

学内グラント 報告書

平成23年度 学内グラント終了時報告書

次世代シーケンサーを活用した乳がんの新規診断・治療法の開発

研究代表者 伊地知 暢広 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 堀江 公仁子¹⁾, 佐伯 俊昭²⁾, 大崎 昭彦²⁾

緒言

乳がんの発生・増殖にはエストロゲンシグナルが密接に関与している¹⁾。乳がんの多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現しており, エストロゲン依存性の増殖を示す。ERはリガンド依存性の転写因子で, エストロゲンの結合により活性化され, ゲノム中のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合し, その近傍の標的遺伝子の転写を直接調節することで, エストロゲン作用を媒介している。ERのEREを介した転写調節には様々なcoregulatorやcofactorが関わっており, クロマチンレベルでのダイナミックな制御メカニズムが考えられている²⁾。中でも近年, フォークヘッド転写因子 (FOX) ファミリーがステロイド受容体との相互作用を介してホルモン依存性がんに関与していることが明らかとなりつつある。特に, FOXA1は乳がんにおけるERのパイオニア因子と考えられており^{3,4)}, クロマチンのリモデリングを介してエストロゲン標的遺伝子の転写調節に関わることが注目されており, ER機能とホルモン応答の重要な決定因子と考えられている⁵⁾。近年では, クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) とDNA chip法を組み合わせたChIP-on-chip解析や, ChIP assayと次世代シーケンサーを組み合わせたChIP-seq解析など, 網羅的な解析手法の目覚ましい発展を基盤として, FOXA1に加えGATA-4やAP-2 γ , TLE1などの他の転写因子の関与が報告され, ER転写の複雑な調節メカニズムがゲノムワイドに明らかにされつつある^{6,7)}。臨床においては, ERに対する拮抗阻害薬である抗エストロゲン製剤タモキシフェン (TAM) が乳がんの内分泌療法として用いられており, エストロゲン依存性乳がんの治療に奏功している。しかしながら, TAMの長期投与により耐性を獲得するがんが生じることが大きな問題となっており, 有効な治療法が未だ確立されていない。このような乳がん

のエストロゲン依存性から非依存性を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムとして, エストロゲンにより正に制御される遺伝子とその制御から逸脱することにより, エストロゲン非存在下でも発現し, エストロゲン非依存性を付与している可能性が考えられる。したがって, 乳がんにおけるエストロゲンシグナルのさらなる解明を基盤とした, 新たな診断・治療法確立のための新規分子標的の探索が急務とされている。

我々は, 次世代シーケンサーを用いた解析により着目したFOX転写因子ファミリーに属するFOXP1がアンドロゲン受容体 (AR) との相互作用を介してARの転写抑制に関わることを報告した⁸⁾が, FOXP1はER陽性乳がん細胞におけるエストロゲン応答遺伝子でもあり, ERのEREを介した転写活性を増強し, エストロゲン依存性の増殖を促進することを明らかにした。さらに, 乳がん臨床検体において, FOXP1の発現がERやFOXA1の発現と正に相関し, リンパ節転移などの悪性度とは負の相関を示し, 乳がんの予後良好に関わる因子であることを報告した (Shigekawa et al., 2011)。

本研究では, 乳がんにおける新規診断・治療法の開発を目的として, FOXP1ならびにFOXA1に着目し, 術後タモキシフェン治療を受けた乳がん患者における臨床的意義を検討した。

材料と方法

乳がん臨床検体を用いた解析は, 国際医療センター乳腺腫瘍科との共同研究として行った。埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科に加え, 四国がんセンター, 国立がんセンターならびに東京都立駒込病院にて集積された乳がん組織切片を対象とした。パラフィン包埋した乳がん組織を薄切後, 定法に従って脱パラフィン処理と親水化処理を行った後, 121°Cで15分間の抗原賦活化処理を行った⁹⁾。その後, 抗FOXP1抗体, 抗FOXA1抗体を用い, ポリマー試薬

1) ゲノム医学研究センター

2) 国際医療センター 乳腺腫瘍科

法 (Envision, Dako 社) と 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector 社) により免疫染色を行った。病理評価は2名の病理医により Allred score 法を用いて行った。FOXP1, FOXA1 の免疫反応性と各種臨床パラメーターならびに再発・予後との関連について、カイ2乗検定, Kaplan-Meier 法, Log-rank 検定, ロジスティック回帰分析を用いて解析した。

結果

乳がんのタモキシフェン療法における FOXP1 ならびに FOXA1 の臨床的意義を明らかにするため、術後タモキシフェン療法を施行され、予後情報ならびに治療経過の判明している乳がん組織パラフィン切片を対象に、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫組織学的解析を行い、タモキシフェン治療効果との関連について検討した。生存曲線解析ならびに多変量解析から、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫染色性は、いずれも Relapse-free 群で有意に多く観察され、Relapse-free survival, Overall survival のいずれの予後との間にも有意な相関を示すことが明らかとなった。さらに興味深いことに、FOXA1 と FOXP1 の共陽性の場合それぞれ単独の場合に比べ、より強い有意差をもって予後良好性を示した。これらの結果から、FOXA1 と FOXP1 の両方の免疫染色性が、再発乳がんのタモキシフェン治療効果規定因子として有用であることが示唆された。

考察

乳がん臨床検体を用いた発現プロファイル解析から、FOXA1 は ER α 陽性で比較的予後良好かつ分化度の高い luminal type の乳がんマーカーとして認識されている¹⁰⁻¹⁴⁾。本研究における免疫組織学的検討においても、ER α ならびに PgR 発現との有意な正の相関が観察された。また、FOXA1 と FOXP1 はそれぞれ単独でも乳がんのタモキシフェン治療乳がん患者の予後良好との間に正の相関関係を有することが明らかとなった。さらに興味深いことに、これら二つの因子を組み合わせることで、タモキシフェン治療効果を予測しうる有用な診断マーカーとなりうることが示唆された。

本研究から、ER 転写機構における FOXP1 と FOXA1 の機能的関連が示唆された。これらの研究をさらに発展させることで、乳がんのタモキシフェン耐性獲得メカニズムの解明、ひいては治療抵抗性乳がんの診断・治療法開発につながることを期待される。

研究成果リスト

論文

- 1) Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. FOXP1, an estrogen-inducible transcription

factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. *Horm Cancer* 2011;2:286-97.

- 2) Abe Y, Ijichi N, Ikeda K, Kayano H, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 2012;103:806-12.
- 3) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer* 2012;3:147-59.

学会発表

- 1) 伊地知暢広, 重川崇, 阿部弥生, 池田和博, 堀江公仁子, 茅野秀一, 津田均, 大崎昭彦, 竹田省, 佐伯俊昭, 井上聡. 乳がんならびに子宮内膜がんにおけるフォークヘッド転写因子 FOXA1 の機能と臨床的意義, 第19回日本ステロイドホルモン学会, 2011年11月26日, 福岡市
- 2) 重川崇, 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 清水千佳子, 佐治重衡, 青儀健二郎, 津田均, 大崎昭彦, 佐伯俊昭, 井上聡. ER陽性乳癌におけるフォークヘッド転写因子 FOXP1 の役割, 第12回関東ホルモント癌研究会, 2012年1月21日, 文京区

参考文献

- 1) Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:55-67.
- 2) Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 2005;5:343-57.
- 3) Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS, Brown M. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 2008;132:958-70.
- 4) Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res* 1991;19:131-9.
- 5) Carroll JS, Brown M. Estrogen receptor target

- gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol* 2006;20:1707-14.
- 6) Holmes KA, Hurtado A, Brown GD, Launchbury R, Ross-Innes CS, Hadfield J, Odom DT, Carroll JS. Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:2748-53.
- 7) Tan SK, Lin ZH, Chang CW, Varang V, Chng KR, Pan YF, Yong EL, Sung WK, Cheung E. AP-2 γ regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J* 2011;30:2569-81.
- 8) Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:388-93.
- 9) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Fujimura T, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Estrogen-related receptor γ modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;123:1-7.
- 10) Habashy HO, Powe DG, Rakha EA, Ball G, Paish C, Gee J, Nicholson RI, Ellis IO. Forkhead-box A1 (FOXA1) expression in breast cancer and its prognostic significance. *Eur J Cancer* 2008;44:1541-51.
- 11) Badve S, Turbin D, Thorat MA, Morimiya A, Nielsen TO, Perou CM, Dunn S, Huntsman DG, Nakshatri H. FOXA1 expression in breast cancer-correlation with luminal subtype A and survival. *Clin Cancer Res* 2007;13:4415-21.
- 12) Thorat MA, Marchio C, Morimiya A, Savage K, Nakshatri H, Reis-Filho JS, Badve S. Forkhead box A1 expression in breast cancer is associated with luminal subtype and good prognosis. *J Clin Pathol* 2008;61:327-32.
- 13) Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- 14) Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.