

学位論文
Doctoral Thesis

乳癌におけるバイオマーカーの検索

—血漿ミッドカイン・細胞周期調節因子 FBXW7 の臨床的意義—

Exploration of Clinical Biomarkers of Breast Cancer Patients
—The Clinical Significance of Plasma Midkine Levels and Cell Cycle Regulatory Ubiquitin Ligase FBXW7—

指宿 睦子
Mutsuko Ibusuki

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻乳腺・内分泌外科学

指導教員

岩瀬 弘敬 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医学専攻乳腺・内分泌外科学

安東 由喜雄 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻病態情報解析学

2011年3月

学位論文 Doctoral Thesis

乳癌におけるバイオマーカーの検索

—血漿ミッドカイン・細胞周期調節因子 FBXW7 の臨床的意義—

Exploration of Clinical Biomarkers of Breast Cancer Patients
—The Clinical Significance of Plasma Midkine Levels and Cell Cycle Regulatory Ubiquitin Ligase FBXW7—

著者名 : 指宿 睦子
Ibusuki Mutsuko

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医学専攻乳癌・内分泌外科学
岩瀬 弘敬 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻病態情報解析学
安東 由喜雄 教授

審査委員名 : 消化器外科学担当教授 馬場 秀夫
器官制御学担当教授 中尾 光善
婦人科学担当教授 片淵 秀隆
消化器内科学担当教授 佐々木 裕

2011年3月

目次	
1. 要旨	1
2. 発表論文リスト	3
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	8
5-1. 乳癌の疫学と病因	8
5-2. 乳癌におけるバイオマーカーの位置付け	10
5-3. 当研究へいたる背景	11
5-4. ミッドカイン	12
5-4-1. 血中腫瘍マーカー	12
5-4-2. ミッドカインの蛋白としての特性と生理活性	13
5-4-3. ミッドカインの作用機構	14
5-4-4. ミッドカインとがん	15
5-5. 細胞周期調節に関わるユビキチンリガーゼ FBXW7	16
5-5-1. 細胞周期とユビキチン-プロテアソームシステム	16
5-5-2. ユビキチンリガーゼによる細胞周期調節	17
5-5-3. FBXW7 とがん	19
5-6. 本研究の目的	20
6. 実験方法	21
6-1. 検体	21
6-2. 抗体および試薬	22
6-3. EIA	22
6-4. 培養細胞	23
6-5. RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR	23
6-6. 細胞周期非同調フローサイトメトリー	24
6-7. 細胞増殖活性の測定	24

6-8. ウェスタンブロッティング法	24
6-9. RNA 干渉(RNAi)	25
6-10. 免疫組織化学染色	25
6-11. 統計学的解析	26
7. 実験結果	27
7-1. ミッドカイン	27
7-1-1. 正常人におけるミッドカインレベル	27
7-1-2. 血漿ミッドカインレベルカットオフ値の設定	28
7-1-3. 乳癌患者における血漿ミッドカインレベル	29
7-1-4. 原発浸潤性乳癌患者における血漿ミッドカインレベルと 臨床病理学的因子との相関	30
7-1-5. 血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカーの比較	31
7-2. FBXW7	34
7-2-1. 腫瘍組織における FBXW7 mRNA 発現レベルおよび 免疫組織学的発現レベルと臨床病理学的因子	34
7-2-2. 腫瘍組織における FBXW7 mRNA 発現レベルおよび 免疫組織学的発現レベルと予後の相関	37
7-2-3. FBXW7 mRNA 発現レベルと FBXW7 蛋白発現、Ki67 labeling index、 c-Myc および cyclin E 蛋白発現の関係	41
7-2-4. in vitro での FBXW7 発現抑制による 細胞周期の遷移および増殖への影響	45
8. 考察	47
8-1. 血漿ミッドカインレベル	47
8-2. 腫瘍組織における FBXW7 発現	49
9. 今後の展望	51
9-1. 血漿ミッドカインレベル	51
9-2. 腫瘍組織における FBXW7 発現	51

10. 結語	52
11. 参考文献	54

1. 要 旨

【目 的】 近年、乳癌では癌組織から特定の遺伝子発現を解析し個別的に治療方針を決定する予後予測ツールが実用化され、臨床医にとって生物学的因子や遺伝子解析に関する知識が不可欠となっている。本研究では血漿ミッドカインレベルの早期乳癌診断バイオマーカーとしての意義を検討する。また、細胞周期に関わるユビキチンリガーゼである FBXW7 の乳癌腫瘍組織における発現の臨床的意義を見出すことを目的とした。

【方 法】 血漿ミッドカインレベルは、正常人血漿104例、乳癌患者血漿 147例(非浸潤性乳管癌 11例、原発浸潤性乳癌 111例、転移性乳癌 25例)を対象に、ワンステップサンドイッチ EIA 法にて測定した。FBXW7 の解析では、原発浸潤性乳癌患者の腫瘍組織 186例を用いて RNA を抽出し、FBXW7 の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法、免疫組織学的染色で検討した。また Ki67、c-Myc、cyclin E の発現を同患者群で免疫組織学的染色を用いて検討した。乳癌細胞株での FBXW7 の発現と RNAi を用いたノックダウン時の増殖能の変化により検証した。

【結 果】 血漿ミッドカインレベルの検討では正常人より癌患者において有意に高値を認めた。癌患者内では浸潤性乳管癌の診断率が高かった。他の腫瘍マーカー(CEA, CA15-3, NCC-ST 439)と比較しても優れた癌検出率であった。FBXW7 の検討では、高核グレード、ホルモン受容体陰性と FBXW7 mRNA の低発現との相関関係を認め、mRNA 低発現は乳癌死について独立した予後因子として規定された。また Ki67、cyclin E は FBXW7 mRNA 低発現の患者群で発現増加を認めた。in vitro では FBXW7 ノックダウンすると増殖能の亢進と細胞周期の遷移を認めた。

【考 察】 血漿ミッドカインレベルは他腫瘍マーカーと比較し原発浸潤性乳癌の診断に有用であることが示された。また、FBXW7 発現低下により標的蛋白の蓄積が起り、増殖能を亢進させることによって悪性度に関与し、独立した予後規定因子としての臨床的意義を持

つことが示された。

【結 論】

血漿ミッドカインレベルの乳癌早期診断バイオマーカーとして有用である可能性が示された。また、乳癌におけるFBXW7の予後規定因子および増殖マーカーとしての臨床的意義が示された。

2. 発表論文リスト

①関連論文

1. Ibusuki M, Fujimori H, Yamamoto Y, Ota K, Ueda M, Shinriki S, Taketomi M, Sakuma S, Shinohara M, Iwase H, Ando Y.
Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci.* 100: 1735–9, 2009.
2. Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, Ando Y, Iwase H.
Reduced Expression of Ubiquitin Ligase FBXW7 mRNA is Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer Patients. *Cancer Sci.* 102: 439–45, 2011.

②その他の論文

1. Ibusuki M, Yamamoto Y, Kawasoe T, Shiraishi S, Tomiguchi S, Yamashita Y, Honda Y, Iyama K, Iwase H.
Potential Advantage of Preoperative Three-Dimensional Mapping of Sentinel Nodes in Breast Cancer by a Hybrid Single Photon Emission CT (SPECT)/CT System. *Surg Oncol.* 19:88–94, 2010.
2. Shinriki S, Ueda M, Ota K, Nakamura M, Kudo M, Ibusuki M, Kim J, Yoshitake Y, Fukuma D, Jono J, Kuratsu JI, Shinohara M, Ando Y.
Aberrant Expression of Serum Amyloid A in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 39:41–7, 2010
3. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y.
Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Tumor Angiogenesis and *In Vivo* Growth of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15: 5426–34, 2009.
4. Yamamoto Y, Ibusuki M, Nakano M, Kawasoe T, Hiki R, Iwase H.
Clinical significance of basal-like subtype in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 16:260–7, 2009

5. 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.* 100:1012-7, 2009
6. Yamamoto Y, Ibusuki M, Okumura Y, Kawasoe T, Kai K, Iyama K, Iwase H. Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res and Treat.* 110:465-75, 2008
7. Okumura Y, 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.* 8:287, 2008
8. Ibusuki M, Hiraoka T, Kanemitsu K, Takamori H, Tsuji T. A case of complete remission from pancreatic cancer by multi-resections of locally pancreatic recurrent sites and liver metastasis . *Surg Today.* 38:563-6, 2008

3. 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤なるご指導とご高配を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部 総合医薬科学部門 外科再建医学講座乳腺・内分泌分野教授、岩瀬 弘敬先生、ならびに同 病態制御学講座 病態情報解析学分野教授、安東 由喜雄 先生に深甚なる謝意を表します。

終始ご指導とご鞭撻を賜り、研究方針や研究に対する姿勢、論文作成をご教授いただきました乳腺・内分泌外科学分野助教、山本 豊 先生に厚く感謝の意を表します。

実験方法を懇切丁寧にご指導いただき研究に対して常に貴重なご提言を頂きました顎口腔病態学分野(現 病態情報解析学分野医員)、神力 悟 先生、病態情報解析学分野助教、植田 光晴 先生に厚く感謝の意を表します。

血液検体を用いた実験に際し多大なるご支援をいただきました病態情報解析学分野、藤森 裕巳 様、田崎 雅義 様に厚く感謝の意を表します。

種々の乳癌細胞株のご供与と貴重なご助言をいただきました慶応大学医学部先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門助教、甲斐 千晴 先生に厚く感謝の意を表します。

臨床検体の採取にご協力をいただきました熊本大学医学部附属病院 乳腺・内分泌外科、前助教 川添 輝 先生、同医員 中野 正啓 先生、末田 愛子 先生、林 光博 先生、藤原 沙織 先生に厚く感謝の意を表します。また、臨床データ管理および臨床検体管理をご支援いただきました乳腺・内分泌外科分野秘書、岡部 絢子 様、同技術補佐員、大柿 有 様、坂田 幸子 様、阿座上 友葵 様、ならびに病理技術をご支援いただきました熊本大学医学部附属病院 病院病理部技術員、園田 美子 様に厚く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、貴重な検体をご提供いただきました患者様方、有形無形の温かいご協力を頂きました乳腺・内分泌外科分野教室員の皆様、病態情報解析学分野教室員の皆様、そして夫と2人の娘達に心より感謝の意を表します。

4. 略語一覽

AI: Aromatase inhibitor
ASCO: American society of clinical oncology
BCSS: Breast cancer specific survival
BSA: Bovine serum albumin
BRCA: Breast cancer associated gene
CA15-3: Carbohydrate antigen 15-3
CA27.29: Carbohydrate antigen 27.29
CEA: Carcinoembryonic antigen
cDNA: Complementary DNA
CGH: Comparative genome hybridization
C6orf97: Chromosome 6 open reading frame 97
DCIS: Ductal carcinoma in situ
DNA: Deoxyribonucleic acid
EIA: Enzyme Immunoassay
ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay
ER: Estrogen receptor
FBS: Fetal bovine serum
FBXW7: F-box/WD repeat-containing protein 7
FFPE: Formalin-fixed paraffin embedded
FISH: Fluorescent in situ hybridization
HECT: Homologous to E6-AP carboxyl terminus
Her2: Human epidermal growth factor receptor
HRP: Horseradish peroxidase
Ig: Immunoglobulin
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MPA: Medroxyprogesterone acetate
mRNA: Messenger Ribonucleic acid
MUC1: Mucin 1
NCCN: The National Comprehensive Cancer Network
NCC-ST-439: National Cancer Center-Stomach-439
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
PBS: Phosphate buffered saline
PgR: Progesterone receptor

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

RFS: Relapse free survival

RNA: Ribonucleic acid

ROC curves: Receiver operating characteristic curves

RPMI: Roswell park memorial institute

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SELDI-TOF: Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

SERM: Selective estrogen receptor modulator

Skp2: S-phase kinase-associated protein 2

uPA: Urokinase plasminogen activator

5. 研究の背景と目的

5-1. 乳癌の疫学と病因

乳癌は女性において最も多い癌であり、国際がん研究機関 (IARC : international Agency for Research on Cancer) の推計によると、2002 年に新たに 115 万人が罹患している。また、女性のがんによる死亡の第1位となっており、2002 年における女性乳癌死亡者数は 41 万人であった。日本での癌年齢調整死亡率の推移をみると、全癌では男女とも 1990 年代後半から減少傾向にあり、部位別では、男女ともに胃癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌などで近年減少傾向がみられる。しかし、女性の乳癌については、1960 年代以降一貫して増加傾向にあり、近年でも明らかな増加傾向がみられる (図 1a)。本邦における 2008 年の女性の乳癌死亡者数は 11,797 人であり、年齢調整死亡率は大腸に次いで高く、人口 10 万対 11.9 人である。年齢別死亡率は 50 代まで直線的に増加し、その後 80 代まではやや減少する。また、女性乳癌死亡率を出生年代別にみると、最近の罹患率の上昇を反映し、最近の出生者ほど死亡率が高くなっている。欧米諸国の乳癌年齢調整死亡率は日本に比べはるかに高いが、1990 年前後をピークに減少傾向がはじまっており、日本との差は縮まる傾向にある。癌年齢調整罹患率の推移をみると、全癌では男女ともに 1990 年代前半までは増加し、その後は横ばいで 2000 年前後から再び増加傾向にある。女性では直腸がん、肺癌、乳癌、卵巣癌で増加傾向にあり、特に乳癌と卵巣癌は 1975 年から一貫して増加傾向が続いている (図 1b)。女性の癌の年齢調整罹患率は乳癌が最も高く、人口 10 万対 62.0 人であり、2004 年の集計によると 50549 人が罹患している。罹患率は 30 代から増加し始め、40 代にピークを迎え、その後は次第に減少する。出生年代別にみると、最近の出生者ほど罹患率が高くなっている¹。

図1

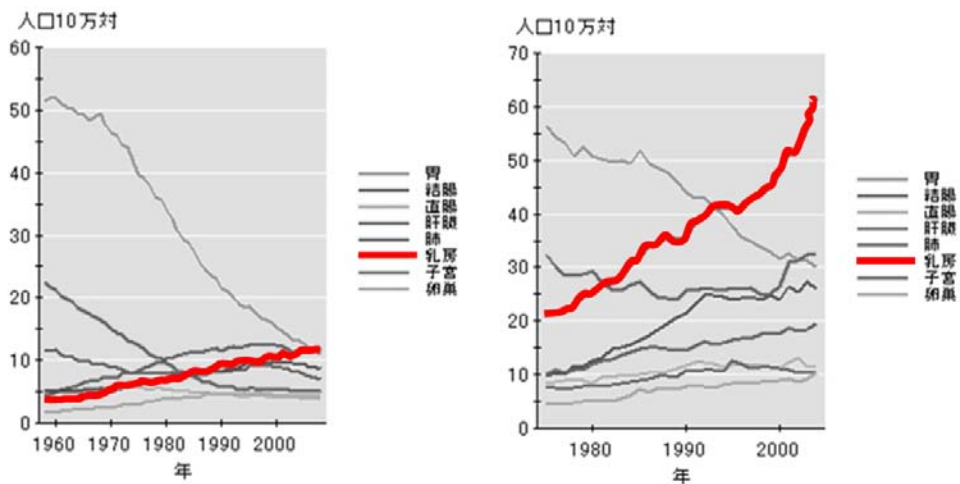


図 1a: 部位別癌年齢調整死亡率の推移

図 1b: 部位別癌年齢調整罹患率の推移

日本での乳癌罹患数の上昇は、食生活やライフスタイルの欧米化が原因であるとされる。表 1 にリスクファクターを示す。高危険群としては、高齢、乳癌の家族歴、乳癌の既往、良性乳腺疾患既往、未婚、未経産、高齢初産、早い初潮・遅い閉経、肥満などが挙げられる。各因子を見る中で、乳癌の発生・増殖にはエストロゲンが重要な働きをしていることが明らかである。一方、外因性のホルモンとして閉経後に投与するホルモン補充療法ではエストロゲン単独よりもプロゲステロン併用の方でより相対危険度が高く、乳癌発生にプロゲステロンの関与も示唆される。遺伝的素因で乳癌に罹患したと考えられるものは全体の 5～10%とされ、その中の半数ほどは BRCA1 もしくは BRCA2 遺伝子の生殖細胞変異により生じているとされている。

乳癌の易罹患性と相関する分子疫学的マーカーも解析されつつあり、エストロゲン前駆物質産生に関与する cytochrome P450C17 α (CYP17) のプロモーター領域の遺伝子多型、アンドロゲン-エストロゲン転換酵素 aromatase P450 (CYP19) イントロン 4 のマイクロサテライト多型、ER α 遺伝子 (ESR1) のプロモーター領域もしくは第 1 エクソンの 3 つの遺伝子多型や、最近の知見では Genome-wide association study (GWAS) による ESR1 上流 (C6orf97 近傍) に存在する一塩基多型などが挙げられる。

表1 乳癌のリスク因子

リスクの程度	因子
強いリスク要因 (相対リスク > 2.0)	加齢 強い乳癌家族歴 乳癌原因遺伝子異常 (BRCA1/2) の保因者 未経産もしくは高年齢初産 良性乳腺疾患の既往 大量の放射線被曝 早い初潮と遅い閉経
弱いリスク要因 (1.1 < 相対リスク \leq 2.0)	ピルもしくはホルモン補充療法 食事 (動物性脂肪食) 過度の肥満 アルコール 高身長
防止する弱い要因	身体的活動性の高いこと 授乳の経験 食事 乳癌予防薬の内服

5-2. 乳癌におけるバイオマーカーの位置付け

乳癌は腫瘍内での病理組織形態所見ばかりでなく、その生物学的動態、予後、治療への反応性などの点で他の癌腫と比較して極めて heterogeneity に富む癌である。これまで乳癌術後の再発率や生存率は、癌の腫瘍径、リンパ節転移、核グレード、ホルモン受容体、Her2 蛋白、脈管浸襲といった病理組織学的因子で予測されてきた。実臨床において摘出した、あるいは生検を受けた癌の組織の特徴に基づいて系統的に治療方針が決められている²⁻⁵。その患者がどのような性質の癌を有しているのかを決めることは臨床的にきわめて重要であり、治療・管理方針を決定するアルゴリズムの確立において欠かせない情報を提供している。

最近の乳癌罹患者数の増加や様々な標的治療の発達から、特異的な物質や治療標的が患者から得られる検体(血液検体や組織など)で発現しているか否かを正確に検出することが求められている。腫瘍マーカーもその一つである。乳癌診療医が日常臨床において使用している腫瘍マーカーとは、CEA や CA15-3 などの血液中の腫瘍関連抗原の測定を意味することが多い。ただ、本来の腫瘍マーカーの定義は「体内に癌が存在したときに見出される物質」であり、乳癌でいうと広義には ER, PgR, Her2 や細胞増殖因子、癌遺伝子なども含まれる。

近年、ASCO のガイドラインで推奨される腫瘍マーカーとして従来の CA15-3, CA27.29, CEA, ER, PgR, Her2 に加え uPA, PAI-1 や Oncotype DX[®] ⁶ が推奨されるようになった⁷。Oncotype DX[®] は NCCN のガイドラインでもアルゴリズムに取り入れられており、遺伝子発現プロファイルを初めて実用化したパイオニアである。実際には FFPE 標本上の癌細胞から抽出した RNA を用いて再発に関連する 21 種類の遺伝子を RT-PCR にて発現解析、再発スコアを計算し予後予測や一定の条件下にある患者群の補助療法の選択を行うものである。他にも DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析による患者の層別化も進んでおり、これをもとに Mammaprint[®] も開発されている⁸。これはマイクロアレイを用いて 25000 遺伝子の中から絞り込まれた 70 個の遺伝子の発現パターンにより乳癌の遠隔転移のリスクを見積もる再発予測ツールである。

これらは狭義の腫瘍マーカーを含め乳癌治療の個別化に関わる生物学的因子の検索や遺伝子解析が将来的に実臨床上でルーチンとなる可能性を示している。乳癌診療を行う臨床医がこれらのツールを使いこなすためには、バイオマーカー検索の方法や遺伝子解析に対する基礎知識が必須である。

5-3. 当研究へいたる背景

冒頭に述べたように、日本人女性の乳癌罹患率は増加の一途である。全国的には診療ガイドラインが整備されたが、より高いレベルの診療を行う乳腺専門医が不足しているのが現実である。この状況は熊本県においても例外ではない。申請者の所属する熊本大学乳腺・内分泌外科は 2005 年、大学部局化に伴い独立した診療科として教授、岩瀬 弘敬先生を迎え熊本の乳腺診療のレベルアップを図るべくスタートを切った。岩瀬弘敬先生は腫瘍外科を専門とされ、これまでに乳癌における臨床病理学的な情報、免疫染色や核酸解析の手法を用いた分子マーカー解析などを通じて癌の病態を推量し、特にホルモン受容体陽性乳癌に関する、臨床的に有用な予後予測因子・治療効果予測因子の同定をされており⁹⁻¹⁶、当科においても同様に分子マーカー解析を行う準備を始めた。創設 2 年目より研究用に保存してきた検体数が増加し、経過観察期間が短いながらも予後などの統計学的解析に供することのできる数に達した。当時申請者は外科基礎修練修了後、創設間もない当科に入門し外科治療を中心とした臨床研究と修練を行っていた(関連論文 1, 8)。その傍ら自科臨床データ作成や保存検体の整理に着手することとなり、同時に病態制御学講座 病態情報解析学分野教授および熊本大学病院中央検査部長でもある安東 由喜雄先生のもとを訪ね、バイオマーカー研究の基礎を学ばせていただくこととなった。

同教室で研究中であったミッドカインについて太田らは口腔癌での予後予測因子としての意義を見出しており¹⁷、乳癌でも同様に臨床的意義を検索することとなった。同時に発現解析に関する基礎技術や細胞実験技術などもご教授いただくこととなった。以後申請者は乳腺・内分泌外科を基軸とし岩瀬教授、山本助教のご指導のもと乳癌では未だ検索のなされていない分子である FBXW7 の臨床的意義を解析し後に示す結果を得た。

申請者はこれら 2 分子の研究によって、血液や組織に関する実験法や臨床的意義の解析法を学んだ。以下にそれぞれの分子について概説する。

5-4. ミッドカイン

5-4-1. 血中腫瘍マーカー

乳癌の領域においては前立腺癌の検診で使用されている血清 prostate specific antigen (PSA) のように早期の病変を有効に検出できるほどの感度・特異度を備えたマーカーは存在しない。現時点で乳癌スクリーニングのために有用なモダリティはマンモグラフィと視触診であり、腫瘍マーカーの果たす役割は皆無と見てよい。

従来血中腫瘍マーカーとして頻用されているものは CA15-3、CEA、NCC-ST-439 の 3 種である。CA15-3 は乳癌細胞が産生するムチン抗原であり、polymorphic epithelial mucin (PEM)あるいは MUC1 と呼ばれる高分子糖蛋白のエピトープを認識する抗体によって検出される。乳癌に対する感度は比較的高いマーカーであるが、stage I の原発性乳癌患者における陽性率は 10%から 20%にすぎない。CEA は分子量 18 万の糖蛋白であり、もっとも古く臨床で使用されており、かつ多くの癌腫で使用されている腫瘍マーカーである。乳癌においては感度・特異度ともに CA15-3 より劣り、CEA 単独での使用は勧められていない。NCC-ST-439 はヒト胃癌細胞株 St-4 をヌードマウスに免疫して作成されたモノクローナル抗体であり、シアル酸を持つ糖鎖抗原を認識する。乳腺、肺、胃、大腸、膵臓、胆道系などの癌の診断に有用であり、乳癌では癌の治療後のフォロー(再発の診断)での有用性が認められている。

以上の現状を踏まえ、乳癌の早期診断・予測マーカーとしてより信頼できる血中腫瘍マーカーの開発が有用かつ必要である。

5-4-2. ミッドカインの蛋白としての特性と生理活性

成長因子 (growth factor) は腫瘍細胞により分泌されオートクライン的に、または間質細胞により分泌されパラクライン的に働き、腫瘍形成および進行に大きく寄与している。がん患者の血中成長因子のレベルが健常者と比較して増加している報告が多数存在し、成長因子がオートクライン的に転移を促進することを示唆している¹⁸。

ミッドカインはヘパリン結合蛋白であり、胚細胞腫瘍細胞よりレチノイン酸応答性の発現上昇を示す蛋白として報告されたものである^{19, 20}。ヒトミッドカイン遺伝子は 11 番染色体短腕の locus 11.2 にコードされており²¹、塩基性アミノ酸とシステインに富む質量 13kDa の分泌タンパク質である²²。ミッドカインは胎児中期に広範囲に発現され、それ以後は次第に発現が低下していく。中でも上皮間葉相互作用をしている上皮組織²³⁻²⁸、分化中の神経組織²⁹、そしてリモデリング中の幼弱な結合組織が主な発現部位である。生後ミッドカインの発現は血管内皮や腎臓などに限局され、それ以外では傷害を受けたあとの修復時³⁰や癌組織中³¹に強く発現している。このように特異的な発現をするミッドカインは多彩な生理活性を持っている³²⁻³⁵。(表 2)

表 2 ミッドカインの生物活性

機能	標的細胞
細胞増殖	繊維芽細胞、ケラチノサイト、腫瘍細胞
細胞移動	神経細胞、好中球、マクロファージ、骨芽細胞
形態変化	胎児神経細胞、コラーゲン、ゲル収縮
抗アポトーシス	神経細胞、腫瘍細胞、心筋細胞
線溶系	血管内皮細胞
ケモカイン発現	尿細管細胞、血管内皮細胞
軟骨分化	軟骨細胞
血管新生	腫瘍細胞
シナプス形成	筋原細胞

5-4-3. ミッドカインの作用機構

ミッドカインの受容体はプロテオグリカンと low densitylipoprotein receptor-related protein (LRP)ファミリーのメンバーからなる複合体を形成し、少なくとも4種類の受容体[ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンファミリー、受容体型タンパクチロシンフォスファターゼ ζ (PTP ζ)、LDL receptor-related protein (LRP)、anaplastic leukemia kinase (ALK)受容体が関与していると考えられている。ミッドカイン受容体はこれらの分子が会合した複合体であり、ミッドカイン結合により複合体形成が促進されると考えられている。細胞内でのミッドカインシグナル伝達系は、PTP ζ や ALK 受容体の下流で PI3 キナーゼ (PI3K) やMAPキナーゼ(MAPK)の活性化を起こすことが報告されている³⁶。

図 2

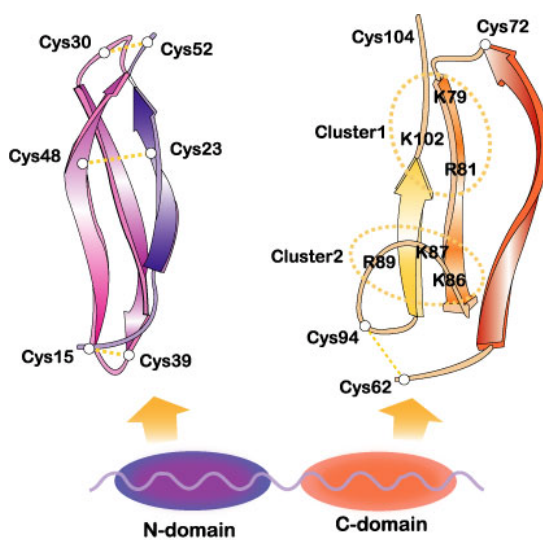


図 2a ヒトミッドカインのドメイン構造と各ドメインの立体構造

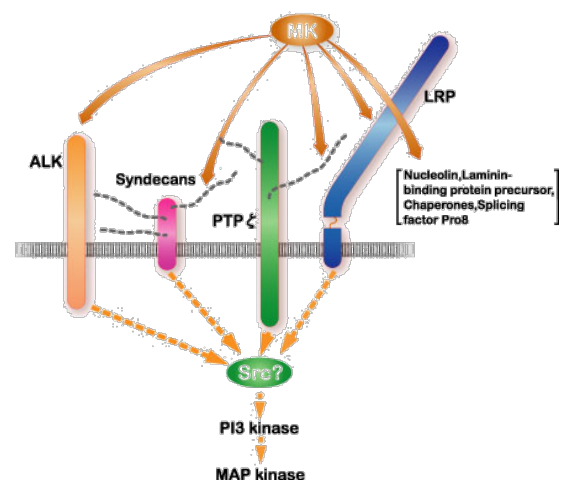


図 2b ミッドカインのシグナル系

(いずれも文献³³より引用し、一部改変)

5-4-4. ミッドカインとがん

ミッドカインの持つ抗アポトーシス作用や細胞増殖能、細胞遊走、血管新生能などは、いずれもがんの生存・進展と関係がある。実際に、ミッドカイン多くのヒト癌組織で過剰発現するという報告がなされている^{31, 37-44}。本現象は食道癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、ウィルムス腫瘍、ホジキン病、神経芽細胞種、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌などで認められている。発現上昇が起こる頻度は癌の種類により異なるが、全体では約80%の症例に認められている。乳癌でも発現がみられ、Garverらは乳癌組織24症例のうち19例(79.1%)においてミッドカイン mRNA の発現を確認している⁴⁵。また Miyashiro らも乳癌組織において RT-PCR, northern blotting, 免疫染色による発現確認を報告している⁴⁶。

また、ミッドカインの発現と悪性度が相関し、ミッドカイン高発現を示す患者では予後不良であるという報告が、星細胞膠腫⁴⁷、神経芽細胞種³⁸、膀胱癌⁴²、膵頭部癌⁴⁸などでなされている。さらに胃癌細胞株で DNA マイクロアレイ解析法を用いて行われた研究では、多剤の薬剤耐性と最も関与していたのはミッドカインであるという報告⁴⁹がなされ、抗癌剤耐性とミッドカインについても注目されている⁵⁰。

このような癌とミッドカインの関連から、ミッドカインを標的とした癌の診断についても研究されてきた。診断の面からは、血中腫瘍マーカーとして神経芽細胞腫⁵¹や食道癌⁵²、肝臓癌⁵³、胃癌⁵⁴での有用性が報告されている。近年、我々のグループでは口腔扁平上皮癌において腫瘍細胞でのミッドカイン蛋白発現と正常組織より高いレベルの mRNA の発現を示し、さらにミッドカイン血中濃度の予後因子および早期診断マーカーとしての可能性を示した¹⁷。

細胞周期調節に関わるユビキチンリガーゼ FBXW7

5-5-1. 細胞周期とユビキチン-プロテアソームシステム

細胞増殖は全ての生命体にとって最も根源的な事象である。ヒトを含む多細胞生物においては細胞分化や形態形成に絶対的に重要である。細胞周期は分裂期(M 期)と間期に分けられ、間期はさらに DNA 複製を行っている時間(S 期)と Gap に分けられる。S 期の前は Gap1(G1)、後は Gap2(G2)とされ、M-G1-S-G2 期というように一方向性に回転する。そこにはいくつかの制御ポイントが存在し、周期から逸脱して休止期(G0 期)に入ったり、異常を感知する機構であるチェックポイント(DNA 複製チェックポイント、スピンドルチェックポイント)によって周期上で停止したりすることもある。癌細胞の多くは細胞周期抑制機構のどこかに破綻をきたしており、その悪性増殖の主な原因になっている。

細胞周期をコントロールしている蛋白質(サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ)は、量的に迅速な調節を受けることによって時間特異的な作用を見せるが、これは主にリン酸化やユビキチン化などの蛋白質翻訳後修飾システムによるものである。ユビキチンは76個のアミノ酸からなる進化的な保存性が高い蛋白質である。ユビキチンは ATP 依存性活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、リガーゼ(E3:ユビキチン連結酵素)から構成された複合酵素系(ユビキチンシステム)によって標的蛋白質に共有結合され、反応を繰り返すことによってポリユビキチン鎖が形成される。このポリユビキチン鎖を 26S プロテアソームが認識・分解する^{55, 56}。

図 3

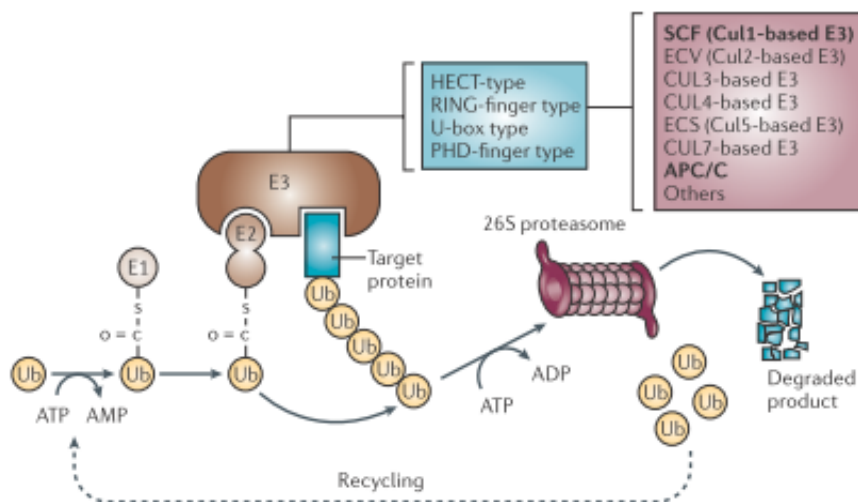


図 3 ユビキチン-プロテアソーム系

(文献 48 より引用転載)

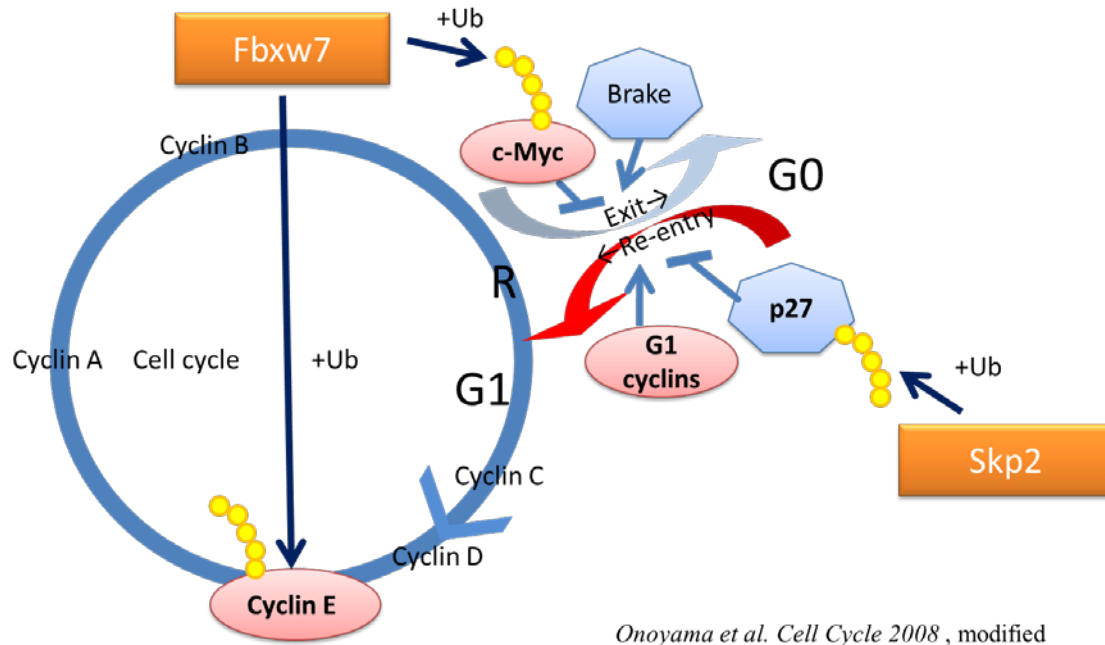
5-5-2. ユビキチンリガーゼによる細胞周期調節

E3 は高度に多様性を持っており、活性中心の構造から HECT 型、RING 型、PHD 型、その他のグループに細分できる。細胞周期調節に関わるユビキチンリガーゼとしては RING 型ファミリーに属する anaphase promoting complex / cyclosome (APC/C) が M 期中期から G1 期前期を、Skp1-Cull-F-box-protein (SCF) 複合体が G1 期後期から M 期前期を制御することが知られている⁵⁷。SCF 複合体の F-box 蛋白質標的蛋白質は可変因子であり、F-box 蛋白質のみを交換することによって異なった標的を認識することが可能である。きわめて多数の F-box 蛋白質が存在することが明らかとなっており、Skp2, FBXW7 はその中の2大ユビキチンリガーゼとして知られている。

Skp2 は p27, p57, p21, フリーの cyclin E などを標的とし、S 期から G2 期にかけて発現している。Skp2 の過剰発現および p27 の発現減少は、癌の悪性度と予後に著明な相関があり、乳癌において既に臨床的意義が確立されたものとなっている⁵⁸⁻⁶⁶。

FBXW7 は活性型 cyclinE、Noctch4、c-Jun、c-Myc、Aurora A などを標的としているが、これらはすべて細胞周期を回転させる方向に働く正の制御因子であり、癌遺伝子産物である。c-Myc は G0 期への進入を抑制することが知られている。cyclinE は G0 期や G1 期から S 期への進入を調節し、その過剰発現によってゲノム不安定性が引き起こされることも知られている。従って FBXW7 の機能喪失による c-Myc および cyclin E の異常蓄積によって G0 期に入って休止することなく強制的に増殖サイクルが回転することになる。G0 期からの脱出が p27 により抑制されていることもわかっており、Skp2 と FBXW7 による G0 期への進入・脱出機構も興味深い⁶⁷。

図 4



Onoyama et al. Cell Cycle 2008 , modified

図4 SCF ユビキチンリガーゼによる G0 期からS期の細胞周期制御

Skp2 は G0 期から G1 期への移行における p27 の分解を促進し、細胞周期のブレーキを取り除く。G1 サイクルもまた細胞周期再進入において重要な役割を果たしている。同様にFBXW7はc-Mycなどの細胞周期アクセラの分解を促進することにより細胞周期からの脱出を誘導するとされる。

5-5-3. FBXW7 とがん

FBXW7遺伝子はヒトにおいて第4番染色体長腕 locus32 に存在する。本領域は癌において高率に欠失を認める領域である。乳癌細胞株の一つ (SUM149PT)^{68, 69} や子宮体癌細胞株の一部⁷⁰ において機能喪失型の FBXW7 遺伝子変異を有するものがあることが報告された。FBXW7 ノックアウトマウスは胎生 10 日で血管形成の異常をきたして致死に至る⁷¹。T細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスでは胸腺腫を発症し生後1年以内に死に至るという結果が示され⁷²、固形癌発生への関与が示唆されている。

臨床検体では様々な癌腫で FBXW7 の変異が検索され、全体で約 6%に報告されているが、乳癌では 1%以下とまれである⁷³。CGH アレイによる解析でも乳癌における FBXW7 欠失は認められなかったとする報告もあり⁷⁴、乳癌においては FBXW7 機能低下に対する遺伝子変異や欠失の関与は否定的である。一方、転写レベルではグリオブラストーマ⁷⁵、胃癌⁷⁶、大腸癌⁷⁷などで予後不良因子であったとする報告があるが、現在のところ固形癌における報告例は限られたものとなっている。

5-5-4. 本研究の目的

1. 血漿ミッドカイン

過去に他グループにより乳癌組織でのミッドカイン発現は確認されていたが、血中ミッドカインレベルの臨床的意義を検討した報告はない。そこで我々は乳癌患者の血液検体を用いてミッドカインレベルを測定し、乳癌の診断バイオマーカーとしての可能性を検討することとした。

2. 細胞周期調節に関わるユビキチンリガーゼ FBXW7

乳癌組織検体を用いて FBXW7 mRNA の発現レベルを検索し臨床病理学的な意義や予後因子としての可能性を検討する。また免疫組織学的検索により FBXW7 蛋白発現や細胞増殖マーカー(Ki67)、標的蛋白(c-Myc, cyclinE)の発現状況を検討する。また乳癌細胞株を用いて FBXW7 の発現低下が腫瘍増殖に与える影響を検証する。以上の解析から FBXW7 が乳癌において細胞増殖マーカーの一つであることを示す。

6. 実験方法

6-1. 検体

血液検体については2002年より2006年にかけて熊本大学医学部附属病院旧第二外科および乳腺・内分泌外科にて初期治療を行った女性乳癌患者の血漿147検体(非浸潤性乳管癌11例、原発浸潤性乳癌111例、転移性乳癌25例)を対象とした。肝機能障害、関節リウマチ、そのほか基礎疾患に炎症性疾患を持つ患者は除外した。正常検体は同意の得られた臨床検査医学会会員や熊本大学病院職員、およびその家族より採取した血液サンプル104例(女性48例、男性56例)を対象とし、肝機能障害、関節リウマチ、糖尿病の既往のあるものは除外した。

乳癌組織検体については2001年より2008年にかけて熊本大学医学部附属病院旧第二外科および乳腺・内分泌外科にて初期治療を行った女性原発乳癌患者186検体を対象とした。特に除外基準は設定しなかった。検体は生検または術後速やかに採取し液体窒素にて瞬時冷凍を行い、RNA抽出まで -80°C で保管した。対象症例は術後3カ月から6カ月ごとの経過観察を行い、観察期間中央値は33カ月(4-90カ月)であった。免疫染色に関しては前期の186例のうち検体の入手および評価が可能であった183例を対象とした。

全ての患者には十分なインフォームドコンセントを行った後に同意を得て検体を使用し、健常人の検体採取に際しても同様にインフォームドコンセントを行った後に同意の得られた場合にのみ検体を採取した。全ての手術可能な患者に対して根治手術を行い、術前治療および術後補助療法はSt. Gallenのコンセンサスに基づいて施行した。再発時、ホルモン受容体陰性乳癌に対しては化学療法(anthracyclineを含むレジメン、taxanを含むレジメン、他 capecitabine、vinorelbine など)および分子標的治療(Her2 陽性例に対する trastuzumab)を中心とした全身療法を行った。内臓転移を伴わないホルモン受容体陽性乳癌に対してはホルモン療法(SERM、AI、MPAなど)を主に行った。

6-2. 抗体および試薬

免疫蛍光分析装置により使用したマウス由来抗ミッドカインモノクローナル抗体である SC2 および SC4 は東ソー株式会社(Tokyo, Japan)より御供与頂いた。また CEA 測定には Architect[®] CEA kit (Abbott Japan, Co., Chiba, Japan)、CA15-3 測定には Lumipulse CA15-3[®] kit (Fujirebio Diagnostics Inc., Malvern, PA, USA)、NCC-ST-439 測定には Lanazyme ST-439 plate (Nippon Kayaku Co., Tokyo, Japan)を使用した。免疫染色法に使用した抗 ER α 抗体(1D5)および抗 PgR 抗体(PgR636)、ウサギポリクローナル抗 Her2 抗体は、Ki67(MIB-1)はすべてDako Japan (Tokyo, Japan)より購入した。同じく免疫染色法に使用した抗 FBXW7 抗体(3D1)は Abnova 社(Taipei, Taiwan)より、抗 c-Myc 抗体(9 E10)は Santa Cruz Biotechnology 社(CA, USA)より、抗 cyclin E 抗体(13A3)は Neomarkers Laboratories 社(CA, USA)よりそれぞれ購入した。2 次抗体は Nichirei 社(Tokyo, Japan)の Simple Stain MAX-PO[®]を用いた。Western blotting 法では c-Myc 抗体(N-262)を Santa Cruz Biotechnology 社より、抗 cyclin E 抗体(Ab1)は Neomarkers Laboratories 社(CA, USA)より購入、抗 β アクチンモノクローナル抗体として AC-15(Sigma, St. Louis, MO)を使用し、二次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体(Dako)を使用した。

6-3. EIA

ミッドカインの濃度測定は2種類の抗ミッドカインマウスモノクローナル抗体を用いた1ステップサンドイッチEIA法で、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-600II(東ソー株式会社)を用いて行った。磁性ビーズ固相抗ミッドカインマウスモノクローナル抗体とアルカリ性ホスファターゼ標識抗ミッドカインマウスモノクローナル抗体が凍結乾燥状態で封入してある試薬カップに、分注水と血漿サンプル(50 μ l)を添加し、ミッドカインと2種類の抗体による抗原抗体反応を開始させた。37 $^{\circ}$ C、10分間反応を行った後、洗浄水で洗浄し遊離の酵素標識抗体と検体成分を除去した。その後、磁性ビーズに結合した酵素活性を測定するため、酵素基質として4-メチルウンベリフェリルリン酸を添加して37 $^{\circ}$ C、5分間酵素反応を行った。ミッドカイン濃度に依存して増加する蛍光物質(4-メチルウンベリフェロン)の生成速度を測定し、予め作成した検量線から血漿、血清中のミッドカイン濃度を算出した。本研究では固相にSC-2抗体、標識にSC-4を用いて検討を行った。

6-4. 培養細胞

ヒト乳癌由来の細胞株である T47D 細胞は ATCC (American Type Culture Collection Manassas, VA, USA) より購入し、10%非動化ウシ胎児血清 (FBS; Gibco, Carlsbad, CA) を加えた RPMI1640 (Gibco) にて培養を行った。培養に用いた全ての器具類は γ 滅菌済みのものを使用し、全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。また、全ての細胞は 37°C、5%CO₂ 下で静置培養した。

6-5. RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR

組織からの RNA 抽出は液体窒素で急速凍結を行いながら乳鉢・乳棒を用いて破砕した後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で行った。また、細胞の RNA 抽出も同キットを用いて行った。得られた RNA に対して、マイクロ分光光度計 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) で濃度の測定を行い、A260/ A280 nm 比で核酸純度の測定を行った。

抽出した RNA は ExScript® RT reagent Kit (Takara Bio Inc., Tokyo, Japan) プライマーに Random 6 mers を用い 37°C で 15 分間反応させ逆転写し、その complementary DNA (cDNA) をリアルタイム RT-PCR のテンプレートとして使用した。検体に含まれる各 mRNA 量は、LightCycler® 480 SYBR Premix Dimer Eraser (Takara Bio Inc.) を用い LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Switzerland) により測定した。使用したプライマーの配列は以下のとおりである。

FBXW7 forward 5'-CCACTGGGCTTGTACCATGTT-3',

reverse 5'-CAGATGTAATTCGGCGTCGTT-3',

GAPDH forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',

reverse 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'

PCR 条件は、初期変性を 95°C 10 秒、1 サイクル、PCR 反応は 95°C 5 秒、60°C 20 秒を 45 サイクル、融解曲線分析を 95°C 5 秒、65°C 10 秒、95°C 0 秒 (0.2°C/秒) で行った。目的遺伝子の相対定量値は、FBXW7 発現の確認されている T47D 細胞株より採取した cDNA を段階希釈し検量線を作成したうえで GAPDH 発現量との比率で算出した。臨床検体に対しては duplicate、培養細胞より得られた検体に関しては、triplicate で解析を行った。

6-6. 細胞周期非同調フローサイトメトリー

72 時間 siRNA 処理を行った細胞を浮遊液とし 70%エタノールおよび RNAaseA (100U/ml) を加え固定した後、propidium ionide (50 mg/ml) にて染色を行った。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析には FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) および付属解析ソフト Cell Quest software (Becton Dickinson)を用いた。

6-7. 細胞増殖活性の測定

細胞株の *in vitro* における増殖活性の測定は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて行った。培地 (10% FBS含有) および細胞 (1×10^4 個/ml) を96 ウェル培養プレートに撒き、siRNAにて24~72時間処理した。その後、 $10 \mu\text{l}$ のWST-8 reagent solutionを各ウェルに加え、その90分後に EMax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, Osaka, Japan) にて 450 nm の吸光度を測定し、相対値を結果として表した。

6-8. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティング法による解析に供するタンパク質の抽出は以下のように行った。細胞をまず氷冷した PBS にて洗浄した後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma)、50 mmol/L フッ化ナトリウム、1 mmol/L オルトバナジン酸ナトリウムを使用直前に添加した CellLytic M Cell Lysis/Extraction Reagent (Sigma) で氷上15分攪拌して溶解した。溶解液を採取し、 $15,000 \times g$ で15分間遠心することで不純物を除去した。その後、BCA Protein assay Kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) でタンパク質の定量を行い、等量のタンパク質を、SDSサンプルバッファーで調整し95°Cで5分間加熱した。SDSポリアクリルアミドアシドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて泳動し、ニトロセルロース膜に100 mA、1時間で転写した。転写後の膜に対し、5%スキムミルクを0.1% Tween 20 (Sigma) を加えたTBS 溶液 (TBST) (pH7.4) で調整して1時間ブロッキングを行った後、5%ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma) 含有 TBST に溶解したc-Myc抗体 (1:500)、抗cyclin E抗体 (1:500)、抗 β アクチン抗体 (1:2000) を、4°Cで一晩反応させた。TBSTで洗浄後にビオチン標識2次抗体、次いで horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジンにてそれぞれ室温で1時間反応させた。TBSTで洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用い、LAS-4000 mini EPUV (Fuji Film, Tokyo, Japan) にて検出した。

6-9. RNA 干渉 (RNA i)

FBXW7に対する small interfering RNA (siRNA:25 pmol) を LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) を用いて T47D細胞(1 x 10⁴ 個/ml)に導入し、48時間後にトータルRNA および培養上清を採取した。コントロール siRNA としては既知の遺伝子転写産物の全てをターゲットにしない Silencer[®] Negative Control #1 siRNA を使用した。FBXW7に対する siRNA の配列は以下の通りである。

FBXW7 sense 5'-GGAGUAUGGUCAU-CACAAAtt-3'
antisense 5'-UUUGUGAUGACCAUACUCCac-3'.

全ての siRNA は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) にて購入した。

6-10. 免疫組織化学染色

生検時もしくは腫瘍切除時に採取した未治療の組織を免疫組織化学的に解析した。10%緩衝ホルマリン固定した組織はパラフィン包埋して、厚さ 4 μm に薄切し、MAS コートスライドガラス(Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) に接着、固定した。パラフィン切片はキシレンで脱パラフィン、アルコールで脱水した。ER、PgR、Her2、Ki67 検出用切片についてはpH7.0 のクエン酸緩衝液を用いて microwave (170W、20 分間後、室温にて冷却) FBXW7 については pH6.0 のクエン酸緩衝液を用いて microwave (170W、30 分間後、室温にて冷却)にて、c-Myc、cyclin E 検出用切片については、pH7.0 のクエン酸緩衝液を用いて microwave (170W、60 分間後、室温にて冷却)にて抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシターゼ活性を除去するため、3% H₂O₂ にて 10 分間処理した後、非特異反応のブロッキングのため、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル, Osaka, Japan) に 20 分間、室温で反応させた。その後、1%BSA 含有 PBS にて希釈した 1 次抗体 (抗 ER: 50 倍希釈、抗 PgR: 50 倍希釈、抗 Her2: 200 倍希釈、抗 Ki-67: 50 倍希釈、抗 FBXW7: 200 倍希釈、抗 c-Myc: 800 倍希釈、抗 cyclin E: 30 倍希釈) にて 4°C で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、Nichirei 社 (Tokyo, Japan) の Simple Stain MAX-PO[®] (ポリマー標識抗マウスもしくは抗ウサギ IgG) にて室温、30 分反応させた。発色は DAB 基質キット (Dako Cytomation) で行い、ヘマトキシリンにて核染色を行った後に封入し標本を作製した。1 次抗体を PBS に置換したものを陰性コントロールとした。

染色標本の評価は ER、PgR に関しては占有率 10% 以上を陽性とし、Her2 は Herceptest[®] の判定法に従い、占有率 30% 以上の細胞膜染色強度 (0, 1+, 2+, 3+) を判定値とした。0, 1+ は Her2 陰性とし、3+ は陽性と判断した。2+ のものに関しては Her2-FISH を施行し、HER2/

centromere probe of chromosome(CEP)比2.2以上を陽性と判断した。Ki67は強拵 (400倍)3視野にてカウントした総計1000個以上の核数のうち染色陽性のものの比率を算出した(Ki67 labeling index)。FBXW7、c-Myc、cyclin Eに関しては染色強度(0, 1+, 2+, 3+)と、それぞれの染色強度を示す核の占有率の積の総和(H-score: 0~300)にて評価した。

6-11. 統計学的解析

ミッドカインの研究における統計学的解析には、血漿ミッドカインレベルおよび臨床病理学的因子に関しては Mann-Whitney U test または Kruskal-Wallis test を使用した。正常人ミッドカインレベルと各病態における乳癌患者のミッドカインレベルとの多重比較には Steel test もしくは Steel-Dweiss test を使用した。カテゴリ間の相関の解析には chi-square test を使用した。癌検出率の比較においては McNeman test を使用した。

FBXW7 の研究における統計学的解析には、FBXW7 mRNA および蛋白発現レベルと臨床病理学的因子、Ki67 labeling index、c-Myc、cyclinE に関しては Mann-Whitney U test または Kruskal-Wallis test を使用した。BCSS, RFS に関する予後解析には Kaplan-Meiyer 法を使用し、log-rank (Mantel-Cox) test による検定を行った。BCSS に関する単変量解析および多変量解析には Cox's proportional hazards test を使用した。乳癌細胞株の細胞増殖速度間の解析には Student's t-test を使用した。

Steel test および Steel Dweiss test 以外は統計学的ソフト JMP version 7.0.1(SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を使用した。Steel test および Steel Dweiss test は KyPlot version 5.0 (KyenseLab incorpotated, Tokyo Japan)を使用した。統計学的有意差は p 値 < 0.05 とした。

7. 実験結果

7-1. ミッドカイン

7-1-1. 正常人におけるミッドカインレベル

正常人 104 人の血漿ミッドカインレベルは 302 から 1068 pg/ml(中央値 489 pg/ml, 25 パーセンタイル 411pg/ml, 75 パーセンタイル 542 pg/ml)であった(図 5a)。正常人女性 48 人(中央値 488 pg/ml, 25 パーセンタイル 415 pg/ml, 75 パーセンタイル 543 pg/ml)と正常人男性 56 人(中央値 5018 pg/ml, 25 パーセンタイル 409 pg/ml, 75 パーセンタイル 542 pg/ml)の解析では年齢による血漿ミッドカインレベルの差は認められなかった。また年齢間でも差を認めなかった(図 5b)。

図 5

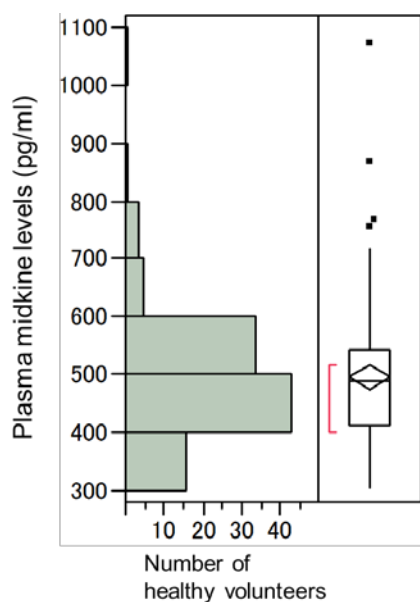


図 5a 正常人血漿におけるミッドカインレベルの分布

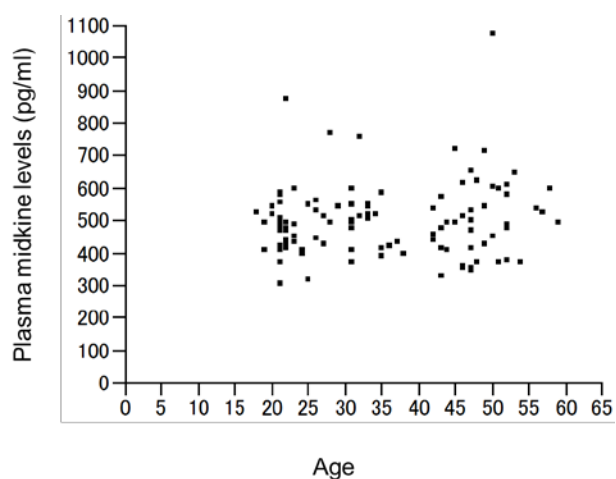


図 5b 正常人における年齢別のミッドカインレベル

7-1-2. 血漿ミッドカインレベルカットオフ値の設定

ROC 曲線(図 6)から求めたカットオフ値は 555 pg/ml であった。(感度 71 %, 偽陰性率 22 %)このカットオフ値では偽陽性率が 20.2 % (21 人/104 人)となるため、特異度を高めるためカットオフを引き上げて設定することとした。正常人のミッドカインレベルの分布をみると、4 人が非常に高い値を示していたため、(1067.9 pg/ml, 865.0 pg/ml, 762.7 pg/ml, 751.4 pg/ml)これらを正常値からの逸脱とし、カットオフを 750 pg/ml と設定した。従って正常人における偽陽性率は 3.8 % (4 人/104 人中)となった。

図 6

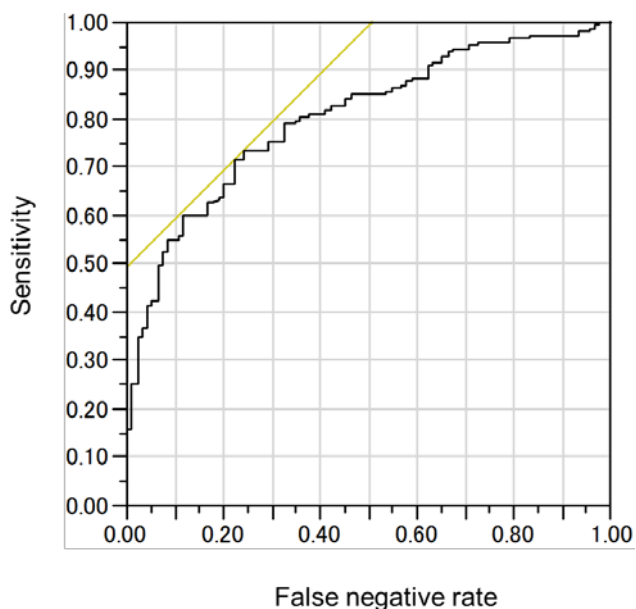


図 6 血漿ミッドカインレベルにおける ROC 曲線

7-1-3. 乳癌患者における血漿ミッドカインレベル

乳癌患者の血漿ミッドカインレベルを図7に示す。正常人と比較すると乳癌患者ではいずれの病期(DCIS 11例、原発浸潤性乳癌 111例、転移性乳癌 25例)でも有意に高値を示した。さらに転移性乳癌患者の血漿ミッドカインレベルはDCISの群や原発浸潤乳癌の群と比較して有意に高値を示していた。しかしDCISと原発浸潤乳癌の間には有意な差は認められなかった。陽性率はDCIS群で9.1% (1/11)、原発浸潤乳癌で32.4% (36/111)、転移性乳癌で64.0% (16/25)であった。

図 7

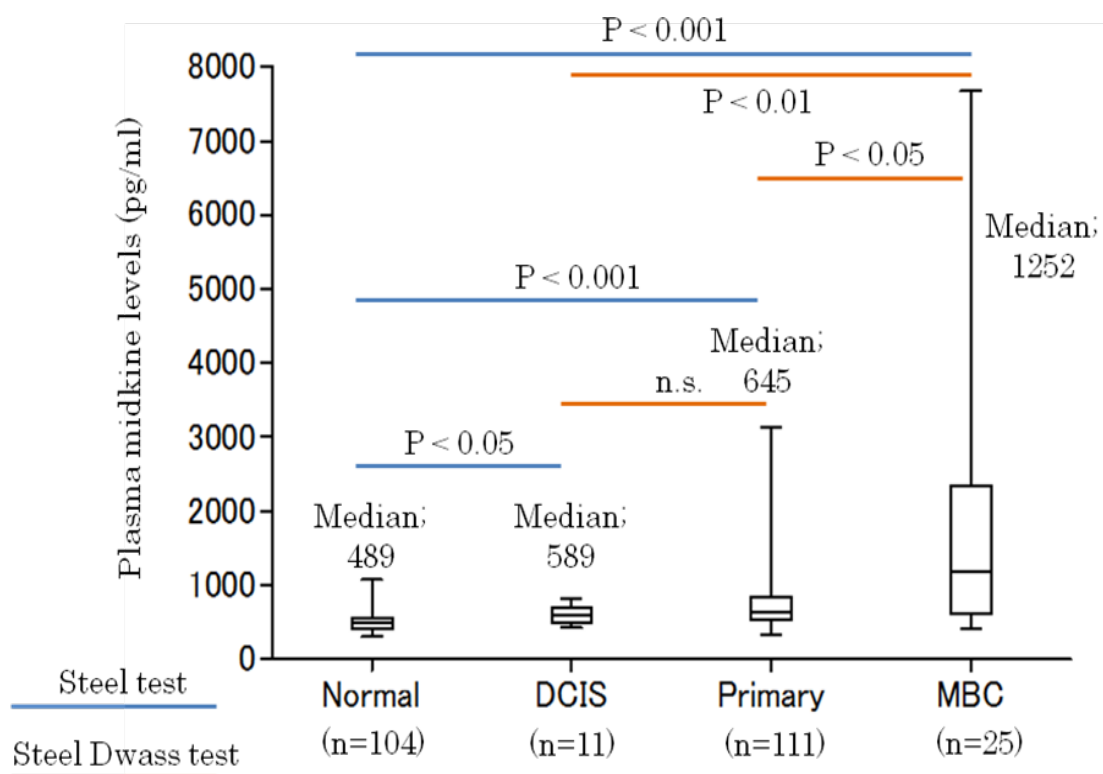


図 7 正常人と病態別乳癌患者の血漿ミッドカインレベル

7-1-4. 原発浸潤性乳癌患者における血漿ミッドカインレベルと臨床病理学的因子との相関

原発浸潤性乳癌患者 111 人の血漿ミッドカインレベルと臨床病理学的因子との相関を表 3 に示す。閉経後の患者群では閉経前と比較して有意に高値を示していた。また、高核グレード群では高い値を示していた。その他の因子では有意差を認めなかった。

表 3 原発浸潤性乳癌患者におけるミッドカインレベルと臨床病理学的因子

Clinical parameters		No. of patients	Mean midkine levels (pg/ml)	P value	Positive rate (≥750 pg/ml)
			Median (25 th ,75 th percentile)		
Menopause,	Pre-	28	558 (472, 726)	0.0497	17.9%
	Post-	83	688 (555, 860)		39.8%
Tumor size (mm)	≤20	64	690 (555, 854)	n.s	40.6%
	>20	47	597 (500, 763)		25.5%
Nodal status	-	70	603 (521, 812)	n.s	30.0%
	+	41	697 (528, 861)		41.5%
Stage	I	44	652 (531, 816)	n.s	34.1%
	II	55	604 (500, 831)		29.1%
	III	12	743 (545, 849)		58.3%
Nuclear grade	1	65	601 (491, 783)	0.0343	29.6%
	2	26	636 (534, 766)		26.9%
	3	20	835 (581, 1006)		60.0%
Lymphatic invasion	-	80	640 (518, 794)	n.s.	31.3%
	+	31	645 (528, 844)		41.9%
Vessel invasion	-	102	646 (523, 824)	n.s.	34.3%
	+	9	605 (520, 866)		33.3%
ER	-	24	668 (563, 849)	n.s.	41.6%
	+	87	608 (511, 824)		32.2%
PgR	-	47	658 (544, 835)	n.s.	38.3%
	+	64	606 (493, 825)		31.3%
HER2	-	95	625 (519, 826)	n.s.	33.7%
	+	16	652 (563, 836)		38.3%

7-1-5. 血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカーの比較

血漿ミッドカインの乳癌検知能を検討するため、乳癌診療においてこれまでによく使われてきた3種の腫瘍マーカー（CA15-3、CEA、NCC-ST-439）との比較を行った。CEA、CA15-3、NCC-CT-439のそれぞれの正常上限はキットの添付文書に従いそれぞれ2 ng/mL, 30 U/mL と 7.0 U/mLとした。

まず全乳癌患者のうち血漿ミッドカイン陽性と判定した症例は36.1% (53/147)であった。特に原発浸潤性乳癌の患者群においては他マーカーより高い陽性率を示していた(表4)。血漿ミッドカインは対象とした全乳癌患者においてCA15-3、CEA、NCCST-439のいずれと比較しても陽性率が高かった(表5)。また、他3種の腫瘍マーカー全てで検知不能であった乳癌患者103例のうち、血漿ミッドカインのみで癌検知が可能であったのは22例(21.4%; 22/103)であった。逆に従来の3種の腫瘍マーカーを組み合わせると血漿ミッドカインで検知不能であった94例の乳癌患者のうち22例(10.8%)を検知することができた。従来の腫瘍マーカー3種を全て組み合わせると癌検出率は29.9%であったが、血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカー2種を組み合わせると検出率が上昇した(表6)。

表4 血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカーにおける乳癌検出率

	No. of patients	Midkine	CA15-3	CEA	NCCST-439
DCIS	11	1 (9.1%)	0 (0%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)
Primary	111	36 (32.4%)	2 (5.3%) ^a	20 (18.0%) ^b	5 (4.5%) ^a
Metastatic	25	16 (64.0%)	16 (64.0%)	16 (64.0%)	9 (36%) ^c
All	147	53 (36.1%)	18 (12.2%) ^a	37 (25.2%) ^d	15 (10.7%) ^a

a: p<0.0001, b: p=0.0077, c: p=0.0082, d: p=0.0094 (McNeman test)

表 5 血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカーにおける乳癌検出率の相関

a) 血漿ミッドカインと CA15-3

	CA15-3 elevation (-)	CA15-3 elevation (+)
Midkine elevation (-)	89 (60.1%)	5 (3.4%)
Midkine elevation (+)	40 (27.2%)	13 (8.8%)

p=0.0006 (Chi-square test)

b) 血漿ミッドカインと CEA

	CEA elevation (-)	CEA elevation (+)
Midkine elevation (-)	83 (56.5%)	11 (7.5%)
Midkine elevation (+)	27 (18.4%)	26 (17.7%)

p<0.0001 (Chi-square test)

c) 血漿ミッドカインと NCC-ST-439

	NCCST-439 elevation (-)	NCCST-439 elevation (+)
Midkine elevation (-)	90 (61.2%)	4 (2.7%)
Midkine elevation (+)	42 (28.6%)	11 (7.5%)

p=0.0031 (Chi-square test)

表 6 血漿ミッドカインと従来の腫瘍マーカーの組み合わせによる原発浸潤性乳癌
および転移性乳癌の検出率

Combination of tumor markers	No. of cases (%)
1) CA15-3/CEA/NCCST-439 positive	44(29.9%)
2) Midkine/CA15-3/CEA positive	66 (44.9%)
3) Midkine/CA15-3/NCCST-439 positive	61 (41.5%)
4) Midkine/CEA/NCCST-439 positive	66 (44.9%)

1) vs 2); $p < 0.0001$, 1) vs 3); $p = 0.0031$, 1) vs 4); $p < 0.0001$ (McNeman test)

7-2. FBXW7

7-2-1. 腫瘍組織におけるFBXW7 mRNA 発現レベルおよび免疫組織学的発現レベルと臨床病理学的因子

表 7 に対象とした乳癌患者 186 例の FBXW mRNA 発現レベルとの臨床病理学的因子との相関関係を示す。FBXW7 mRNA の発現レベルは全症例の中央値は 118 (最小 0.043、最大 588.9) であった。FBXW7 mRNA 発現レベルは高核グレード (grade 3)、および ER 陰性または PgR 陰性の患者群で低値を示した。他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。FBXW7 免疫染色スコア単独では Her2 陽性のみで低スコアの傾向があるのみであった。(表 8)

表 7 FBXW7 mRNA 発現と臨床病理学的因子の相関

Clinical parameters		Number of patients	FBXW7 mRNA Median (25 th ,75 th percentile)	P value
Age(y)	≥50	144	10.3 (4.2,38.7)	0.21
	<50	42	19.3 (2.2,38.4)	
Menopause	Pre-	52	17.9 (5.2,42.0)	0.15
	Post-	134	10.3 (4.0,38.5)	
Tumor size (mm)	≤20	82	10.9 (4.9,36.5)	0.79
	>20	104	13.7 (3.9,38.9)	
Nodal status	-	120	12.0 (4.1,40.7)	0.55
	+	66	9.1 (4.4,33.9)	
Clinical stage	I	72	11.5 (4.3,32.4)	0.84
	II	93	13.3 (4.3,40.7)	
	III	21	13.3 (2.8,41.6)	
Histological grade	1,2	134	14.0 (5.2,43.6)	0.024*
	3	51	7.4 (2.3,30.3)	
Lymphatic vessel invasion	-	141	10.9 (3.9,77.0)	0.11
	+	45	19.7 (6.1,41.2)	
Blood vessel invasion	-	165	11.3 (4.1,37.0)	0.071
	+	21	20.4 (9.1,79.1)	
ER	-	53	7.1 (2.3,31.2)	0.009*
	+	133	13.7 (5.2,42.4)	
PgR	-	77	8.8 (3.1,32.9)	0.027*
	+	109	13.7 (5.2,45.1)	
HER2	-	155	13.1 (4.5,42.7)	0.21
	+	31	7.1 (3.4,31.4)	
Tumor Subtype†	Luminal	135	13.5 (5.1,42.7)	0.076
	HER2	21	7.4 (2.6,32.1)	
	Triple Negative	27	6.9 (2.0,31.1)	

Tumor subtype は ER,PgR,および Her2 発現の組み合わせによって定義される。
 Luminal: ER(+) もしくは PgR(+), HER2: ER(-)かつ PgR(-)かつ Her2(+),
 Triple Negative: ER(-)かつ PgR(-)かつ Her2(-)

表 8 FBXW7 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

Clinical parameters		Number of patients	FBXW7 protein H-score Median (25 th ,75 th percentile)	P value
Age(y)	≥50	142	120 (80,180)	0.97
	<50	40	110 (80,180)	
Menopause	Pre-	51	100 (70,160)	0.15
	Post-	132	120 (80,180)	
Tumor size (mm)	≤20	79	120 (80,180)	0.93
	>20	104	115 (40,115)	
Nodal status	-	119	120 (80,180)	0.75
	+	64	110 (80,180)	
Clinical stage	I	72	120 (80,180)	0.93
	II	91	110 (80,180)	
	III	20	110 (70,180)	
Histological grade	1,2	133	110 (80,175)	0.47
	3	50	120 (80,187)	
Lymphatic vessel invasion	-	140	80 (40,120)	0.64
	+	43	80 (30,110)	
Blood vessel invasion	-	163	110 (80,180)	0.46
	+	20	80 (54,140)	
ER	-	53	120 (70,175)	0.34
	+	130	120 (80,180)	
PgR	-	76	115 (80,176)	0.52
	+	107	120 (80,180)	
HER2	-	154	120 (80,180)	0.047*
	+	29	90 (60,142)	
Tumor Subtype†	Luminal	129	120 (80,180)	0.15
	HER2	20	90 (60,145)	
	Triple Negative	24	140 (80,180)	

Tumor subtype は ER,PgR,および Her2 発現の組み合わせによって定義される。
 Luminal: ER(+) もしくは PgR(+), HER2: ER(-)かつ PgR(-)かつ Her2(+),
 Triple Negative: ER(-)かつ PgR(-)かつ Her2(-)

7-2-2. 腫瘍組織におけるFBXW7 mRNA 発現レベルおよび免疫組織学的発現レベルと 予後との相関

予後解析においては局所再発および遠隔転移を再発とみなし RFS を算出、また乳癌死に限ってイベントとみなし BCSS を算出し、それぞれ生存解析を行った。観察期間内に対象症例中 23 例(局所再発 3 例、遠隔転移 20 例)に再発を認め、うち 14 例が癌死をきたしていた。予後解析における臨床的意義を検索し、かつ発現レベルのカットオフ値を設定するため、様々な FBXW7 mRNA 発現レベル値を用いて DFS, BCSS につきそれぞれ Kaplan-Meier 法による生存解析を行った。

図 8

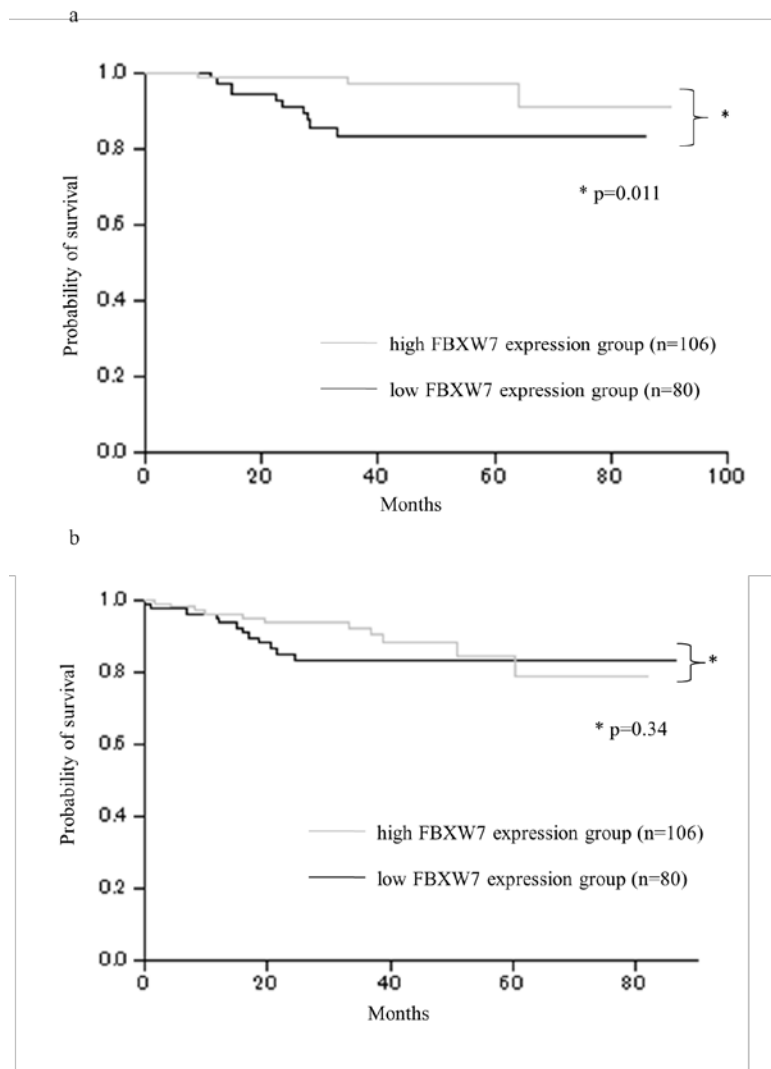


図 8a(上) BCSS における FBXW7mRNA 発現レベルとの相関

図 8b(下) RFS における FBXW7mRNA 発現レベルとの相関

カットオフ値を 9.3 と設定すると BCSS において低発現群(中央値 3.6, 25 パーセンタイル 2.0, 75 パーセンタイル 5.7, n=80)と高発現群(中央値 33.0, 25 パーセンタイル 14.9, 75 パーセンタイル 72.0, n=106) (p=0.011; 図8a)の間で有意差を認め、FBXW7 mRNA 低発現は多変量解析において独立した予後因子として規定された。(p=0.033; 表 9)同様に RFS についても解析を行ったが、いずれのカットオフ値においても有意差を認めなかった。(p=0.34; 図 8b)

表 9 FBXW7 mRNA および蛋白発現レベルと臨床病理学的因子による BCSS に関する単変量解析および多変量解析

Variable	Univariate		Multivariate	
	Relative risk (95% CI)	P	Relative risk (95% CI)	P
Tumor size (<20mm)	4.21 (1.13-27.20)	0.030*	6.84 (1.29-125.83)	0.019*
Nodal status	2.85 (0.95-9.45)	0.061		
Nuclear grade (1 or 2 / 3)	6.00 (1.88-22.50)	0.0024*	1.31 (0.38-5.43)	0.68
Lymphovascular invasion	1.91 (0.61-5.81)	0.25		
ER	33.24 (6.52-605.9)	<0.0001*	20.23 (3.29-390.84)	0.0005*
PgR	8.93 (2.39-57.80)	0.0006*		
Her2	0.88 (0.13-3.31)	0.88		
FBXW7 mRNA	4.75 (1.45-21.20)	0.0089*	3.94 (1.11-18.48)	0.033*
FBXW7 protein	2.68 (0.88-7.71)	0.080		

再発患者 23 人において、初期治療前の FBXW7 mRNA の発現レベルの低い症例では再発から死亡までの期間が有意に短縮していた ($p=0.024$; 図 9)。

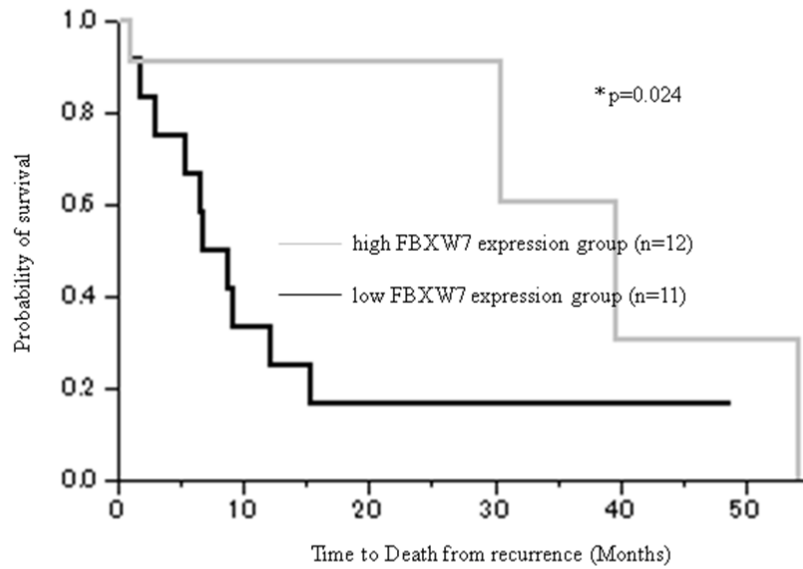


図 9 1FBXW7 mRNA 発現レベルと再発から死亡までの期間との相関

FBXW7免疫染色スコアに関してもカットオフ値を70とした場合にBCSSでより予後に差が出る傾向がみられた(BCSS p=0.058 vs. RFS p=0.124; 図10a,b)。

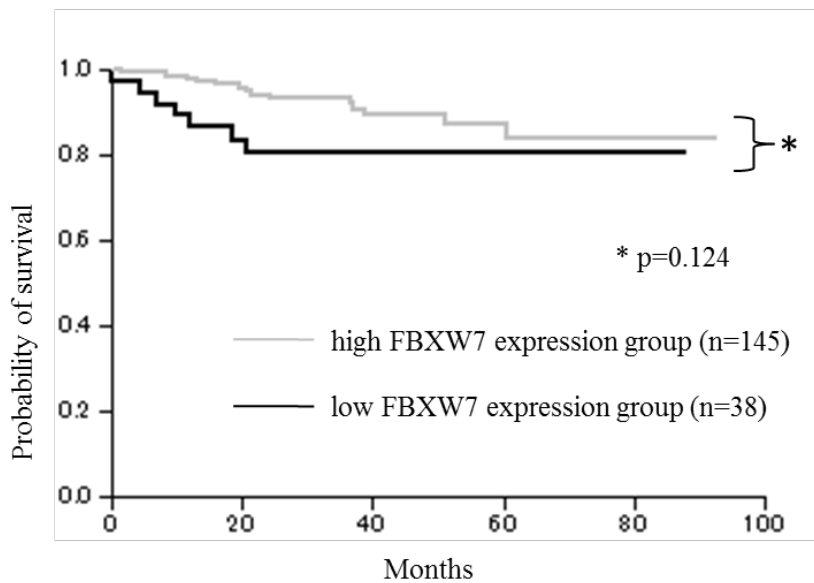
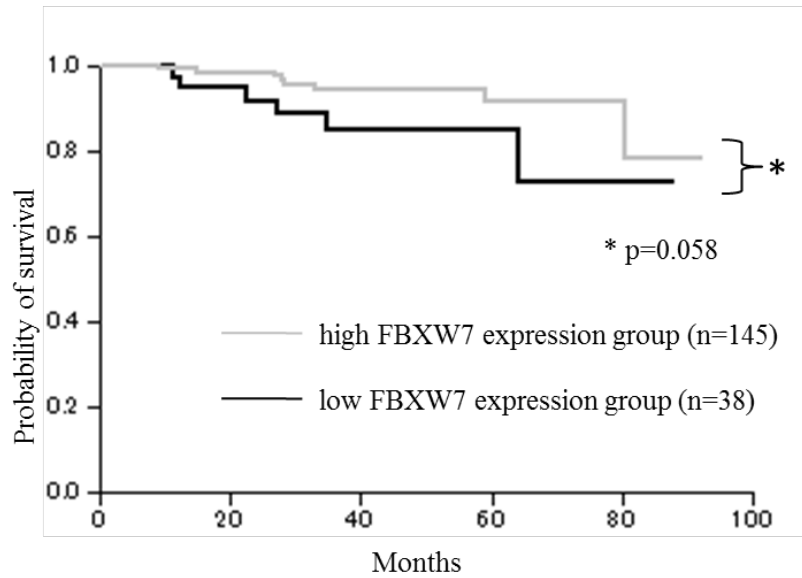


図10a(上) BCSSにおけるFBXW7 蛋白発現レベルとの相関

図10b(下) RFSにおけるFBXW7 蛋白発現レベルとの相関

7-2-3.FBXW7mRNA発現レベルとFBXW7 蛋白発現、Ki67 labeling index, c-Myc
および cyclin E 蛋白発現の関係

FBXW7蛋白発現について mRNA 発現との関係の解析を行ったところ両者の間には相関する傾向が認められた ($p=0.031$, $R^2=0.025$; 図 11a)。また正常乳管上皮細胞はほぼ全ての症例で中程度から高度の染色強度を示していたが、(図 11b)腫瘍細胞は様々な発現レベルを示していた (図 11c:低, 図 11d:中, 図 11e:高)。

図 11

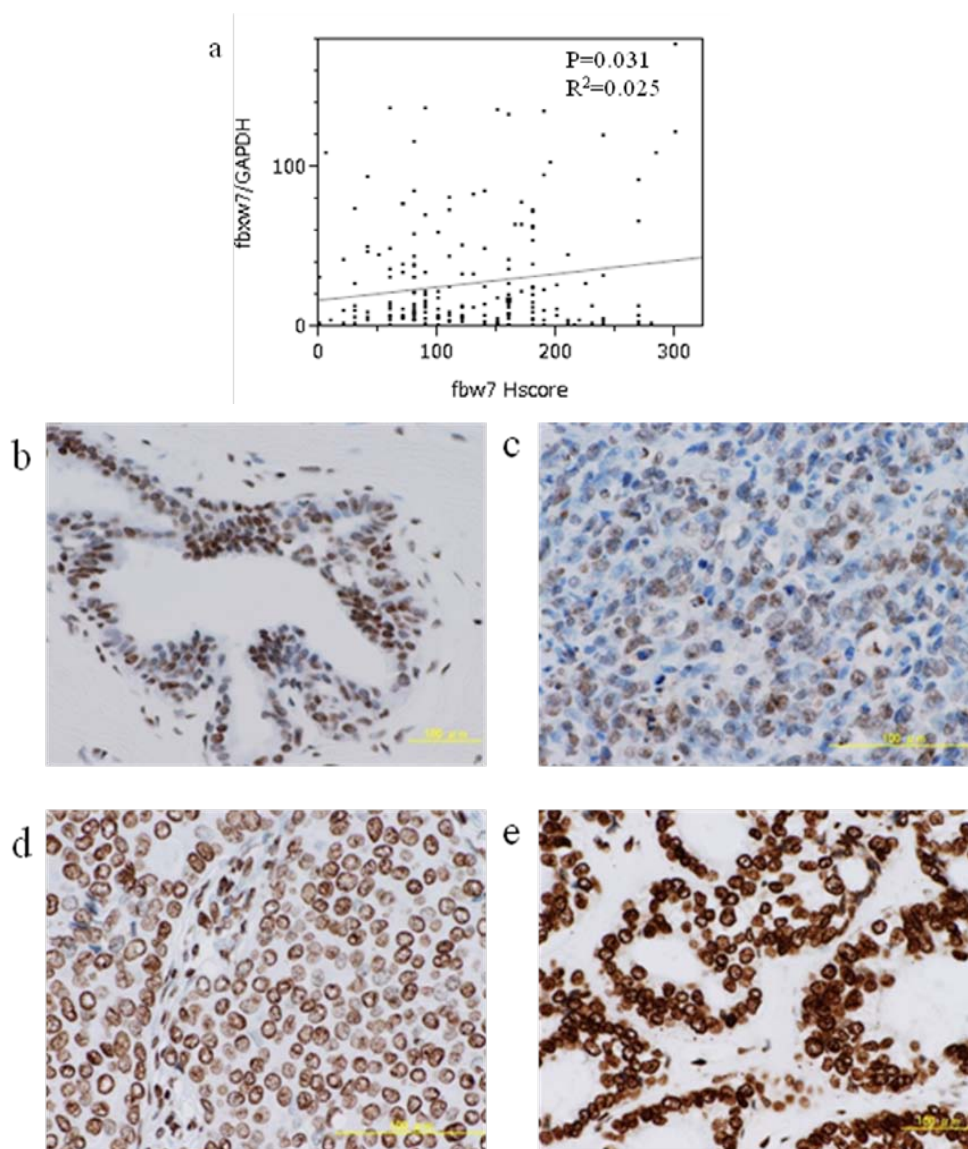


図 11 a: FBXW7mRNA発現レベルとFBXW7 蛋白発現の相関
b: 正常乳管上皮細胞におけるFBXW7 蛋白発現,
c: 腫瘍細胞におけるFBXW7 蛋白低発現 d:同中等度発現, e: 同高発現

FBXW7 mRNA 低発現群では Ki67 labeling index が高く、c-Myc 蛋白発現との相関は認められなかったが (図 12a, 表 10)、cyclin E 蛋白発現との逆相関を認めた (図 12b, 表 10)。

図 12

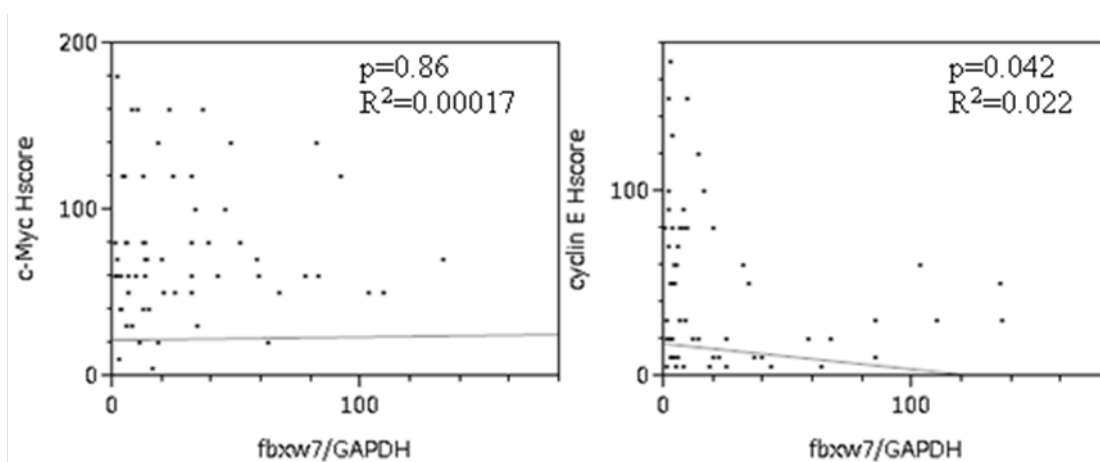


図 12a FBXW7 mRNA 発現レベルと c-Myc 蛋白レベルの相関

図 12b FBXW7 mRNA 発現レベルと cyclin E 蛋白レベルの相関

表 10 カットオフ値(9.7)による FBXW7 mRNA 発現レベルと Ki67 labeling index, c-Myc, cyclin E 蛋白発現の相関

Variable	FBXW7 mRNA		P
	Low expression group n=78 (42.6%)	High expression group n=105 (57.4%)	
Ki67 index (%)			
Median (25 th , 75 th percentile)	50.6 (37.3, 67.5)	30.7 (15.9, 46.2)	<0.0001*
c-Myc H-score (Mean ± SD)	17.0 ± 37.8	26.23 ± 43.9	0.0966
Cyclin E H-score (Mean ± SD)	24. ± 41.13	8.3 ± 27.03	0.0009*

FBXW7 mRNA 低発現症例、FBXW7 mRNA 高発現症例それぞれの典型的な染色例を図 4 に示す。図 13a、b、c、d は FBXW7 mRNA 低発現症例であり、Ki67 labeling index 高値 (91.3%)、FBXW7 蛋白低発現、c-Myc および cyclin E 高発現を示していた。このような典型例を 8 例 (10.2%; 8/78) 認めた。図 13e、f、g、h は FBXW7 mRNA 高発現症例であり、Ki67 labeling index 低値 (11.1%)、FBXW7 蛋白高発現を示し、c-Myc および cyclin E 発現は認めなかった。このような典型例を 60 例 (57.1 %; 60/105) 認めた。

図 13

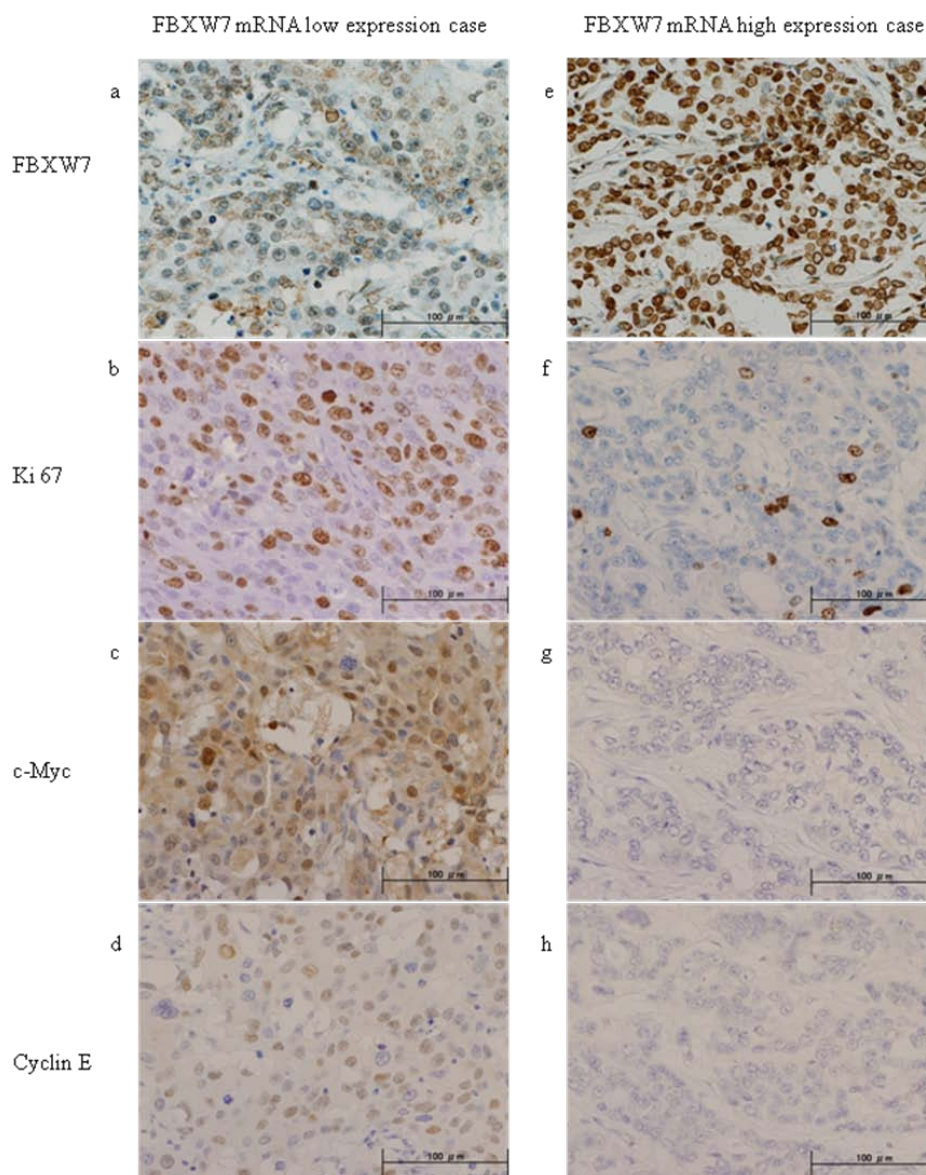


図 13 a,b,c,d: FBXW7 mRNA 低値であった症例、 e,f,g,h: FBXW7 mRNA 高値であった症例における免疫染色所見

7-2-4. In vitro での FBXW7 発現抑制による細胞周期の遷移および増殖への影響

種々の乳癌細胞株および正常乳腺上皮細胞株での FBXW7 mRNA の発現では T47D において最も発現が高かった(図 14a)。そこで T47D を用いて siRNA による FBXW7 の発現抑制を行い71%の抑制率を得たところで、(図 14b) c-Myc、cyclinE を Western Blotting にて検出するとコントロール siRNAと比較して両蛋白に増加を認めた(図 14c)。さらに細胞周期解析でも G1 期の減少および S 期にある細胞の増加が認められ(図 15a)、細胞増殖アッセイでは継時的に増殖速度の増加を認めた(図 15b)。

図 14

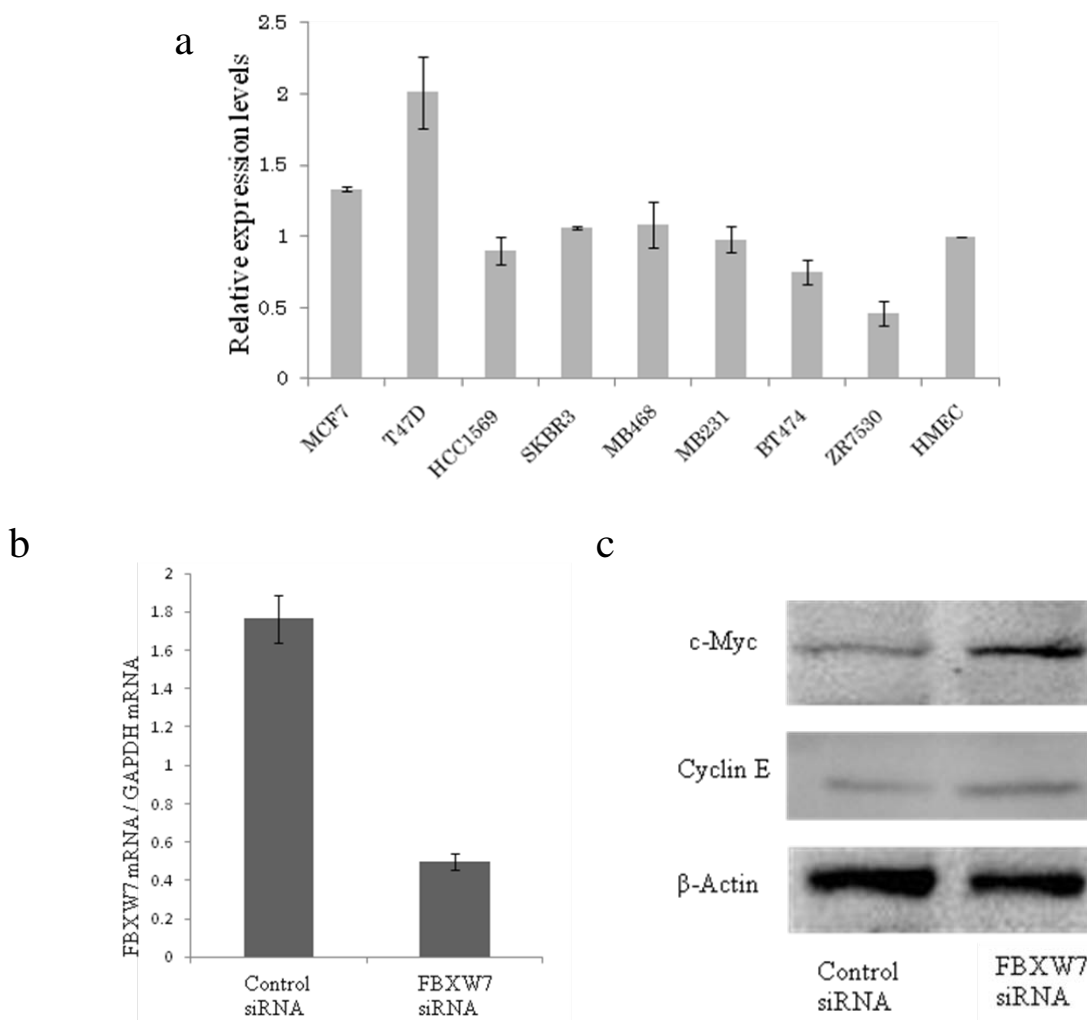
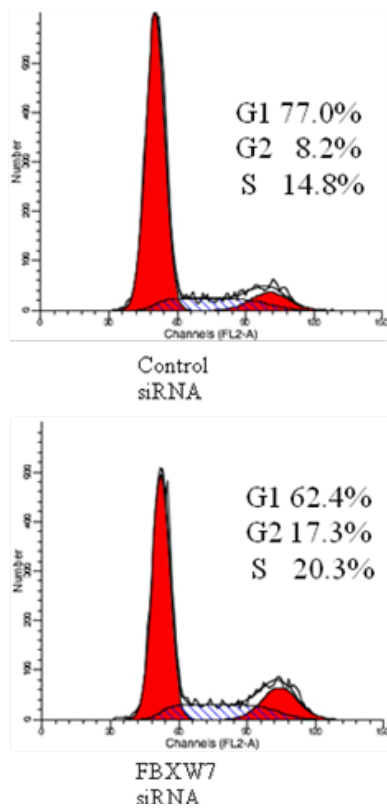


図 14 a: 種々の乳癌細胞株における FBXW7 mRNA 発現、b:FBXW7 siRNA により得られた発現抑制、c: FBXW7 siRNA 発現抑制による c-Myc, cyclin E 蛋白の蓄積

図 15

a



b

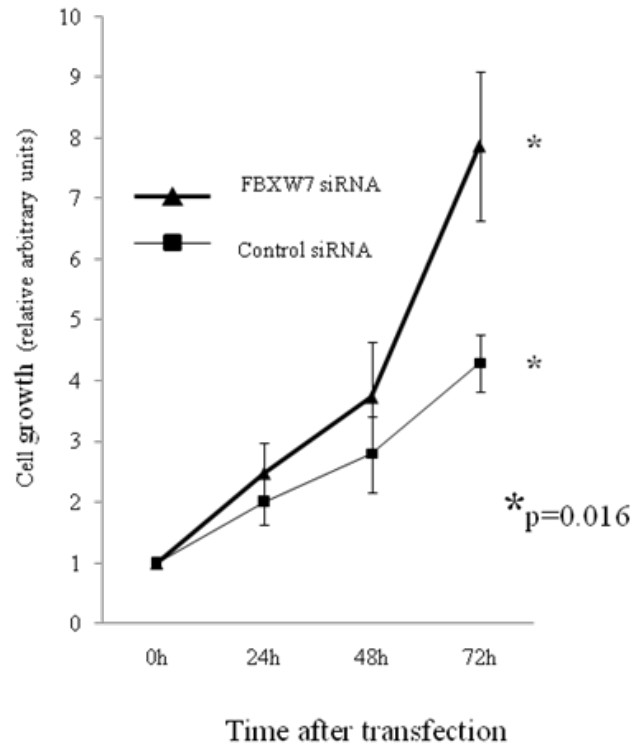


図 15 a: FBXW7 発現抑制による細胞周期分画の変化

b: FBXW7 発現抑制による細胞増殖の促進

8. 考察

8-1. 血漿ミッドカインレベル

近年、我々のグループでは口腔扁平上皮癌において腫瘍細胞でのミッドカイン蛋白発現と正常組織より高いレベルの mRNA の発現を示し、さらにミッドカイン血中濃度の予後因子および早期診断マーカーとしての可能性を示した¹⁷。食道癌では癌組織のミッドカイン発現と血清中ミッドカインレベルとの間に正の相関関係があることが示されており⁵²、乳癌においても既に癌組織でのミッドカイン過剰発現の報告がある^{45, 46}。本研究では血漿ミッドカインが乳癌患者、特に転移性乳癌の症例で高値であり、DCIS の患者では上昇していないことが示された。我々は乳癌においても腫瘍細胞がミッドカインを分泌しており浸潤・転移に従って循環血液中に流出すると予測している。

閉経後の原発浸潤性乳癌患者では血漿ミッドカインレベルが有意に高値を示していた。過去の文献では健常者の血清ミッドカインレベルと年齢との間に有意な相関を示したものがある⁷⁸。本報告と同様に我々の用いた 18～60 歳の正常検体血漿ミッドカインレベルと加齢との関係を検討したが、有意な所見は得られなかった。また、高核グレードの症例で血漿ミッドカインレベルの高値を認めたが、その他の臨床病理学的因子との相関は認められなかった。核グレードは腫瘍の分化と悪性度の一指標であり、高核グレードは低核グレードと比較して高い増殖能を持ち予後不良とされている⁷。原発浸潤性乳癌患者の血漿ミッドカインレベルは腫瘍量だけではなく、その蛋白生産能(活動性、すなわち悪性度)に依存する可能性も考えられる。

Shimada らはまた、血清ミッドカインによる食道癌検出率が CEA、SCC とサイトケラチン 19 フラグメントよりも高いことを示している⁵²。我々はミッドカインの乳癌検出マーカーとしての可能性を評価するために、ミッドカインと CA15-3、CEA と NCCST-439 を含む他の従来の腫瘍マーカーとの比較解析を行った。CA15-3 と CEA は、臨床的に有用であることが示されており、実地臨床で使用するよう推奨されている。NCC-ST-439 抗原(ST-439)は腫瘍関連糖鎖抗原であり、CA15-3 や CEA との相関性は全くなく、これらと比較して感度では優れているが特異度は低い⁷⁹。血漿中ミッドカインの乳癌検出率は CEA、CA15-3、NCCST-439 よりも高率であり、これら従来のマーカーとの組み合わせで用いると従来のマーカー同士の組み合わせと比較して大幅に検出率が高くなった。総じてミッドカインは浸潤性乳癌の検出に関して従来のマーカーよりも非常に有用と考えられる。

本研究ではミッドカインの測定法についても検討を行い、自動免疫蛍光分析装置による二つの抗体を用いたステップサンドイッチ法は ELISA よりも簡便で感度に優れた方法であることがわかった。本検査法により短時間で多量の検体(約 1 時間に 60 検体、機械によっては 1 時間に 170 検体)を計測することが可能であり、マスキリーニングとして臨床応用できる可能性も高いと考えられる。

8-2. 腫瘍組織における FBXW7 発現

本研究において我々は腫瘍組織の FBXW7 mRNA 発現解析と蛋白発現解析を 186 例の乳癌患者に対して行った。FBXW7 mRNA 発現レベルは高核グレード症例で低い傾向にあった。核グレードは腫瘍細胞の核を鏡検しスコア化することで DNA 合成や核分裂の程度を評価していること⁸⁰、また FBXW7 mRNA の低発現の患者群では Ki67 labeling index が有意に高かったことも併せ、FBXW7 mRNA の発現低下が腫瘍細胞の細胞周期回転に影響を及ぼしているものと考えられる。また in vitro の実験で FBXW7 のノックダウンにより S 期分画の増加や細胞増殖速度の増加が認められたことから合理的に説明がつく。近年の乳癌における cDNA マイクロアレイを用いたプロファイリングによるサブタイプ分類の研究では、ホルモン受容体関連遺伝子群低発現のサブタイプが増殖に関する遺伝子群の高発現を示すことが報告されている⁸¹。本研究でも ER 陰性および PgR 陰性の患者群では有意に FBXW7 mRNA 発現レベルが低下していた。また、ER, PgR, Her2 の免疫染色結果の組み合わせによって簡易的に分類されるサブタイプでは、ホルモン受容体陰性群である HER2 群、Triple Negative 群ではホルモン受容体陽性群である Luminal 群と比較して FBXW7 mRNA 低発現を示していた。Yu らは FBXW7 のイントロン 2 に存在する SNP と ER 陰性乳癌への易罹患性の関連を示している⁸²。FBXW7 とホルモン受容体に関して現存するのはこの報告のみであるが、FBXW7 の異常が何らかの形で増殖能の高い性格を持つホルモン受容体陰性乳癌と関連していることが示唆される。

我々は乳癌の臨床検体における FBXW7 の蛋白発現解析も行った。正常乳管上皮細胞はほぼ全ての症例で中程度から高度の染色強度を示していたが、腫瘍細胞は様々な発現レベルを示していた。予備実験で外科的切除時に同時に採取される、腫瘍を含まない正常乳腺組織と腫瘍組織において FBXW7 mRNA の発現レベルを比較していたが、有意な結果ではなかった。そこで免疫染色において間質を観察すると間質に存在する細胞の FBXW7 発現強度は様々であることが確認できた。正常乳管細胞と癌細胞との mRNA 発現レベルを比較するには厳密に正常乳管上皮細胞のみをマイクロダイセクションで選別する必要があると考えた。FBXW7 の免疫染色による蛋白発現レベルは mRNA 発現レベルと弱い相関関係を示し mRNA と同様に RFS よりも BCSS においてより予後との相関がみられるというパターンであったが、免疫染色の結果単独では有意な臨床的意義は見出せなかった。

FBXW7 に関しては遺伝子変異や欠失などが機能低下の一因として知られているが、乳

癌ではそのどちらも稀であるという報告がある。また本研究の結果でFBXW7 mRNAの発現レベルと蛋白発現レベルの間に大きな相違は無かったがmRNAの検索によって臨床的意義を見出したことからFBXW7の発現調節機構としてmRNAレベルでの発現調節が関与している可能性がある。転写因子であるp53の関与⁸³やプロモーター領域のメチル化⁸⁴、microRNA⁸⁵ (non-coding RNA) による発現制御などが考えられる。

FBXW7はc-Mycやcyclin Eをユビキチン化することでこれらの蛋白の量的な調節を行っている。我々はFBXW7のノックダウンによって細胞周期を増殖側に制御するc-Myc、cyclin Eの蛋白の蓄積が引き起こされ、その結果としてS期への移行や細胞増殖速度の増加が起こることをin vitroの実験で示した。臨床検体での検討ではFBXW7 mRNA発現レベルはcyclin E発現レベルと逆相関を示したが、c-Mycでは同様の結果が得られなかった。なお対象とした臨床検体のうち予想される発現レベルの組み合わせ (FBXW7 mRNA 低発現、c-Myc高発現、cyclin E高発現) が認められたのは8例(4.3%)のみであった。乳癌ではc-Myc、cyclin Eそれぞれ単独でも遺伝子増幅や過剰発現が認められている⁸⁶。c-MycはエストロゲンによりERを介して転写調節を受けているため⁸⁷、ER陽性であることや腫瘍部のエストロゲン濃度に依っても発現レベルの個体差がみられる可能性がある。またc-Mycの遺伝子増幅はその臨床的意義が認められているものの⁸⁸⁻⁹⁰、mRNA発現レベルおよび蛋白発現の臨床的意義に関しては一定した知見に乏しい⁹¹⁻⁹⁴。さらに我々の使用したc-Myc抗体(乳癌に関して頻用実績のある抗体)が組織固定条件の影響を受けやすく安定した染色性を示さない場合があると指摘している報告もみられた⁹⁵。我々の得たc-Mycの蛋白発現に関する一見矛盾したかのような結果はFBXW7の異常のみに依存するのではなく、前述のさまざまな要因が複合的に影響を及ぼしたものと考えている。

FBXW7 mRNA低発現はBCSSについて独立した予後因子として規定されたが、RFSでは有意差を認めなかった。乳癌においてcyclin Eが予後不良因子であるという知見は既に確立されており、なかでもcyclin Eの低分子アイソフォームが注目されている⁹⁶。cyclin Eの発現と乳癌患者の予後に関するメタアナリシスでは、本研究の結果と同様にBCSSのみで予後不良を示すという特徴的なパターンを示していた⁹⁷。このことから本研究で我々が示した予後に関する有意な結果は、FBXW7の発現低下および機能低下によって影響を受けた蛋白群の影響に起因すると考えた。

観察期間中再発患者23人における初期治療前のFBXW7 mRNAの発現レベルと再発から死亡までの期間には相関関係があったことは、特筆すべきことである。これはFBXW7が早期再発予測マーカーや治療抵抗性マーカーとなる可能性を示していると考えられる。

9. 今後の展望

9-1. 血漿ミッドカインレベル

本研究によって血漿ミッドカインレベルの乳癌早期診断マーカーとしての可能性が示されたが、単施設・少数検体での検討のため validation study を要する。検診施設や他の乳癌診療機関との共同研究により検診時のがんスクリーニングのツールとしての有用性を確認したい。

9-2. 腫瘍組織における FBXW7 発現

本研究によって FBXW7 が予後予測因子であり細胞増殖マーカーの一つである可能性が示された。また、FBXW7 mRNA 低発現の患者では再発から死亡までの期間が短いことから、この分子の治療反応性への関与が考えられるため、術前療法の効果予測マーカーとしての検討が必要である。

また、この分子は Skp2 と拮抗関係を保ちながら細胞周期上 G0 期への進入、G0 期からの脱出を調節していると考えられており、癌細胞ではこのバランスが崩壊している可能性がある。乳癌組織でのこれらの分子の発現解析を行い、これらのユビキチンリガーゼが抗腫瘍効果を発揮する新しい治療標的となりうることを検討したい。

10. 結 語

本研究により、血漿ミッドカインレベルの乳癌早期診断バイオマーカーとして有用である可能性が示された。また、FBXW7 の乳癌における予後規定因子および増殖マーカーとしての臨床的意義が示された。

11. 参考文献

- [1] <http://ganjoho.jp/professional/index.html>.
- [2] Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3817-27.
- [3] Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3357-65.
- [4] Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 2005; 16: 1569-83.
- [5] Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*. 2007; 18: 1133-44.
- [6] Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-26.
- [7] Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 5287-312.
- [8] Buyse M, Loi S, van't Veer L, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 1183-92.
- [9] Iwase H, Kobayashi S, Itoh Y, et al. Evaluation of serum tumor markers in patients with advanced or recurrent breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 33: 83-8.
- [10] Iwase H, Greenman JM, Barnes DM, Bobrow L, Hodgson S, Mathew CG. Loss of heterozygosity of the oestrogen receptor gene in breast cancer. *Br J Cancer*. 1995; 71: 448-50.
- [11] Iwase H, Omoto Y, Toyama T, Hara Y, Iwata H, Kobayashi S. Clinical Significance of Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Breast Cancer*. 1999; 6: 325-30.
- [12] Iwase H, Omoto Y, Toyama T, et al. Clinical significance of AIB1 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 80: 339-45.
- [13] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. HDAC6 expression is correlated with better

- survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6962-8.
- [14] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. ATBF1-a messenger RNA expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 193-8.
- [15] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. NCOR1 mRNA is an independent prognostic factor for breast cancer. *Cancer Lett.* 2006; 237: 123-9.
- [16] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Yamamoto Y, Kawasoe T, Iwase H. Reduced expression of the breast cancer metastasis suppressor 1 mRNA is correlated with poor progress in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6410-4.
- [17] Ota K, Fujimori H, Ueda M, et al. Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2008; 99: 655-62.
- [18] Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2001; 16: 5-26.
- [19] Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 151: 1312-8.
- [20] Matsubara S, Tomomura M, Kadomatsu K, Muramatsu T. Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 1990; 265: 9441-3.
- [21] Kaname T, Kuwano A, Murano I, Uehara K, Muramatsu T, Kajii T. Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1993; 17: 514-5.
- [22] Murasugi A, Tohma-Aiba Y. Production of native recombinant human midkine in the yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2003; 27: 244-52.
- [23] Mitsiadis TA, Muramatsu T, Muramatsu H, Thesleff I. Midkine (MK), a heparin-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis. *J Cell Biol.* 1995; 129: 267-81.
- [24] Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, Raulais D, Vigny M. HB-GAM/pleiotrophin but not RIHB/midkine enhances chondrogenesis in micromass culture. *Exp Cell Res.* 1998; 241: 171-80.
- [25] Imai S, Kaksonen M, Raulo E, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol.* 1998; 143: 1113-28.

- [26] Vilar J, Lalou C, Duong VH, et al. Midkine is involved in kidney development and in its regulation by retinoids. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 668-76.
- [27] Sakurai H, Bush KT, Nigam SK. Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis. *Development.* 2001; 128: 3283-93.
- [28] Toriyama K, Muramatsu H, Hoshino T, Torii S, Muramatsu T. Evaluation of heparin-binding growth factors in rescuing morphogenesis of heparitinase-treated mouse embryonic lung explants. *Differentiation.* 1997; 61: 161-7.
- [29] Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* 2004; 204: 127-43.
- [30] Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T. Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 1132-44.
- [31] Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res.* 1993; 53: 1281-5.
- [32] Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan QW, Muramatsu H, Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer.* 1997; 75: 354-9.
- [33] Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem.* 2002; 132: 359-71.
- [34] Qi M, Ikematsu S, Maeda N, et al. Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15868-75.
- [35] Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokinines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res.* 1997; 57: 1814-9.
- [36] Stoica GE, Kuo A, Powers C, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.* 2002; 277: 35990-8.
- [37] Aridome K, Tsutsui J, Takao S, et al. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86: 655-61.
- [38] Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res.* 1995; 55: 1792-7.
- [39] Ye C, Qi M, Fan QW, et al. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79: 179-84.
- [40] Tao P, Xu D, Lin S, et al. Abnormal expression, highly efficient detection and novel truncations of midkine in human tumors, cancers and cell lines. *Cancer Lett.* 2007; 253: 60-7.

- [41] Garver RI, Jr., Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 9: 463-6.
- [42] O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.* 1996; 56: 2515-8.
- [43] Moon HS, Park WI, Sung SH, Choi EA, Chung HW, Woo BH. Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2003; 88: 289-97.
- [44] Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Tomoda Y, Muramatsu T. Expression of midkine and pleiotropin in ovarian tumors. *Obstet Gynecol.* 1997; 90: 285-90.
- [45] Garver RI, Jr., Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer.* 1994; 74: 1584-90.
- [46] Miyashiro I, Kaname T, Shin E, et al. Midkine expression in human breast cancers: expression of truncated form. *Breast Cancer Res Treat.* 1997; 43: 1-6.
- [47] Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett.* 1997; 233: 29-32.
- [48] Maeda S, Shinchu H, Kurahara H, et al. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer.* 2007; 97: 405-11.
- [49] Yin Z, Luo X, Kang X, Wu Z, Qian H, Wu M. [Correlation between midkine protein overexpression and intrahepatic metastasis in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002; 24: 27-9.
- [50] Qi M, Ikematsu S, Ichihara-Tanaka K, Sakuma S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine. *J Biochem.* 2000; 127: 269-77.
- [51] Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, et al. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer.* 2003; 88: 1522-6.
- [52] Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, et al. Increased serum midkine concentration as a possible tumor marker in patients with superficial esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2003; 10: 411-4.
- [53] Kato M, Shinozawa T, Kato S, Awaya A, Terada T. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124: 848-52.
- [54] Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, Yagyu K, Muramatsu T, Kumai H. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci.* 2005; 96: 54-6.
- [55] Nakayama KI, Nakayama K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases.

- Semin Cell Dev Biol. 2005; 16: 323-33.
- [56] Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 83-93.
- [57] Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 369-81.
- [58] Foster JS, Fernando RI, Ishida N, Nakayama KI, Wimalasena J. Estrogens down-regulate p27Kip1 in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem*. 2003; 278: 41355-66.
- [59] Radke S, Pirkmaier A, Germain D. Differential expression of the F-box proteins Skp2 and Skp2B in breast cancer. *Oncogene*. 2005; 24: 3448-58.
- [60] Zheng WQ, Zheng JM, Ma R, Meng FF, Ni CR. Relationship between levels of Skp2 and P27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy. *Steroids*. 2005; 70: 770-4.
- [61] Sonoda H, Inoue H, Ogawa K, Utsunomiya T, Masuda TA, Mori M. Significance of skp2 expression in primary breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 1215-20.
- [62] Traub F, Mengel M, Luck HJ, Kreipe HH, von Wasielewski R. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 99: 185-91.
- [63] Davidovich S, Ben-Izhak O, Shapira M, Futerman B, Hershko DD. Over-expression of Skp2 is associated with resistance to preoperative doxorubicin-based chemotherapy in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008; 10: R63.
- [64] Hershko DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer*. 2008; 112: 1415-24.
- [65] Ravaioli A, Monti F, Regan MM, et al. p27 and Skp2 immunoreactivity and its clinical significance with endocrine and chemo-endocrine treatments in node-negative early breast cancer. *Ann Oncol*. 2008; 19: 660-8.
- [66] Voduc D, Nielsen TO, Cheang MC, Foulkes WD. The combination of high cyclin E and Skp2 expression in breast cancer is associated with a poor prognosis and the basal phenotype. *Hum Pathol*. 2008; 39: 1431-7.
- [67] Onoyama I, Nakayama KI. Fbxw7 in cell cycle exit and stem cell maintenance: insight from gene-targeted mice. *Cell Cycle*. 2008; 7: 3307-13.
- [68] Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*. 2001; 413: 316-22.
- [69] Ekholm-Reed S, Spruck CH, Sangfelt O, et al. Mutation of hCDC4 leads to cell cycle deregulation of cyclin E in cancer. *Cancer Res*. 2004; 64: 795-800.

- [70] Spruck CH, Strohmaier H, Sangfelt O, et al. hCDC4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 4535-9.
- [71] Tsunematsu R, Nakayama K, Oike Y, et al. Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. *J Biol Chem.* 2004; 279: 9417-23.
- [72] Onoyama I, Tsunematsu R, Matsumoto A, et al. Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204: 2875-88.
- [73] Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 9006-12.
- [74] Byrd KN, Huey B, Roydasgupta R, Fridlyand J, Snijders AM, Albertson DG. FBXW7 and DNA copy number instability. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 109: 47-54.
- [75] Hagedorn M, Delugin M, Abrales I, et al. FBXW7/hCDC4 controls glioma cell proliferation in vitro and is a prognostic marker for survival in glioblastoma patients. *Cell Div.* 2007; 2: 9.
- [76] Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, et al. p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res.* 2009; 69: 3788-94.
- [77] Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, et al. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int J Cancer.* 2010; 126: 1828-37.
- [78] Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, et al. Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers.* 2007; 12: 403-13.
- [79] Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Imai T, Takagi H. Serum and immunohistochemical studies of NCC-ST-439 in breast cancer. *J Surg Oncol.* 1993; 54: 5-8.
- [80] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991; 19: 403-10.
- [81] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 10869-74.
- [82] Yu JC, Ding SL, Chang CH, et al. Genetic susceptibility to the development and progression of breast cancer associated with polymorphism of cell cycle and ubiquitin ligase genes. *Carcinogenesis.* 2009; 30: 1562-70.
- [83] Mao JH, Perez-Losada J, Wu D, et al. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature.* 2004; 432: 775-9.
- [84] Gu Z, Inomata K, Mitsui H, Horii A. Promoter hypermethylation is not the major

- mechanism for inactivation of the FBXW7 beta-form in human gliomas. *Genes Genet Syst.* 2008; 83: 347-52.
- [85] Xu Y, Sengupta T, Kukreja L, Minella AC. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *J Biol Chem.* 285: 34439-46.
- [86] Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene.* 1993; 8: 2127-33.
- [87] McNeil CM, Sergio CM, Anderson LR, et al. c-Myc overexpression and endocrine resistance in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102: 147-55.
- [88] Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer.* 2000; 83: 1688-95.
- [89] Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Wassmann K. C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003; 5: R30-6.
- [90] Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 8534-40.
- [91] Scorilas A, Yotis J, Pateras C, Trangas T, Talieri M. Predictive value of c-erbB-2 and cathepsin-D for Greek breast cancer patients using univariate and multivariate analysis. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 815-21.
- [92] Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. *Int J Cancer.* 1999; 84: 562-7.
- [93] Bland KI, Konstadoulakis MM, Veziridis MP, Wanebo HJ. Oncogene protein co-expression. Value of Ha-ras, c-myc, c-fos, and p53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Ann Surg.* 1995; 221: 706-18; discussion 18-20.
- [94] Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 2468-75.
- [95] Efstratiadis A, Szabolcs M, Klinakis A. Notch, Myc and breast cancer. *Cell Cycle.* 2007; 6: 418-29.
- [96] Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1566-75.
- [97] Wang L, Shao ZM. Cyclin e expression and prognosis in breast cancer patients: a meta-analysis of published studies. *Cancer Invest.* 2006; 24: 581-7.

