	31.3 $\pm$ 25.7 (5-80) 25.0	42.5 $\pm$ 32.6 (1-95) 30.0	23.4 $\pm$ 21.8 (0-80) 20.0	38.3 $\pm$ 32.5 (0-95) 30.0
VDR (%)	15.0 $\pm$ 18.3 (0-50) 7.5	22.3 $\pm$ 16.3 ^c (0-50) 20.0	9.9 $\pm$ 10.5 ^c (0-30) 5.0	18.3 $\pm$ 19.4 (0-80) 15.0

a、 b、 c Steel's test (^a*P* = 0.0083、 ^b*P* = 0.047、 ^c*P* = 0.032)

② 閉経後 *PIK3CA* mutant 乳癌における 3 つのタイプ

閉経後症例 *PIK3CA* mutant における 3 つのタイプと DFS の生存曲線を図 15(b) に示す。この 3 タイプの間で多重比較検定を行い、臨床病理学的因子を比較した (表 13)。

PIK3CA mutant/low pAKT /low pER を Type F とした。Type F は *PIK3CA* mutant の中で再発をきたしている唯一の集団であり、21 例中 3 例 (14.3%) が再発をきたした。この 3 例の再発時期に特徴はなかった (表 14)。

Type E は *PIK3CA* mutant/high pAKT の集団である。High pER が 7 例、low pER が 2 例であり計 9 例と *PIK3CA* mutant 症例の中では少ない症例群である。全例無再発である (表 14)。年齢平均値は 57.2 歳と Type G と比較し有意に若い ($^dP = 0.0095$) (表 13)。

Type G は *PIK3CA* mutant/low pAKT /high pER の集団である。41 例と *PIK3CA* mutant 症例の半分以上を占め、全例無再発である (表 14)。Type G の腫瘍径の中央値は 1.2 であり Type F の 1.5 と比較し有意に小さい ($^eP = 0.0094$)。Type G の ER の平均 89.0 値は 90% であり Type F の 75.7% と比較し有意に高値であった ($^fP = 0.023$)。Type G の AR の平均値は 50.2% でありこれも Type F の 29.8% と比較し有意に高値であった ($^gP = 0.024$) (表 13)。

以上の結果をまとめ、7 つのタイプを分類した樹形図を図 16 に示す。スクエアの大きさは症例数に比例させた。5 年再発率が低いものから高い準に水色→緑→黄色→オレンジ→濃いオレンジ→赤と背景色を変化させた。

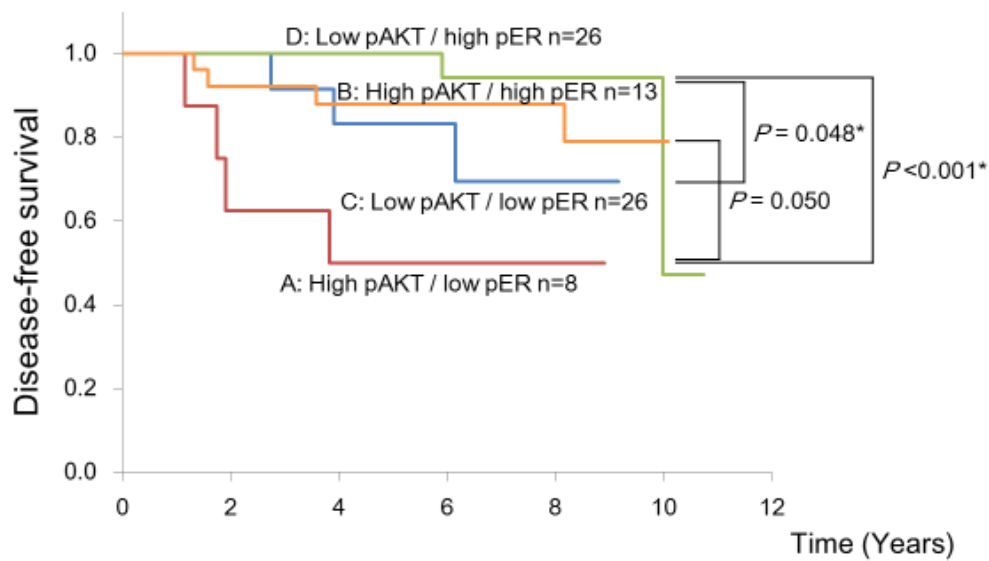
表 13. 閉経後 *PIK3CA* mutant 乳癌の 3 タイプと臨床病理学的因子

<i>PIK3CA</i> mutant (n = 71)			
Type	Type E	Type F	Type G
pAKT	high	low	low
pER	low/high	low	high
No. of patients	9 (13%)	21 (30%)	41 (58%)
	mean $\pm$ SD (range) median		
Age (years)	57.2 $\pm$ 6.8 ^d (47-71) 56	64.4 $\pm$ 5.9 (52-74) 64	65.0 $\pm$ 9.0 ^d (48-84) 64
BMI	21.5 $\pm$ 3.0 (17.0-26.9) 21.5	25.3 $\pm$ 4.2 (18.8-33.7) 24.7	23.6 $\pm$ 4.1 (14.2-40.9) 22.5
Tumor size (T1 T2 T3 T4)	1.6 $\pm$ 0.7 (1-3) 1	1.5 $\pm$ 0.6 ^e (1-3) 1	1.2 $\pm$ 0.4 ^e (1-2) 1
No. of positive lymph nodes	0.1 $\pm$ 0.3 (0-1) 0	0.8 $\pm$ 2.4 (0-10) 0	0.8 $\pm$ 1.8 (0-7) 0
Tumor grade	1.8 $\pm$ 0.4 (1-2) 2	2.0 $\pm$ 0.7 (1-3) 2	1.7 $\pm$ 0.5 (1-3) 2
Ki67 LI (%)	9.3 $\pm$ 8.0 (2-27.6) 5.5	11.8 $\pm$ 8.0 (0.1-34.1) 11.5	9.6 $\pm$ 8.2 (0.4-35.3) 7.0
ER (%)	73.3 $\pm$ 23.5 (50 - 100) 60.0	75.7 $\pm$ 24.2 ^f (20-100) 90.0	89.0 $\pm$ 15.1 ^f (40-100) 90.0
PgR (%)	9.4 $\pm$ 11.3 (0-30) 5.0	31.4 $\pm$ 30.7 (0-90) 20.0	34.6 $\pm$ 33.3 (0-100) 20.0
AR (%)	45.2 $\pm$ 39.6 (1-95) 40.0	29.8 $\pm$ 28.0 ^g (0-95) 20.0	50.2 $\pm$ 34.0 ^g (1-100) 40.0
VDR (%)	20.6 $\pm$ 15.1 (0-50) 20.0	20.0 $\pm$ 12.0 (0-40) 25.0	16.4 $\pm$ 13.4 (0-50) 15.0

^{d, g} Dunnett's test (^d*P* = 0.0095、^g*P* = 0.024)

^{e, f} Steel's test (^e*P* = 0.0094、^f*P* = 0.023)

(a) *PIK3CA* wild-type



(b) *PIK3CA* mutant

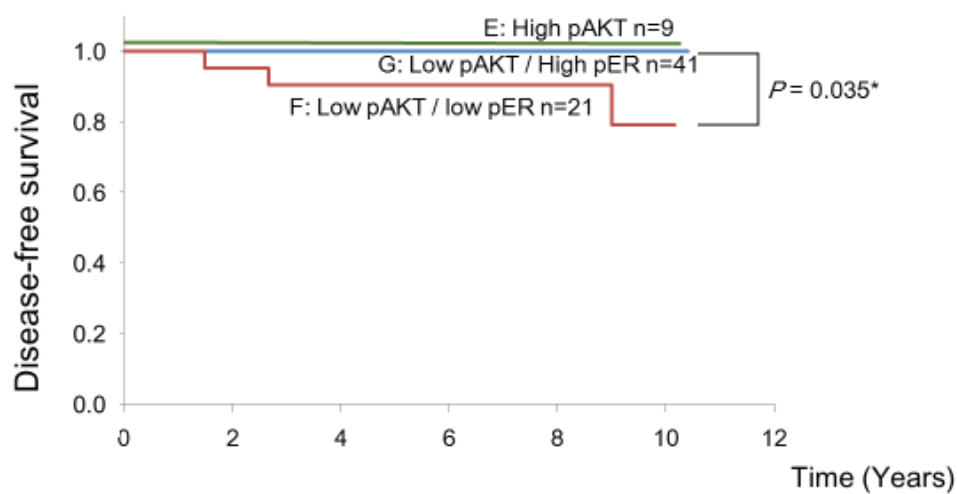


図 15. ER 陽性 HER2 陰性閉経後乳癌の 7 タイプと DFS

先の検討（図 11、12）で、閉経後症例においては *PIK3CA* 遺伝子変異の有無、pAKT、pER のいずれも予後に関与していた。これらの因子を組み合わせることで PI3K 経路の活性化と予後を反映した乳癌の分類の作成を試みた。閉経後症例 *PIK3CA* wild-type 4 タイプと DFS の生存曲線を (a)に、*PIK3CA* mutant 3 タイプと DFS の生存曲線を (b)に示す。7 つのタイプはそれぞれ異なるシグナル伝達が活性化していると推測される。

* $P < 0.05$

表 14. ER 陽性 HER2 陰性閉経後乳癌の 7 タイプと再発率

Type	<i>PIK3CA</i> wild-type (n = 73)				<i>PIK3CA</i> mutant (n = 71)		
	Type A	Type B	Type C	Type D	Type E	Type F	Type G
pAKT	high	high	low	low	high	low	low
pER	low	high	low	high	low/high	low	high
No. of patients	8 (11%)	13 (18%)	26 (36%)	26 (36%)	9 (13%)	21 (30%)	41 (58%)
No. of patients with recurrence							
within 2 years	3 (37.5%)	0	2 (7.7%)	0	0	1 (4.8%)	0
within 5 years	4 (50.0%)	2 (15.4%)	3 (11.5%)	0	0	2 (9.5%)	0
within 10 years	4 (50.0%)	3 (23.1%)	4 (15.4%)	2 (7.7%)	0	3 (14.3%)	0

閉経後症例において *PIK3CA* 遺伝子変異の有無、pAKT、pER の高低を組み合わせ、7 つのタイプに分類した。7 つのタイプの術後 2 年再発率、術後 5 年再発率、術後 10 年再発率を下段に示した。特に、Type A は全再発率が 50% と再発率が高くすべての再発は 5 年以内に生じており、予後不良であった。

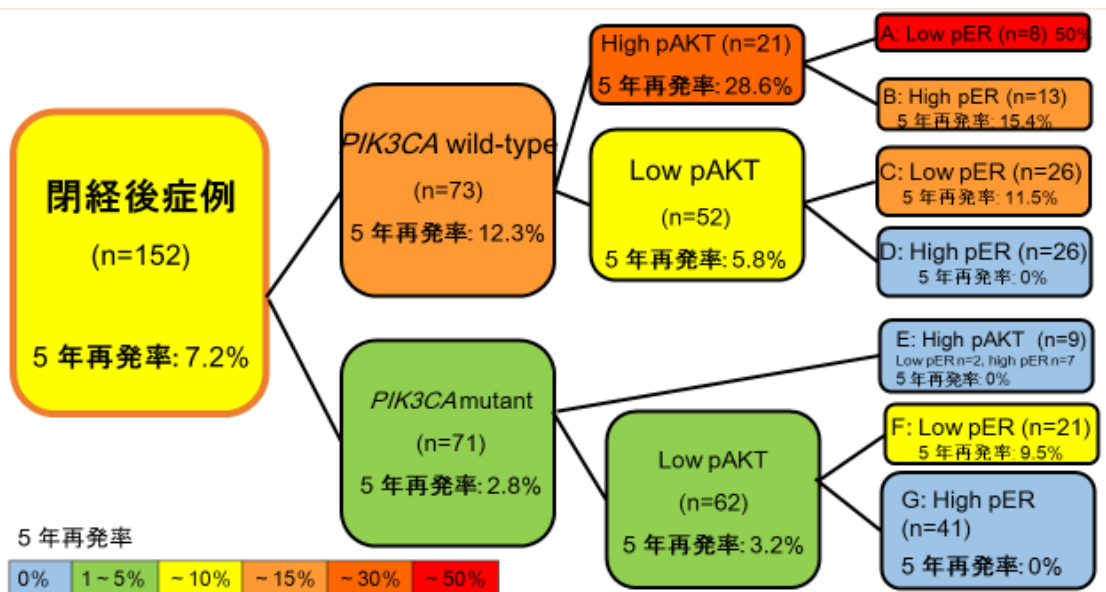


図 16. ER 陽性 HER2 陰性閉経後乳癌の 7 タイプを示す樹形図

スクエアの大きさは症例数に比例する。5 年再発率が低いものから高い順に水色→緑→黄色→オレンジ→濃いオレンジ→赤と背景色を色分けした。

考 察

PIK3CA 遺伝子変異は実験モデルにおいては AKT を活性化し癌の進展を促進するとされている³⁹⁻⁴¹。近年、ER 陽性 HER2 陰性進行乳癌患者の中で、アロマターゼ阻害薬抵抗性を獲得した症例に対して内分泌療法単独療法と、内分泌療法・PI3K 阻害薬の併用療法を比較した研究が行われた⁴²。その結果 *PIK3CA* 遺伝子変異を伴う血中循環腫瘍 DNA を有する患者群においては PI3K 阻害薬併用療法群で有意に予後の改善が示された⁴²。すなわち、進行乳癌においては *PIK3CA* 遺伝子変異が内分泌療法抵抗性の指標であることや PI3K 阻害薬の効果予測因子となりうる可能性が示唆されている。このように、基礎研究における内分泌療法抵抗性と再発・進行乳癌における予後因子・PI3K 阻害薬の効果予測因子としての知見には一貫性がある。

一方、これまで早期の ER 陽性 HER2 陰性乳癌においては *PIK3CA* 遺伝子変異が予後良好因子であることが示されている。Loi らは術後補助内分泌療法としてタモキシフェンを使用した ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌 173 例において *PIK3CA* 遺伝子変異症例は予後良好であることを報告した⁴³。Sabine らは TEAM 試験（アロマターゼ阻害薬による術後補助内分泌療法・第 III 相試験）に参加した ER 陽性閉経後早期乳癌 4294 症例において *PIK3CA* 遺伝子変異は約 40%と高頻度に認められ、*PIK3CA* 遺伝子変異症例は変異を有しない症例と比較し 5 年間遠隔再発リスクが有意に低いことを報告した¹⁸。早期乳癌における予後因子としての知見と進行乳癌における知見には乖離があると考えられる。

本研究では、ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌において *PIK3CA* 遺伝子変異は閉経前症例の 46.8%、閉経後症例の 46.7%と高頻度に認められることを示した。特に閉経後症例において *PIK3CA* 遺伝子変異を有する症例は有しない症例と比較し有意に DFS が延長していた。これは TEAM 試験¹⁸の結果と一貫している。

本研究では、閉経後症例においては、*PIK3CA* 遺伝子変異を有する症例は変異を有しない症例と比較し ER α Ser167 のリン酸化レベルが有意に高いことを示した。さらに、ER α Ser167 の高リン酸は良好な予後に関与することを示した。このことは、早期乳癌においては *PIK3CA* 遺伝子変異は ER α Ser167 をリン酸化することにより内分泌療法感受性に関与することを示唆している。すなわち、*PIK3CA* は、エストロゲン依存性に進行する閉経後 ER 陽性早期乳癌の主要な Driver 遺伝子の 1 つであることが示唆される。

本研究では AKT Ser473 および ER α Ser167 のリン酸化状態によって、閉経後乳癌の *PIK3CA* 遺伝子変異を有しない症例を 4 タイプに、*PIK3CA* 遺伝子変異症例を 3 タイプに分類した。*PIK3CA* wild-type/high pAKT/low pER (Type A) の約半数は術後 5 年以内に再発していた。Type A の腫瘍は Grade が高く、5 年以降に再発する症例は認めなかった。従って Type A 症例は増殖が速く aggressive ないわゆる luminal B-like サブタイプに相当すると推測され、さらに現在推奨されている内分泌療法、アンストラサイクリン系およびタキサン系薬剤を用いた標準的な補助薬物療法は Type A 症例の再発抑制には十分ではないと考えられる。AKT1 の活性化は内分泌療法抵抗性に関与するとされ⁴⁴、早期乳癌に対し mTOR 阻害剤を用いると AKT シグナルに依存する増殖を抑制すると報告されている^{45, 46}。Type A の患者の予後を改善するためには、PI3K/AKT/mTOR 経路を阻害する分子標的薬など新しい治療戦略が必要と考えられる。

本研究で提唱した分類では *PIK3CA* mutant/low pAKT /high pER (Type G) が最も多くを占め、閉経後 ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌の約 30%がこのタイプであった。Type G のすべての患者は、現在、無再発生存中である。Type G 症例はいわゆる luminal A-like サブタイプに相当し、内分泌療法への感受性が高いと考えられる。我々はこれまで、ER α Ser167 高リン酸化症例は内分泌高感受性で予後良好であることを報告した^{27, 29}。ER α Ser167 のリン酸化は、閉経後の ER 陽性乳癌の内分泌療法の効果予測因子となる可能性があると考えられる。*PIK3CA* 遺伝子変異、AKT Ser473 および ER α Ser167 リン酸化は、再発予防として内分泌療法単独でよいか評価するのに役立つ可能性があると考えられる。

一方、閉経前症例においては、*PIK3CA* 遺伝子変異が約 50%と閉経後症例と同等に認められたにも関わらず、AKT Ser473 および ER α Ser167 のリン酸化レベルは *PIK3CA* 遺伝子変異の有無に関与しなかった。さらに閉経前症例の AKT Ser473 のリン酸化レベルは閉経後症例のそれと比較すると有意に高いが、ER α Ser167 のリン酸化レベルは閉経前/後で同等であった。閉経前 ER 陽性乳癌における *PIK3CA* 遺伝子変異の意義についてはこれまで明らかになっていない。ER 陽性乳癌の発症メカニズムと生物学的特徴は閉経状況によって異なる可能性がある^{30, 34}。

しかし、本研究は retrospective な研究であること、特に閉経前症例は 62 例と少数例の検討であったことを limitation として考慮しなければならない。閉経前症例の予後予測因子 (表 11) は Ki67 のみであり、一般的に乳癌

の予後予測因子とされる腫瘍径、リンパ節転移が挙げられなかった。従って、閉経前症例は数が少なく偏りのある集団の可能性を否定できない。

当初、我々は ER 陽性 HER2 陰性乳癌における AR、VDR の発現に注目して検討を行った。AR、VDR は核内受容体であり乳癌組織での高発現が良好な予後に関与するという報告がある。Santagata らは ER、AR、VDR の発現は正常乳腺管腔細胞の分化と相関し、複数のホルモン受容体が発現した早期乳癌は予後良好であると報告している¹⁵。また、乳癌組織における AR の発現は *PIK3CA* 遺伝子変異を有する乳癌で高く、特に Kinase domain に変異を有する症例で高いことが過去に報告されている⁴⁷。ER 陽性 HER2 陰性乳癌の中でも ER、AR、VDR の高発現する乳癌は最も予後良好な集団であると、当初我々は予測した。本検討では閉経後症例において AR、VDR の発現は腫瘍径、リンパ節転移個数、Grade といった乳癌の予後不良に関与する臨床病理学的因子との逆相関が認められた。しかし、AR 高発現は閉経前症例においては DFS が有意に延長したが、閉経後症例では予後に関与しなかった。また、VDR の発現は閉経前後ともに予後に関与しなかった。

AI-Azhri らは 1114 例における乳癌組織を検討し VDR の高発現は腫瘍径やリンパ節転移といった乳癌の予後不良因子と逆相関するが、予後因子ではなかったと報告している⁴⁸。本検討は ER 陽性 HER2 陰性症例のみを対象としているが、AR、VDR の予後良好に関与する過去の報告は、ER 陽性症例も陰性症例も対象としていた¹³。過去にも、AR、VDR ともに ER 陽性乳癌、陰性乳癌のいずれでも発現が認められるが、特に ER 陽性乳癌での陽性率が高いことが報告されている¹⁵。一般に ER 高発現例は低発現例よりも予後良好であることが知られている^{49 50}。実際、本検討においても閉経後症例において、ER の発現と AR の発現は相関が認められていた。従って AR および VDR は ER と共発現の関係にあり、過去に報告された AR、VDR の高発現が予後良好と相関するという結果は ER の高発現に影響された可能性が考えられる。

以上、本研究で ER 陽性 HER2 陰性乳癌の約 50% が *PIK3CA* 遺伝子変異を有することを示した。*PIK3CA* 遺伝子変異は、閉経後症例において DFS 延長に関連していた。さらに、AKT Ser473 低リン酸化かつ ER α Ser167 高リン酸化症例は、閉経後女性において予後良好であった。一方、*PIK3CA* wild-type で AKT Ser473 高リン酸化かつ ER α Ser167 低リン酸化症例の半数は術後 5 年以内に再発した。*PIK3CA* 遺伝子変異、AKT Ser473 および ER α Ser167 リン酸化を検討することにより適切な予後予測と術後薬物療法の開発につな

がると考えられる。

総括および結論

① 本研究全体から得られた新知見

閉経後 ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌においては、*PIK3CA* 遺伝子変異に加えて下流のシグナル伝達因子である AKT Ser473 および ER α Ser167 のリン酸化の評価が生物学的特性と予後に関与する。

② 新知見の意義

閉経後 ER 陽性 HER2 陰性早期乳癌において *PIK3CA* 遺伝子変異と AKT Ser473、ER Ser167 の活性化状態を組み合わせることで評価することにより、再発抑制のための適切な術後薬物療法の開発につながる。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

長期に経過観察された ER 陽性 HER2 陰性閉経後早期乳癌を対象とし、本研究で提唱する *PIK3CA* 遺伝子変異と AKT Ser473、ER Ser167 の活性化状態の組み合わせによる分類が予後予測因子になるか、補助内分泌療法の効果予測因子になるかを検証する。

本研究で検討した症例の中でも特に Type A に相当する再発率の高い症例群の乳癌組織を用いて網羅的がん遺伝子解析を行い、現在の標準治療が奏効しない症例での driver 遺伝子変異を明らかにする。

④ 今後の課題

ER 陽性閉経後早期乳癌において現在の標準治療である内分泌療法、化学療法が奏効しない症例群に PI3K/AKT/mTOR 経路阻害薬などの新規の分子標的薬の有用性を検証する研究が望まれる。

謝辞

基礎研究にてご指導いただきました病理診断科畑中豊先生、松野吉宏教授、病理診断にてご指導いただきました病理診断科岡田宏美先生、畑中佳奈子先生、また本研究全体にわたりご指導いただきました指導教官である北海道大学乳腺外科山下啓子教授におかれましては、大変お世話になりました。この場を借り深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752(2000).
- 2 Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869-10874(2001).
- 3 Cheang, M. C. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736-750(2009).
- 4 Curigliano, G. *et al.* De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann. Oncol.* **28**, 1700-1712(2017).
- 5 Blows, F. M. *et al.* Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* **7**, e1000279(2010).
- 6 Kurebayashi, J. *et al.* Clinicopathological characteristics of breast cancer and trends in the management of breast cancer patients in Japan: Based on the Breast Cancer Registry of the Japanese Breast Cancer Society between 2004 and 2011. *Breast Cancer* **22**, 235-244(2015).
- 7 Yamashita, H. *et al.* Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann. Oncol.* **22**, 1318-1325(2011).
- 8 Yamashita, H. *et al.* Clinicopathological factors predicting early and late distant recurrence in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer* **23**, 830-843(2016).
- 9 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771-784(2011).
- 10 Gnant, M. *et al.* Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann. Oncol.* **25**, 339-

- 345(2014).
- 11 Sestak, I. *et al.* Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J. Clin. Oncol.* **33**, 916-922(2015).
 - 12 Lopes, N. *et al.* Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* **10**, 483(2010).
 - 13 Ditsch, N. *et al.* The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 121-129(2012).
 - 14 Castellano, I. *et al.* Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 607-617(2010).
 - 15 Santagata, S. *et al.* Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J. Clin. Invest.* **124**, 859-870, doi:10.1172/jci70941 (2014).
 - 16 Token, A. & Cantley, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673-676(1997).
 - 17 Samuels, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554(2004).
 - 18 Sabine, V. S. *et al.* Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2951-2958(2014).
 - 19 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70(2012).
 - 20 Miled, N. *et al.* Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* **317**, 239-242(2007).
 - 21 Huang, C. H. *et al.* The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* **318**, 1744-1748(2007).
 - 22 Iwase, H. Treatment strategy for metastatic breast cancer with estrogen receptor-positive tumor. *Int. J. Clin. Oncol.* **20**, 249-252(2015).
 - 23 Martin, M. *et al.* A randomized adaptive phase II/III study of buparlisib, a pan-class I PI3K inhibitor, combined with paclitaxel for the treatment of

- HER2- advanced breast cancer (BELLE-4). *Ann. Oncol.* **28**, 313-320(2017).
- 24 Baselga, J. *et al.* Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 520-529(2012).
- 25 Ma, C. X. *et al.* A Phase I Study of the AKT Inhibitor MK-2206 in Combination with Hormonal Therapy in Postmenopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 2650-2658(2016).
- 26 Lannigan, D. A. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* **68**, 1-9(2003).
- 27 Yamashita, H. *et al.* Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **7**, R753-764(2005).
- 28 Murphy, L. *et al.* Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha detection in human breast tumors in vivo. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1354-1359(2004).
- 29 Yamashita, H. *et al.* Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERalpha) serine 118 and high phosphorylation of ERalpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **15**, 755-763(2008).
- 30 Yamashita, H. Tumor biology in estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer: Mind the menopausal status. *World J. Clin. Oncol.* **6**, 220-224(2015).
- 31 Dunbier, A. K. *et al.* Relationship between plasma estradiol levels and estrogen-responsive gene expression in estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1161-1167(2010).
- 32 Haynes, B. P. *et al.* Expression of key oestrogen-regulated genes differs substantially across the menstrual cycle in oestrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **138**, 157-165(2013).
- 33 Haynes, B. P. *et al.* Differences in expression of proliferation-associated genes and RANKL across the menstrual cycle in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **148**, 327-335(2014).
- 34 Hosoda, M. *et al.* Differential expression of progesterone receptor, FOXA1, GATA3, and p53 between pre- and postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **144**, 249-261(2014).
- 35 Cavazzoni, A. *et al.* Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones. *Cancer Lett.* **323**, 77-87(2012).
- 36 Pereira, B. *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines

- their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* **7**, 11479(2016).
- 37 Zardavas, D., Phillips, W. A. & Loi, S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res.* **16**, 201(2014).
- 38 Stemke-Hale, K. *et al.* An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 6084-6091(2008).
- 39 Isakoff, S. J. *et al.* Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **65**, 10992-11000(2005).
- 40 Kang, S., Bader, A. G. & Vogt, P. K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 802-807(2005).
- 41 Bader, A. G., Kang, S. & Vogt, P. K. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1475-1479(2006).
- 42 Baselga, J. *et al.* Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 904-916(2017).
- 43 Loi, S. *et al.* PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10208-10213(2010).
- 44 Spears, M. *et al.* Proximity ligation assays for isoform-specific Akt activation in breast cancer identify activated Akt1 as a driver of progression. *J. Pathol.* **227**, 481-489(2012).
- 45 Sabine, V. S. *et al.* Gene expression profiling of response to mTOR inhibitor everolimus in pre-operatively treated post-menopausal women with oestrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **122**, 419-428(2010).
- 46 Macaskill, E. J. *et al.* The mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in early breast cancer: results of a pre-operative study. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 725-734(2011).
- 47 Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2472-2478(2009).
- 48 Al-Azhri, J. *et al.* Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin. Cancer Res.* **23**, 97-

- 103(2017).
- 49 Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K. & Allred, D. C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1474-1481(1999).
- 50 Yamashita, H. *et al.* Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* **13**, 74-83(2006).