

乳癌でのイソクエン酸脱水素酵素（IDH）アイソフォームの免疫局在：

IDH2 は増殖に関係し予後不良因子となる

東北大学大学院医学系研究科保健学専攻
臨床検査医科学領域 病理検査学分野
B8MD4001 峯村 洋行

目次

1. 要旨
2. 背景
3. 目的
4. 材料および方法
 - 4-1. 患者検体
 - 4-2. 免疫組織化学
 - 4-3. 免疫染色の評価方法
 - 4-4. 培養細胞
 - 4-5. 細胞株への siRNA 導入
 - 4-6. リアルタイム PCR
 - 4-7. ウェスタンブロッティング
 - 4-8. 細胞増殖試験
 - 4-9. 統計解析
5. 結果
 - 5-1. IDH アイソフォームの乳癌における免疫局在
 - 5-2. IDH アイソフォームの発現状態と乳癌患者の予後との関係
 - 5-3. ER 発現状態毎の IDH2 の臨床病理学的特徴
 - 5-4. 乳癌細胞の増殖における IDH2 発現の影響
6. 考察
7. 謝辞
8. 参考文献
9. 図の説明

1. 要旨

イソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase: IDH) はイソクエン酸を酸素的脱炭素反応により α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate: α -KG) に変換する重要な酵素で、3つのアイソフォーム (IDH1、IDH2、IDH3: IDH1-3) が存在することが分かっている。IDH アイソフォームの過剰発現もしくは発現低下は様々なヒト悪性腫瘍で報告されており、癌の進行に関与する IDH の重要性が示唆されている。つい最近、乳癌における IDH1 と IDH2 それぞれの免疫局在について報告がされたが、すべての IDH アイソフォームを同時に調べた報告はなく、乳癌での重要性は解明されていない状態である。したがって、今回の研究ではまず初めに 226 例の浸潤性乳管癌症例に対して IDH1、IDH2、IDH3 α (IDH1-3 α) の免疫染色を行った。免疫染色による IDH1-3 α の発現は乳癌症例の 53%、38%、41%に対してそれぞれ見られ、正常乳腺組織での発現状況は IDH1 陽性、IDH2 陰性、IDH3 α 陽性であった。IDH1 の発現状態は病理学的 T 因子 (pathological T factor : pT)、Ki-67 と逆相関したが、IDH3 α の発現状態はどの病理学的因子とも相関しなかった。一方、IDH2 の発現状態はステージ、pT、組織学的異型度、脈管侵襲、HER2、Ki-67、微小血管密度と正相関した。さらに、IDH2 の発現状態は、乳癌患者の予後不良と有意に相関し、無病生存期間において独立した予後不良因子となった。この関係は、癌における発現が正常の乳腺組織と逆になっている IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性のサブグループで特に顕著であった。続けて行った *in vitro* で

の siRNA で IDH2 を抑制する実験において、IDH2 のノックダウンにより乳癌細胞株である T47D と SKBR-3 の増殖能が低下することが明らかになった。これらの結果から、IDH1 や IDH3 ではなく、IDH2 が最も乳癌の進行する性質に関与し、乳癌における予後因子となる可能性が示唆された。乳癌における IDH2 の役割をより詳細に調べていくことで、乳癌進行と代謝経路の関係究明や IDH2 を標的とする治療法の開発につながることを期待される。

2. 背景

乳癌は世界でも女性の悪性腫瘍の中で最も頻度の高い悪性腫瘍である。浸潤性乳癌は一般的に全身性疾患と考えられており¹⁾、乳癌患者の臨床的予後は転移だけでなく、増殖能によっても著しく影響を受ける²⁾。エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) 陽性乳癌に対して内分泌療法を行ってから 5 年時点での再発率は約 10%と見積もられており³⁾、術後化学療法を受けた 25%の乳癌患者が再発するといわれている⁴⁾。したがって、乳癌の再発や転移などの増悪の仕組みを調べることは患者の臨床的予後を向上させるためにとても重要である。

乳癌のような疾患が発現するには DNA、RNA、タンパク質、代謝産物の各階層からなる複雑なネットワークが全体として機能を果たす必要がある (図 1A)。この一連のネットワークを解明するために個々の階層毎の網羅解析が行われている。私は以前、乳癌の遠隔転移を引き起こす因子を探すために、遠隔転移群であるステージIVとそれ以外のステージ I-IIIの乳癌との間の microRNA の発現差に着目してマイクロアレイを行い、miR-1 の高発現が乳癌の独立した予後不良因子となり、乳癌の悪性表現型と関わっているということを新たに発見し報告した⁵⁾。また、mRNA の発現に着目したマイクロアレイによって、乳癌再発症例では CITED2 (Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2) が高発現となっていることを発見して、予後や薬剤耐性に関与することを報告した⁶⁾。しかしながら、遺伝子

の発現異常があっても機能変化を最小にとどめるために補うような生体機能が働くため、単独の因子に対する研究では、疾患メカニズムに対する究明は限られる⁷⁾。

一方、メタボローム解析で得られた代謝産物の状態は疾患の最終表現型に近いことが考えられる。乳癌においても細胞増殖や進展していく上で、エネルギー産生及び中間体の生合成のためにワーブルグ効果などによる代謝経路の変化が重要な役割を担っていると考えられる⁸⁾。乳癌での代謝産物の研究は、早期発見のマーカーや薬剤耐性の指標を見つけるために尿や血液を対象としたものや正常乳腺と乳癌組織の比較、乳癌のサブタイプごとでの解析が広く行われている^{9,10)}。しかしながら、乳癌に特異的な代謝産物という物は一般化されておらず、ステージIVとステージI-IIIでの代謝産物の分布の差に着目した研究もなされていない。今回の研究では当初、メタボローム解析を行って遠隔転移時の代謝経路の状態を反映している代謝産物の分布を明らかにし、その量的変化を引き起こす代謝酵素の発現を病的に追及することを目的としていた。ステージIV (9例) とステージI-III (18例) の乳癌を用いて行ったメタボローム解析の結果を図1Bに示す。得られた結果に対して統計解析をしたところ、ステージIVで有意な変動のある代謝産物を見つけることはできなかつたため、存在量の差が大きかった代謝産物に着目して検討を続けた。ステージIVにおいて増加していた代謝産物にクエン酸 (12.3倍) と2-ヒドロキシグルタル酸が含まれていた (3.0倍)。

クエン酸はトリカルボン酸 (tricarboxylic acid: TCA) 回路の構成成分の一つである。エネルギー産生のほかに、クエン酸はアセチル CoA の供給元となり、脂質合成やコ

レステロール合成にとっても必要である¹¹⁾(図 2A)。

2-ヒドロキシグルタル酸 (2-hydroxyglutarate: 2HG) は α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate: α -KG) から産生されるオンコメタボライトとして知られている。2HG は α -KG と構造が似ており、 α -KG を必要とする α -KG 依存性酵素群に対して競合阻害をすることで酵素活性を妨げる¹²⁾(図 2B)。 α -KG 依存性酵素には DNA やヒストンの脱メチル化酵素が含まれていて、2HG による競合阻害のため、メチル化が亢進し異常な遺伝子発現が生じ腫瘍発生につながる^{13, 14)}。また、mTOR (mechanistic target of rapamycin) 経路の抑制に必要なリジン特異的脱メチル化酵素 4A (Lysine Demethylase 4A: LDM4A) の活性を阻害することで、mTOR 経路が活性化し細胞増殖につながる¹⁵⁾。加えて、低酸素誘導因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α : HIF-1 α) の分解を行っている PHD (HIF-1 α -specific prolyl hydroxylases) も阻害されるため HIF-1 α が安定化し、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現上昇¹⁶⁾ や嫌氣的代謝が促進され、血管新生やワーブルグ効果が生じる。

この 2 つの物質の代謝に関与する酵素として、イソクエン酸脱水素酵素 (Isocitrate dehydrogenase: IDH) が挙げられる。IDH はクエン酸と同じく TCA 回路を構成するために重要であり、エネルギー産生の律速酵素として知られている。加えて、酵素活性部位に変異を持つ IDH は 2HG を産生する代表的な酵素として研究されている。この 2 つの物質の量がステージIVの乳癌で増加していたことから、悪性度の高い乳癌ではそれらの代謝に関与する IDH の発現変動が生じているのではないかと予測した。よ

って、以降乳癌の進展と IDH の関与に着目して研究を進めることにした。

IDH は酸素的脱炭素反応によりイソクエン酸を α -KG に変換する。ヒトでは3つのアイソフォーム (IDH1、 IDH2、 IDH3: IDH1-3) が存在する (図 3A)。3つの IDH のうち、IDH1 と IDH2 は核酸配列と構造が類似しており¹⁷⁾、どちらもホモ 2 量体として働き、NADP+を共役因子として使用してイソクエン酸と α -KG の変換を可逆的に行う¹⁸⁾。IDH1 は細胞質基質とペルオキシソームに存在し、IDH2 と IDH3 はミトコンドリア内に存在する¹⁹⁾ (図 3B)。一方 IDH3 は NAD+に依存したアイソフォームであり、TCA 回路において α -KG を不可逆的に産生する。IDH3 は α 、 β 、 γ サブユニットから構成される $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ のヘテロ 2 量体が、 $\alpha_2\beta\gamma$ ヘテロ 4 量体に組み合わさって形作られている²⁰⁾。

IDH アイソフォームの過剰発現は様々なヒトの悪性腫瘍において報告されており、発癌過程における IDH の重要性が示唆されている¹⁸⁾。神経膠腫¹⁶⁾ や急性白血病²¹⁾ などの腫瘍においては IDH1、IDH2 の機能獲得的な変異が発見されており、変異のある IDH1/2 が α -KG をオンコメタボライトである 2HG に変換することが知られている。一方乳癌においては solid-papillary carcinoma with reverse polarity (SPCRP) という稀な腫瘍で変異が報告されている^{22, 23)} だけであり、その変異の頻度は極めて低いとされている^{24, 25)}。公的データベースである OncoKB によると乳癌での活性化変異の頻度は、IDH1:0.08% (1/1228)、IDH2:0% (0/1262) であった²⁶⁾。COSMIC においては、IDH1:0.001% (5/5027)、IDH2:0.0002% (1/4522) であった²⁷⁾。IDH3 に関しては、IDH3 α

の発現異常が、HIF-1 α を介した代謝経路の変化と血管新生による悪性腫瘍細胞の増殖を促進すると報告されている²⁸⁾。

乳癌における IDH1²⁹⁾ と IDH2³⁰⁾ の免疫局在はつい最近報告された。Aljohani ら³⁰⁾ は IDH2 の発現状態が乳癌特異的生存期間における独立した予後不良因子となることを報告しているが、乳癌における IDH2 の生物学的機能については報告されていない。さらに言えば、IDH3 の乳癌における免疫染色の結果は報告されていない。すべての IDH アイソフォームを同時に調べることで、乳癌での IDH アイソフォームの発現状態や重要性が解明されるのではないかと考えられる。

3. 目的

乳癌における IDH1、IDH2 単独での報告はそれぞれされているが、IDH1-3 の発現状態を同時に調べた検討はされていない。IDH の 3 つのアイソフォームはイソクエン酸を α -KG に変換する共通の機能をもつため、個々の発現変化による影響は他のアイソフォームにより補われる可能性がある。そこで本研究では、すべての IDH アイソフォームを対象にし、乳癌での発現パターンに特徴があるかを調べ、悪性度と関わる IDH を特定してその機能や原因を解明することを目的とした。

まず初めに、悪性度の指標となる病理学的因子や予後との関係を明らかにするために、226 例の浸潤性乳管癌症例に対して IDH1-3 α の免疫染色を行った。続いて、IDH2 に着目し乳癌における生物学的役割を明らかにするために、乳癌培養細胞を用いた *in vitro* での実験を行った。

4. 材料および方法

4-1. 患者検体

対象症例は、東北大学病院で 2005 年から 2008 年に外科的に切除されたステージ I-III の日本人女性の浸潤性乳管癌である。病理組織標本及び臨床病理データが使用可能な症例を連続的に集めて評価した。対象とした 226 例のうち、術前化学療法施行例は 40 例、術後化学療法施行例は 107 例、内分泌療法施行例は 183 例であった。臨床的予後は無病生存期間と乳癌特異的生存期間を用いた。無病生存期間は手術後の観察期間における手術後から最初の再発もしくは遠隔転移の出現までの日数とし、乳癌特異的生存期間は手術後から乳癌が原因で死亡するまでの期間とした。今回の研究での観察期間の中央値は 78 カ月（期間：2-136 カ月）であった。

今回の研究方法は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得て行っている【承認番号 2017-1-149】。

4-2. 免疫染色

今回の実験で新たに染色した項目は IDH1、IDH2、IDH3 α 、CD31 であり、Ki-67、ER、プロゲステロン受容体 (Progesterone Receptor: PR)、HER2 は診断時の染色標本を利用した。マウスモノクローナル抗体である抗 IDH1 (RMAB-3)、IDH2 (RMAB-33) は FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)、CD31 (H-3) は Santa Cruz

Biotechnology (Santa Crus, CA, USA) から購入した。抗 IDH3 α ウサギポリクローナル抗体は abcam (Cambridge, UK) から購入した。

Labeled streptavidin biotinylated antibody 法を採用している Histofine Kit (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を今回の実験では用いた。抗体の濃度は IDH1、IDH2、IDH3 α は 200 倍、CD31 は 400 倍で用いた。抗原賦活はすべてオートクレーブで行い IDH3 α のみ抗原賦活液 pH9.0 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を使用し、残りは pH6.0 に調整した 0.01M クエン酸バッファーを使用した。反応条件は、一次抗体では 4°C でオーバーナイト、2 次抗体は室温 30 分とした。抗原抗体複合体は 3,3'-diaminobenzidine で可視化し、ヘマトキシリンで核染色を行った。

4-3. 免疫染色の評価方法

IDH アイソフォームはすべて癌細胞の細胞質で染色性がみられ、10%以上の癌細胞で染色性がみられた症例³¹⁾を IDH アイソフォーム陽性例とした。ER、PR、Ki-67 は細胞の核と一致して染色陽性像が得られた。免疫染色の評価は、それぞれの症例で 1,000 個以上の癌細胞を数えることで行った。続いて、過去の報告³²⁾に従って染色性の割合 (labeling index: LI) を求め、ER LI、PR LI が 1%を超えた症例を ER 陽性もしくは PR 陽性とした。HER2 発現は HercepTest (score 0-3) (DAKO) に示された評価方法を用いて評価し、10%以上 (score 3) の癌細胞の細胞膜に発現しているものを陽性とした。加えて、中間の評価 (score 2) だったものについては FISH によって調べ、陽性となったものは HER2 発現陽性とした。微小血管密度の評価方法は先行論文³³⁾に従い、CD31 陽性血管数の最も多い場所を高視野倍率 (x400) で観察して評価した。

Ki-67 LI は 20%²⁾、微小血管密度は中央値³⁴⁾ をカットオフ値として 2 群に分けて単変量、多変量解析を行った。

4-4. 培養細胞

ヒト乳癌由来細胞株の T47D (ER 陽性、PR 陽性、HER2 陰性) を JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan)、SKBR-3 (ER 陰性、PR 陰性、HER2 陽性) を American Type Cell Culture (Manassas, VA, USA) からそれぞれ入手した。T47D は RPMI-1640 (Wako, Osaka, Japan)、SKBR-3 は McCoy's 5A (Gibco, Rockville, MD, USA) 中で培養し、培養条件は 37°C、5% CO₂ とした。それぞれの培養液には 10% 牛胎児血清 (Gibco, Rockville, MD, USA) を添加した。siRNA の導入時には Opti-MEM (Wako, Osaka, Japan) を使用した。

4-5. 細胞株への siRNA の導入

2 種類の IDH2 に対する small interfering RNA (siRNA) を今回の実験では使用し、配列は以下の通りであった：siIDH2-1, 5'- CAAGAACUAUGACGGAGAUdTdT -3'; siIDH2-2, 5'- AAACAGUGACAGCCACGUAdTdT -3'。これらの siRNA は Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) から購入した。MISSION siRNA Universal Negative Control (Sigma-Aldrich) を陰性コントロール (siCTL) として用いた。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて導入した。

4-6. リアルタイム PCR

siIDH2 の効率検証用の mRNA を得るために、12 well プレートに 1×10^5 cells/ well で細胞を播種した。翌日、siRNA final 5nM となるように 450uL medium + 50uL transfection mix で培地交換した。Transfection mix の組成は、Opti-MEM 47.625uL、

RNAiMAX 1.875uL、 5uM siRNA 0.5uL を混ぜ、室温で 5 分反応させたものである。

24 時間後、Total RNA を TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) を用いて抽出した。cDNA の合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO CO. LTD., Osaka, Japan) で行い、リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行った。今回の実験で使用した IDH2 と Ribosomal Protein LI13A (RPL13A) のプライマー配列は以下の通りであった :IDH2, 5'-CCCGTATTATCTGGCAGTTCATC-3' (forward), 5'-ATCAGTCTGGTCACGGTTTGG-3' (reverse) ; RPL13A, 5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3' (forward), 5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3' (reverse)。今回の実験では、RPL13A を内部標準遺伝子として用い、IDH2 の mRNA の発現量を補正した。

4-7. ウェスタンブロッティング

siIDH2 の効率検証用のタンパク質を得るために、35mm dish に 3×10^5 cells/ well で細胞を播種した。T47D では siRNA final 10nM、SKBR-3 では siRNA final 20nM とするために、細胞懸濁液と transfection mix を合わせ 1000uL/dish となるように調製した。Transfection mix の組成は T47D では、Opti-MEM 92.25uL + RNAiMAX 3.75uL + 5uM siRNA 2uL/ dish であり、SKBR-3 では Opti-MEM 90.25uL + RNAiMAX 3.75uL + 5uM siRNA 4uL/ dish を混合したものである。翌日、PBS で洗浄後、0.5% FBS 添加 RPMI-1640 に培地交換、72 時間後にタンパク質抽出を行った。

SDS-PAGE は先行研究の方法に従って行った³⁵⁾。分離したタンパク質は、続けて Hybond PVDF membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写し、一次抗体として IDH2 抗体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を反応させ、同様に β -

actin 抗体 (Sigma-Aldrich) を泳動コントロールとして反応させた。免疫複合体は ECL-prime Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を使用して検出し、LAS-4000 image analyzer (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan) を用いて画像化した。

4-8. 細胞増殖試験

96well プレートに 7500 cells/ well になるように細胞を播種した。T47D では siRNA final 10nM、SKBR-3 では siRNA final 20nM とするために、細胞懸濁液と transfection mix を合わせ 100uL/ well となるように調製した。Transfection mix の組成は T47D では、Opti-MEM 9.5uL + RNAiMAX 0.3uL + 5uM siRNA 0.2uL / well であり、SKBR-3 では Opti-MEM 9.3uL + RNAiMAX 0.3uL + 5uM siRNA 0.4uL / well を混合したものである。siIDH2 導入後 0 日から 4 日目までの細胞の増殖能を、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を使用した WST8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 法で評価した。

4-9. 統計解析

免疫染色による IDH アイソフォーム発現状態と病理学的因子との関係性を評価するために、t 検定、もしくはカイ二乗検定を用いた。無病生存期間、乳癌特異的生存期間の生存期間分析には Kaplan-Meier 法を用い、ログランク検定によって P 値を求めた。単変量、多変量解析は比例ハザードモデル (Cox) を用いて行った。今回の研

究では $P < 0.05$ を有意差ありとした。*In vitro* での実験では、データは平均値±標準偏差 ($n = 4$) で示し、結果は他の独立した実験で確認した。統計解析は StatView 5.0J software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用して行い、t 検定とフィッシャーの PLSD 検定を用いた。

5. 結果

5-1. IDH アイソフォームの乳癌における免疫局在

私はまず、乳癌における IDH アイソフォームの免疫染色を行い、局在を確かめた。図 4 に示すように、IDH1 (図 4A)、IDH2 (図 4B)、IDH3 を構成するサブユニットの一つである IDH3 α (図 4C) は乳癌細胞の細胞質に発現が認められた。一方、正常乳腺組織の上皮において、IDH1 は陽性 (図 4D)、IDH2 は陰性 (図 4E)、IDH3 α は陽性 (図 4F) であった。

IDH1 の免疫染色による発現状態と様々な病理学的因子との関係を表 1 にまとめた。IDH1 陽性例の数は 226 例中 120 例 (53%) であった。IDH1 の発現状態は IDH2 発現状態、IDH3 α 発現状態と有意に相関し、一方 pT や Ki-67 と逆相関した。

IDH2 の陽性例の数は 226 例中 86 例 (38%) であった (表 2)。IDH2 の発現状態はステージ、pT、組織学的異型度、脈管侵襲、HER2 発現状態、Ki-67、血管密度そして IDH3 α 発現状態と有意に相関した。一方、ER、PR とは逆相関を示した。

IDH3 α の陽性例の数は 226 例中 92 例 (41%) であったが、IDH3 α の発現状態と有意な関係を見せた病理学的因子は存在しなかった (表 3)。

5-2. IDH アイソフォームの発現状態と乳癌患者の予後との関係

図 5A に示す通り、226 例の乳癌患者を解析したところ、IDH1 の発現陽性群では再

発頻度が低い傾向 ($P=0.082$ 、ログランク検定) がみられたが、有意な差までには至らなかった。IDH1 の発現状態と乳癌特異的生存期間の間には有意な関係は見られなかった (図 5B)。一方、IDH2 の発現状態は無病生存期間との有意な相関が見られ ($P < 0,0001$; 図 5C)、IDH2 陽性群では無病生存期間が短縮されていた。有意な関係は IDH2 の発現状態と乳癌特異的生存期間の間にも見られた ($P=0.015$; 図 5D)。

免疫染色による正常上皮での IDH アイソフォームの発現状態の特徴は、IDH1 陽性/IDH2 陰性/IDH3 α 陽性であったため、乳癌において IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性を示した症例は正常上皮と IDH 表現型の陰性/陽性が逆であると考えられる。さらなる解析として、IDH2 陽性例を IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性サブグループとその他の IDH2 陽性サブグループに細分化して行った。IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性サブグループは、ほかの IDH2 陽性サブグループや IDH2 陰性グループと比較した場合に、より悪い無病生存期間 (図 5E) と乳癌特異的生存期間 (図 5F) を示した (各々、 $P < 0.0001$)。IDH 表現型グループ毎の臨床病理的な特徴は表 4 にまとめた。この表により、その他の IDH2 陽性サブグループや IDH2 陰性グループと比較して IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性サブグループはより悪性の性質を持っていることが確かめられた。

IDH2 の発現状態は術後化学療法施行例に症例を限って解析した場合でも無病生存期間と有意に相関 ($P = 0.0092$; 図 5G) するが、術後化学療法未施行例では有意差まで至らない ($P=0.08$; 図 5H) ということも明らかになった。

IDH3 α の発現状態と無病生存期間 (図 5I) や乳癌特異的生存期間 (図 5J) との間には有意な関係は見られなかった。

無病生存期間の単変量解析 (表 5) により、pT、IDH2 発現状態、Ki-67、リンパ節転移が再発予測因子となった。続けて行った多変量解析により、pT ($P=0.0096$)、IDH2 発現状態 ($P=0.014$)、Ki-67 ($P=0.027$) が独立した予後不良因子となった。乳癌特異的生存期間の場合、単変量解析 (表 6) では pT、Ki-67、リンパ節転移、IDH2 発現状態、組織学的異型度、がそれぞれ予測因子となったが、続けて行った多変量解析では独立した予後不良因子となったものは存在しなかった。

5-3. ER 発現状態毎の IDH2 の臨床病理学的特徴

これらの免疫染色の結果から、IDH アイソフォームの中で IDH2 が最も悪性表現型と関係することが示された。したがって、私は乳癌患者を ER 発現陽性と陰性に分け、ER 発現状態毎に IDH2 の臨床病理学的特徴について検討した。表 7 に示すように IDH2 発現状態は、ER 陽性患者において pT、脈管侵襲、HER2 発現状態、Ki-67、微小血管密度との有意な関係がみられたが、ER 陰性患者においてはどの因子とも有意な関係を示さなかった。

IDH2 発現状態は ER 陽性患者において、有意に高い再発率 ($P < 0.001$; 図 6A) と乳癌死 ($P = 0.009$; 図 6B) に関係していたが、ER 陰性患者においてはどちらにも有意な関係は見られなかった (図 6C, 図 6D)。ER 陽性患者において、無病生存期間 (表

8) と乳癌特異的生存期間 (表 9) の単変量・多変量解析をおこなったところ、その両方において、IDH2 のみが独立した予後不良因子となった。

5-4. 乳癌細胞の増殖における IDH2 発現の影響

今回の研究では、IDH2 の免疫染色性が Ki-67 と相関し、乳癌患者の予後不良因子となった。しかしながら IDH2 の乳癌細胞における生物学的役割についてはまだ検討されていない。したがって、IDH2 に対する siRNA の導入を乳癌培養細胞である T47D と SKBR-3 に対して行った。T47D と SKBR-3 に対して IDH2 特異的な 2 つの siRNA (siIDH2-1, siIDH2-2) を導入したところ、コントロール siRNA (siCTL) の導入と比較して、導入後 4 日において IDH2 の mRNA レベルは 0.1–0.18 倍に減少した (図 7A 上、図 7B 上)。IDH2 タンパク質レベルの減少もウェスタンブロッティングにより確認した (図 7A 下、図 7B 下)。

T47D における IDH2 発現抑制による細胞増殖への影響を図 7C にまとめた。細胞増殖能は siIDH2-1, siIDH2-2 の導入後、siCTL を導入したコントロールと比較して、1-4 日で有意に減少 ($P < 0.0001$) した。同様に SKBR-3 の増殖能も siIDH2-1, siIDH2-2 の導入と siCTL の導入を比較して、導入後 2-4 日目において有意に減少 ($P < 0.001$ 図 7D) していた。

6. 考察

これまでの報告では IDH アイソフォームの発現意義は癌種ごとに異なり、統一された見解がない状態であった。例えば、IDH1 の過剰発現は肺癌³⁶⁾ や神経膠芽腫³⁷⁾、膵臓癌³⁸⁾ で見られ、これらの癌では IDH1 は癌促進的な役割が示されていた。しかしながら、早期の皮膚腫瘍形成³⁹⁾ では IDH1 の発現が減少していることが示されていた。一方、IDH2 の過剰発現は卵巣癌⁴⁰⁾、食道癌⁴¹⁾、肺癌⁴²⁾ でみられるが、しかしながら、悪性黒色腫⁴³⁾ や肝臓癌⁴⁴⁾、胃癌⁴⁵⁾ では発現が減少していることが報告されている。これは IDH アイソフォームの役割が、イソクエン酸を α -KG に変換するという単純なものだけでないことが原因であると考えられる。今回の研究では、まず乳癌における IDH の 3 つのアイソフォームすべてに対する免疫染色を行った。正常乳腺組織では、細胞質において IDH1 と IDH3 α の発現が陽性で IDH2 は陰性であった。一方、癌細胞では IDH1-3 α が細胞質に発現していることが確認された。IDH1 は細胞質基質やペルオキシソームに局在し、IDH2 はミトコンドリアに局在することが知られているが、IDH1/2 は既報でも細胞質が染色陽性部位となっており^{29,30)}、本研究での免疫染色の結果もこれに矛盾しないものとする。ミトコンドリアに局在する IDH3 α に関しても、IDH3 α を乳癌で染色した報告はないものの、神経膠芽腫の細胞質で陽性となる報告⁴⁶⁾があるため、問題ない染色結果と考える。正常乳腺組織で陰性であった IDH2 が癌では陽性となったことから、IDH2 には癌の進行において必要となるエネルギー

ギーや中間生成物の供給源となる代謝経路を乳癌にとって最適化するための特別な役割があるのではないかと考えられる。

今回の研究では、IDH2 の発現状態は Ki-67 と有意に相関し、*in vitro* の実験における siRNA による IDH2 の発現抑制によって T47D と SKBR-3 の細胞増殖能が有意に減少することを示した。癌細胞が増殖するためには脂質を合成する必要⁴⁷⁾があるが、低酸素状態や電子伝達系の損傷により TCA 回路の利用が低下している⁴⁸⁾ため、材料となるアセチル CoA の供給も減少する。そのような状況ではグルタミン代謝が亢進して α -KG が供給され⁴⁹⁾、IDH2 がカルボキシル化によって α -KG をイソクエン酸に変換することでアセチル CoA の供給につながる経路が知られている^{50, 51)} (図 8A)。

以前、Ward ら⁵²⁾も siRNA による IDH2 の発現抑制により野生型 IDH2 をもつ神経膠芽腫培養細胞の増殖能が減少したことを報告し、IDH2 による α -KG からイソクエン酸への変換経路が原因としている。今回の研究における増殖と関係するという結果から、乳癌においても IDH2 が細胞増殖のための中間生成物の供給に関与するということが考えられる。

T47D と SKBR-3 の IDH アイソフォームの発現比を The Human Protein Atlas⁵³⁾から求めたところ次のようであった、T47D; IDH1:5.6, IDH2:51.9, IDH3:12.5、SKBR-3; IDH1:14.7, IDH2:64.4, IDH3:31.4。IDH アイソフォームの中で IDH2 の働きが最も重要であることを言うためには、siRNA により IDH1 と IDH3 α の発現も変動させて比較検討する必要がある。siIDH2 を用いた IDH2 の発現抑制により、他の IIDH の発現に

変化がみられるかを観察することで、IDH アイソフォームが相互に補い合うような働きをするかを解明できると考える。加えてホルモン感受性で考えると、T47D は ER 陽性、PR 陽性、HER2 陰性であるが、SKBR-3 は ER 陰性、PR 陰性、HER2 陽性と異なる。免疫染色では ER 陽性群においてのみ IDH2 の発現が予後不良となる結果であったが、培養細胞では siIDH2 によりどちらも増殖抑制される結果であった。これは、エストロゲン添加条件での実験を行っていないために、細胞のホルモン感受性が結果に反映されていないことが原因と考えられる。加えて実際の腫瘍は間質と物質のやり取りをしており、培養細胞単独では ER 陰性癌の細胞環境を再現できておらず、免疫染色の結果とは異なった可能性が考えられる。*In vitro* での結果をまとめると、今回の検討では siIDH2 により増殖能が減少することは分かったが、様々な要因が反映されている免疫染色の結果を説明するのは実験が足りていないため、IDH2 の機能を推測するにとどまった。詳細な機能検証をするためには脂質合成やエネルギー産生への影響の直接評価や動物を用いたより生体環境に近づけた実験が必要である。

今回の研究では、IDH2 の発現状態は乳癌の予後不良と有意に関係した。226 症例の乳癌特異的生存期間における多変量解析では独立した予後因子が同定されなかったが（表 6）、これは乳癌死が 14 例と少数であったことが一因と考えられる。IDH2 の予後不良因子としての性格は、ER 陰性患者と比較して ER 陽性患者においてより明白であり、IDH2 は ER 陽性患者の無病生存期間と乳癌特異的生存期間の両方において独立した予後不良因子となった。ごく最近、Aljohani ら³⁰⁾ は IDH2 の発現状態は乳

癌の短い無病生存期間と有意に関係すると報告しており、これは私の今回の研究と一致した。以前に、Torrens-Mas ら⁵⁴⁾ は脱アセチル化酵素である Sirtuin 3 (Sirt3) による IDH2 の制御について報告している。それによると、Sirt3 の発現を低下させることにより、IDH2 のアセチル化が亢進して 2 量体を形成できなくなり IDH2 が不活化する。その結果、細胞内で生じた reactive oxygen species (ROS) が除去できなくなるため蓄積し、乳癌培養細胞株における生存力低下や、シスプラチンやタモキシフェンによる細胞毒性が強くなると報告している。化学療法や内分泌療法への耐性にも関与する理由としては、IDH2 には上述した細胞増殖のための機能に加え、ROS を減少させ細胞を酸化ストレスから保護するための NADPH を供給する役割⁵⁵⁾ があることが挙げられる (図 8B)。IDH2 の発現状態は術後化学療法施行例に症例を限って解析した場合でも無病生存期間と有意に相関することが私の研究からも分かった。IDH2 陽性乳癌細胞の残存は、術後治療にかかわらず早期の再発を引き起こすことが考えられる。IDH2 陽性乳癌患者の予後が悪い理由解明するためにも、術後療法耐性メカニズムとの関与などに対するより一層の研究が求められる。

免疫染色の結果から、IDH2 の発現状態は微小血管密度とも有意に関係することが示された。Kim ら⁵⁶⁾ は IDH2 欠損マウスに悪性黒色腫細胞を移植した場合、野生型 IDH2 を持つマウスに移植した場合と比較して、HIF-1 α と VEGF の発現が低下し、腫瘍形成が激しく減少することを示している。Li ら⁴²⁾ は IDH2 の肺癌における過剰発現により α -KG が減少し、HIF-1 α の発現とワーブルグ効果が誘導され、その結果とし

て細胞増殖につながると報告している。HIF-1 α は正常環境では常に α -KG 依存性酵素の一つである PHD により分解されているため、非常に不安定な状態にある (図 8C 上段)。低酸素状態では IDH2 が α -KG からイソクエン酸の変換を行う^{57,58)} ことが報告されており、その時に IDH2 が 2HG も産生することを実験により示している^{48,50,58)}。活性化変異を伴わず IDH2 が 2HG を産生する仕組みについて既報では具体的に述べられていないが、IDH2 と高悪性度が関係することを説明する上で興味深い経路と考える。低酸素の状況では、酵素活性に α -KG を必要とする PHD は、イソクエン酸への変換に消費されて α -KG が減少した影響と、産生された 2HG による活性阻害を受けて機能不全となり、HIF-1 α の分解が起こらなくなる。その結果として、HIF-1 α は VEGF のような遺伝子発現を促進して血管新生が誘導される (図 8C 下段)。IDH2 の発現状態が微小血管密度とも有意な関係を見せた理由としては、IDH2 による α -KG の消費、もしくは 2HG 産生の結果としての血管新生が促進される機序が働いたのではないかと考える。

今回の研究は乳癌において IDH3 α の免疫染色を行った初めての報告である。Zeng ら²⁸⁾ は以前に、IDH3 α の mRNA 発現量が肺癌と乳癌患者において予後不良と関係することを報告しているが、IDH3 α の癌における情報はとても少ない。私の今回の結果では、IDH3 α の発現状態と乳癌の病理学的因子や予後との間に有意な関係は見られず、IDH3 の癌における機能について限定的に示すにとどまった。IDH3 は $\alpha_2\beta\gamma$ ヘテロ 4 量体として機能しているため、乳癌における機能を更に詳細に追求するためには、

IDH3 β 、IDH3 γ に対する免疫染色も行う必要があるかもしれない。

今回の研究から、IDH2 の発現は乳癌の悪性表現型と関与していることが示され、IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性の表現型を持つサブグループではより明白であった。このサブグループは、正常の乳腺組織の免疫染色的 IDH アイソフォームの表現型である IDH1 陽性/IDH2 陰性/IDH3 α 陽性と陰性/陽性が反対であり、もっとも正常からバランスの崩れた免疫染色的 IDH アイソフォームの表現型である。IDH アイソフォームのバランスに関しては、Koseki ら⁶⁰⁾ が大腸癌において IDH1/2 のバランスの乱れた発現 (IDH1:low/IDH2:high, もしくは IDH1:high/IDH2:low) はバランスの取れた発現と比較して予後不良と関係することを報告している。正常組織において IDH1 は細胞質でのイソクエン酸と α -KG の変換を行い、核酸合成、脂質合成⁶¹⁾ やコレステロール合成⁵¹⁾ のために NADPH を供給し、細胞質の活性酸素の除去も行っている⁵⁵⁾。ミトコンドリア内において TCA 回路で必要となるイソクエン酸から α -KG への変換は主に IDH3 が行っている⁶²⁾ ため IDH2 には TCA 回路以外での役割が考えられている⁵²⁾。⁶³⁾ IDH1-3 の癌における協調した働きについてはほとんど分かっていないが、IDH1-3 の発現の変化は代謝適応と結びつく可能性があり、IDH2 単独の発現は、乳癌にとって最も適した代謝環境を作っていることが考えられる。今回の結果では IDH2 の過剰発現が癌促進的な役割を持っていることが示唆されており、IDH2 が乳癌における治療標的になる可能性がある。IDH の発現が制御される機序について詳しく述べている報告は少なく⁶⁴⁾、どのような経路により正常組織と癌組織で IDH アイソフォームの

発現パターンの変化が引き起こされるかはわかっていない。IDH を治療標的にする場合、その発現経路ではなく、酵素活性に必要な部位を標的とするもののほうが望ましいと考える。

IDH2 を標的とした治療薬としては、Enasidenib (AG-221) という変異を有する IDH2 に対する阻害薬が開発されており、再発または治療抵抗性の急性骨髄性白血病患者の完全寛解につながることから、2017年に米国食品医薬品局 (FDA) によって承認されている⁶⁵⁾。しかしその後行われた試験では従来の治療と比較して Enasidenib によって急性骨髄性白血病患者の全生存期間を延長することができなかったという報告が2020年にされている⁶⁶⁾。Enasidenib は変異のある IDH2 のみを特異的に阻害するため、変異のほとんどない乳癌に適用することは難しいと考えられる。変異のない IDH2 に対する阻害剤としては AGI6780 という物質がマンツル細胞リンパ腫や多発性骨髄腫の細胞で検討されており、プロテアソーム阻害剤と併用することで効果を高めると報告されている⁶⁷⁾。乳癌における変異のない IDH2 に対する阻害剤の検討はまだ報告されていないが、IDH2 は癌促進的な役割があると考えられるので、阻害剤開発により乳癌の進行を改善することが期待される。

今回の研究で得られた結果をまとめると、IDH1-3 α の乳癌における陽性率はそれぞれ 53%、38%、41%であった。これらのアイソフォームの中で、IDH2 の発現状態は、有意にステージ、pT、組織学的異型度、脈管侵襲、Ki-67、微小血管密度と正相関した。さらに、IDH2 の発現状態は、乳癌患者の予後不良と有意に関係し、無病生存期間に

において独立した予後不良因子となった。続けて行った *in vitro* の実験により、IDH2 の発現抑制は T47D と SKBR-3 の増殖能を減少させた。これらの結果から、IDH1 や IDH3 ではなく、IDH2 が最も乳癌の進行する性質に関与し、乳癌における予後因子となる可能性が示唆された。IDH2 が乳癌の悪性性質に関与する理由として、細胞増殖のための中産物の供給、血管新生、ROS の除去と関与していることが考察された。しかし IDH2 の機能解析については非常に限定的であったため、IDH2 の役割をより詳細に調べるために、IDH1 と IDH3 を含めた *in vitro* での検討が必要とされる。乳癌進行や代謝経路と IDH2 の関係究明を行うことで、IDH2 を標的とする治療法の開発につながることを期待される。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました医学系研究科保健学専攻病理検査学分野鈴木貴教授、医学系研究科医科学専攻病理診断学分野笹野公伸教授に厚くお礼を申し上げます。また、研究における多くの場面で多大なるご協力を頂きました病理検査学分野高木清司講師、佐藤和さん、災害産婦人科学分野三木康宏講師にこの場をお借りして感謝の意を表します。

8. 参考文献

1. Fisher B, Anderson S. The breast cancer alternative hypothesis: is there evidence to justify replacing it? *J Clin Oncol* 2010;28:366-374. doi: 10.1200/JCO.2009.26.8292.
2. Muftah A, Aleskandarany M, Al-Kaabi M, et al. Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections. *Breast Cancer Res Treat* 2017;164:341-348. doi: 10.1007/s10549-017-4270-0.
3. Djalalov S, Beca J, Amir E, et al. Economic evaluation of hormonal therapies for postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer in Canada. *Curr Oncol* 2015;22:84-96. doi: 10.3747/co.22.2120.
4. Tevaarwerk A, Gray R, Schneider B, et al. Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer* 2013;119:1140-1148. doi: 10.1002/cncr.27819.
5. Hiroyuki M, Kiyoshi T, Yasuhiro M, et al. Abnormal expression of miR-1 in breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci* 2015;106:1642-1650. doi: 10.1111/cas.12808.
6. Hiroyuki M, Kiyoshi T, Ai S, et al. CITED2 in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with proliferation and chemoresistance. *Cancer Sci* 2016;107:1898-1908. doi: 10.1111/cas.13081.

7. Yan V, Yi-Juan H. Chapter Three - Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Adv Genet* 2016;93:147-190. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.004.
8. Sato A, Takagi K, Miki Y, et al. Cytochrome c1 as a favorable prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Histol Histopathol* 2019;34:1365-1375. doi: 10.14670/HH-18-130.
9. Catarina S, Rosa P, Pedro S, et al. Breast Cancer Metabolomics: From Analytical Platforms to Multivariate Data Analysis. A Review. *Metabolites* 2019;9:102. doi: 10.3390/metabo9050102.
10. Rashed R, Darwish H, Omran M, et al. A novel serum metabolome score for breast cancer diagnosis. *Br J Biomed Sci* 2020;77:196-201. doi: 10.1080/09674845.2020.1784568.
11. Jiawei Y, Tiffany H. Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends Cell Biol* 2020;30:979-989. doi:10.1016/j.tcb.2020.09.006.
12. Cara R, Lukas S, Andreas K. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. *Contemp Oncol (Pozn)* 2018;22:215-222. doi: 10.5114/wo.2018.82642.
13. Tiffany R, Bryan D, Darell D, et al. Isocitrate dehydrogenase 1: what it means to the neurosurgeon. *J Neurosurg* 2013;118:1176-1180. doi: 10.3171/2013.3.JNS122282.
14. Wei X, Hui Y, Ying L, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19:17-30. doi:

- 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
15. Mélissa C, Laurence M, Marie-Eve L, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. *Nat Commun* 2016;7:12700. doi: 10.1038/ncomms12700.
 16. Huang J, Yu J, Tu L, et al. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Front Oncol* 2019;9:506. doi: 10.3389/fonc.2019.00506.
 17. Matthew S, Bill H, Hai Y. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol* 2016;18:16-26. doi: 10.1093/neuonc/nov136.
 18. Bergaggio E, Piva R. Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2019;11:563. doi: 10.3390/cancers11040563.
 19. Geisbrecht B, Gould S. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999;274:30527-30533. doi: 10.1074/jbc.274.43.30527.
 20. Ma T, Peng Y, Huang W, et al. The β and γ subunits play distinct functional roles in the $\alpha_2\beta\gamma$ heterotetramer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Sci Rep* 2017;7:41882. doi: 10.1038/srep41882.

21. Maria E, Abdel-Wahab O, Chao L, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* 2010;18:553-567. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
22. Sarah C, Britta W, Huei-Chi W, et al. IDH2 Mutations Define a Unique Subtype of Breast Cancer with Altered Nuclear Polarity. *Cancer Res* 2016;76:7118-7129. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0298.
23. Nadjla A, Gaëtan M, Caroline T, et al. Solid papillary carcinoma with reverse polarity of the breast harbors specific morphologic, immunohistochemical and molecular profile in comparison with other benign or malignant papillary lesions of the breast: a comparative study of 9 additional cases. *Mod Pathol* 2018;31:1367-1380. doi: 10.1038/s41379-018-0047-1.
24. Bleeker F, Lamba S, Leenstra S, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 2009;30:7-11. doi: 10.1002/humu.20937.
25. Raynaud S, Carbuccia N, Colin C, et al. Absence of R140Q mutation of isocitrate dehydrogenase 2 in gliomas and breast cancers. *Oncol Lett* 2010;1:883-884. doi: 10.3892/ol_00000156.
26. Ahmet Z, Ryma B, Ronak H, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23:703-713. doi:

- 10.1038/nm.4333.
27. COSMIC. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. (2021年1月4日参照)
 28. Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, et al. Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene* 2015;34:4758-4766. doi: 10.1038/onc.2014.411.
 29. Liu W, Chan S, Chang H, et al. Isocitrate dehydrogenase 1-snail axis dysfunction significantly correlates with breast cancer prognosis and regulates cell invasion ability. *Breast Cancer Res.* 2018;20:25. doi: 10.1186/s13058-018-0953-7.
 30. Aljohani A, Toss M, Kurozumi S, et al. The prognostic significance of wild-type isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2020;179:79-90. doi: 10.1007/s10549-019-05459-7.
 31. Mayama A, Takagi K, Suzuki H, et al. OLFM4, LY6D and S100A7 as potent markers for distant metastasis in estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Cancer Sci* 2018;109:3350-3359. doi: 10.1111/cas.13770.
 32. Hammond M, Hayes D, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:2784-2795. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.

33. Sato-Tadano A, Suzuki T, Amari M, et al. Hexokinase II in breast carcinoma: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 α and Ki-67. *Cancer Sci* 2013;104:1380-1388. doi: 10.1111/cas.12238.
34. Krishnapriya S, Malipatil B, Surekha S, et al. Microvessel Density (MVD) in Locally Advanced Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20:1537-1545. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.5.1537.
35. Takagi K, Miki Y, Onodera Y, et al. ARHGAP15 in Human Breast Carcinoma: A Potent Tumor Suppressor Regulated by Androgens. *Int J Mol Sci* 2018;19:804. doi: 10.3390/ijms19030804.
36. Tan F, Jiang Y, Sun N, et al. Identification of isocitrate dehydrogenase 1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:M111.008821. doi: 10.1074/mcp.M111.008821.
37. Calvert A, Chalastanis A, Wu Y, et al. Cancer-Associated IDH1 Promotes Growth and Resistance to Targeted Therapies in the Absence of Mutation. *Cell Rep* 2017;19:1858-1873. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.014.
38. Zarei M, Lal S, Parker S, et al. Posttranscriptional Upregulation of IDH1 by HuR Establishes a Powerful Survival Phenotype in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* 2017;77:4460-4471. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0015.

39. Robbins D, Wittwer J, Codarin S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 is downregulated during early skin tumorigenesis which can be inhibited by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Sci* 2012;103:1429-1433. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02317.x.
40. Wang L, Tong S, Hu H, et al. Quantitative proteome analysis of ovarian cancer tissues using a iTRAQ approach. *J Cell Biochem* 2012;113:3762-3772. doi: 10.1002/jcb.24250.
41. Chen X, Xu W, Wang C, et al. The clinical significance of isocitrate dehydrogenase 2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 2017;7:700-714. www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0049960.
42. Li J, He Y, Tan Z, et al. Wild-type IDH2 promotes the Warburg effect and tumor growth through HIF1 α in lung cancer. *Theranostics* 2018;8:4050-4061. doi: 10.7150/thno.21524.
43. Lian C, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 2012;150:1135-46. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.033.
44. Liu W, Tian M, Jin L, et al. High expression of 5-hydroxymethylcytosine and isocitrate dehydrogenase 2 is associated with favorable prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2014;33:32. doi: 10.1186/1756-9966-33-32.
45. Wu D. Isocitrate dehydrogenase 2 inhibits gastric cancer cell invasion via matrix metalloproteinase 7. *Tumour Biol* 2016;37:5225-5230. doi: 10.1007/s13277-015-4358-2.

46. Jasmine L, Fotini M, Lisa A, et al. IDH3 α regulates one-carbon metabolism in glioblastoma. *Sci Adv* 2019;5:eaat0456. doi: 10.1126/sciadv.aat0456.
47. Menendez J, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7,763–777. doi:10.1038/nrc2222.
48. Mullen A, Wheaton W, Jin E, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2012;7381:385–388 doi: 10.1038/nature10642.
49. Ramon C, Nicholas C. Hypoxic Regulation of Glutamine Metabolism through HIF1 and SIAH2 Supports Lipid Synthesis that Is Necessary for Tumor Growth. *Cell Metab* 2014;19:285-292. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.022.
50. Wise D, Ward P, Shay J, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:19611-19616. doi:10.1073/pnas.1117773108.
51. Koh H, Lee S, Son B, et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem* 2004;279:39968-39974 doi:10.1074/jbc.M402260200.
52. Ward P, Patel J, Wise D, et al, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010;17:225-234. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.020.
53. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/>. (2021年1月16日参照)

54. Torrens-Mas M, Pons D, Sastre-Serra J, et al. SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments Through an Increment in ROS Production. *J Cell Biochem* 2017;118:397-406. doi: 10.1002/jcb.25653.
55. Yan H, Parsons D, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360:765–773
56. Kim S, Kim S, Ku H, et al. Suppression of tumorigenesis in mitochondrial NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase knock-out mice. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:135-143. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.11.008.
57. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest* 2014;124:398-412. doi: 10.1172/JCI71180.
58. Smolková K, Dvořák A, Zelenka J, et al. Reductive carboxylation and 2-hydroxyglutarate formation by wild-type IDH2 in breast carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;65:125-133. doi: 10.1016/j.biocel.2015.05.012.
59. Seok J, Yoon S, Lee S, et al. The oncometabolite d-2-hydroxyglutarate induces angiogenic activity through the vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling pathway. *Int J Oncol* 2019;54:753-763. doi: 10.3892/ijo.2018.4649.

60. Koseki J, Colvin H, Fukusumi T, et al. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2015;46:1181-1191. doi: 10.3892/ijo.2015.2833.
61. Ralph J, Anthony M, Evgueni D, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19345-19350. doi: 10.1073/pnas.0709747104.
62. Ramachandran N, Colman R. Chemical characterization of distinct subunits of pig heart DPN-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1980;18:8859–8864.
63. Hamoud A. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Biosci* 2017;7:37. doi: 10.1186/s13578-017-0165-3.
64. Dali L, Shenglan L, Allen Z, et al. Expression of SREBP2 and cholesterol metabolism related genes in TCGA glioma cohorts. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e18815. doi: 10.1097/MD.00000000000018815.
65. FDA granted regular approval to enasidenib for the treatment of relapsed or refractory AML. News release. FDA. August 1, 2017. <https://bit.ly/34w9Wdn>. (2021年1月4日参照)

66. Bristol Myers Squibb provides update on phase 3 IDHENTIFY trial in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. News release. Bristol Myers Squibb. <https://bit.ly/2Yz3xuj>. (2021 年 1 月 4 日参照)
67. Elisa B, Chiara R, Giulia G, et al. IDH2 inhibition enhances proteasome inhibitor responsiveness in hematological malignancies. *Blood* 2019;133:156-167. doi: 10.1182/blood-2018-05-850826.

9. 図の説明

図 1. 研究背景

A; 疾患が発現するための各階層からなるネットワークの概要と、今回の研究に至るまでの研究実績。microRNA、mRNA の発現に着目したマイクロアレイを行い、それぞれ miR-1 と CITED2 に対する研究を行った。B; 今回の研究を開始するにあたって行ったメタボローム解析の結果。ステージIV (9例) とステージ I-III (18例) の乳癌における代謝産物の存在量の差をプロットした。縦軸は比率を示し、横軸は代謝産物の量の平均を示している。ステージ I-IIIと比較してステージIVで2倍以上増加していたものを赤字で表示し、1/2以下に減少していたものを青字で示している。

図 2. 代謝産物の説明

A; クエン酸の生体内での役割。クエン酸は TCA 回路の構成成分の一つであるとともに、アセチル CoA の供給元となり、脂質合成やコレステロール合成にとっても必要とされる。B; 2HG のオンコメタボライトとしての性質。2HG は α -KG 依存性酵素の働きを阻害し、異常遺伝子発現や細胞増殖、血管新生に関与する。

図 3. IDH アイソフォームの通常機能と細胞内の局在

3つのアイソフォームすべてがイソクエン酸を酸化的に α -KG に変換する。IDH1 と IDH2 はホモ 2 量体であり、一方 IDH3 はヘテロ 4 量体である。IDH1 と IDH2 は utilize

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)⁺ を共役因子として、NADPH を産生する。IDH3 は NAD⁺ を使用し、NADH を産生する。IDH2 と IDH3 はミトコンドリアに存在する一方、IDH1 は細胞質基質とペルオキシソームに存在する。特定の状態では IDH1 と IDH2 は α -KG を消費し、イソクエン酸に変換するが、一方 IDH3 は一方向の反応である。

A; IDH アイソフォームの構造。IDH1 と IDH2 はホモ 2 量体を形成して機能する。IDH3 は α 、 β 、 γ サブユニットが接合したヘテロ 4 量体として機能する。

B; IDH1 は細胞質内に存在し、IDH2 と IDH3 はミトコンドリア内に存在する。

図 4. 浸潤性乳癌に対する IDH アイソフォームの免疫染色

乳癌細胞における陽性像 A; IDH1 陽性例、B; IDH2 陽性例、C、IDH3 α 陽性例。

正常の乳腺組織では、IDH1 は陽性 (D)、IDH2 は陰性 (E)、IDH3 α は陽性 (F)である。

スケールバー: 100 μ m

図 5. IDH アイソフォームごとの乳癌患者の無病生存期間 (A, C, E, G, H, I) と乳癌特異的生存期間 (B, D, F, J)

A, B; IDH1 発現状態、C, D; IDH2 発現状態、E, F; IDH1-3 α を組み合わせた発現状態、G, H; 術後核療法の有無毎の IDH2 発現状態、I, J; IDH3 α 発現状態。図 5A-D, G-J の実線は IDH アイソフォーム陽性例のもので、破線は IDH アイソフォーム陰性のもので

ある。図 5E, F の実線は IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性のものであり、鎖線は IDH2 陽性のグループから IDH1 陰性/IDH2 陽性/IDH3 α 陰性を除いたグループのものであり、破線は IDH2 陰性のグループのものである。P 値が 0.05 以下を有意差として太字で表した。

図 6. ER 発現状態毎の IDH2 発現状態と乳癌患者の無病生存期間 (A, C) と乳癌特異的生存期間 (B, D)

A, B; ER 陽性例 (n = 185) と C, D; ER 陰性例 (n = 41)。直線は、IDH2 陽性グループのもので、破線は IDH2 陰性グループのものである。P 値が 0.05 以下を有意差として太字で表した。

図 7. 乳癌細胞に対する IDH2 が増殖に与える影響

IDH2 特異的な siRNA を導入した時の T47D (A) と SKBR-3 (B) の IDH2 発現量。上のパネルは IDH2 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で計測したものを示している。下のパネルはウェスタンブロッティングによって IDH2 を検出したものであり、 β -actin の染色性を内因性コントロールとして用いた。C, D; T47D (C) と SKBR-3 (D) に siIDH2 を導入した時の細胞増殖能の変化。導入 0 日目のデータと比較した値で示している。siIDH2-1 を導入 (黒丸と実線)、siIDH2-2 を導入 (灰色の四角と鎖線)、そして siCTL (白三角と破線)。相対的な細胞増殖能は、何も処理していない細胞に WST-8 ア

ッセイを使って求めた値と比較した割合として計算した。全てのデータは平均値±SD (n = 4) で表され、siCTL を導入した細胞を陰性コントロールとしてフィッシャーのPLSD 検定を用いて統計解析を行った。

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$.

図 8. 乳癌における IDH2 発現の意義

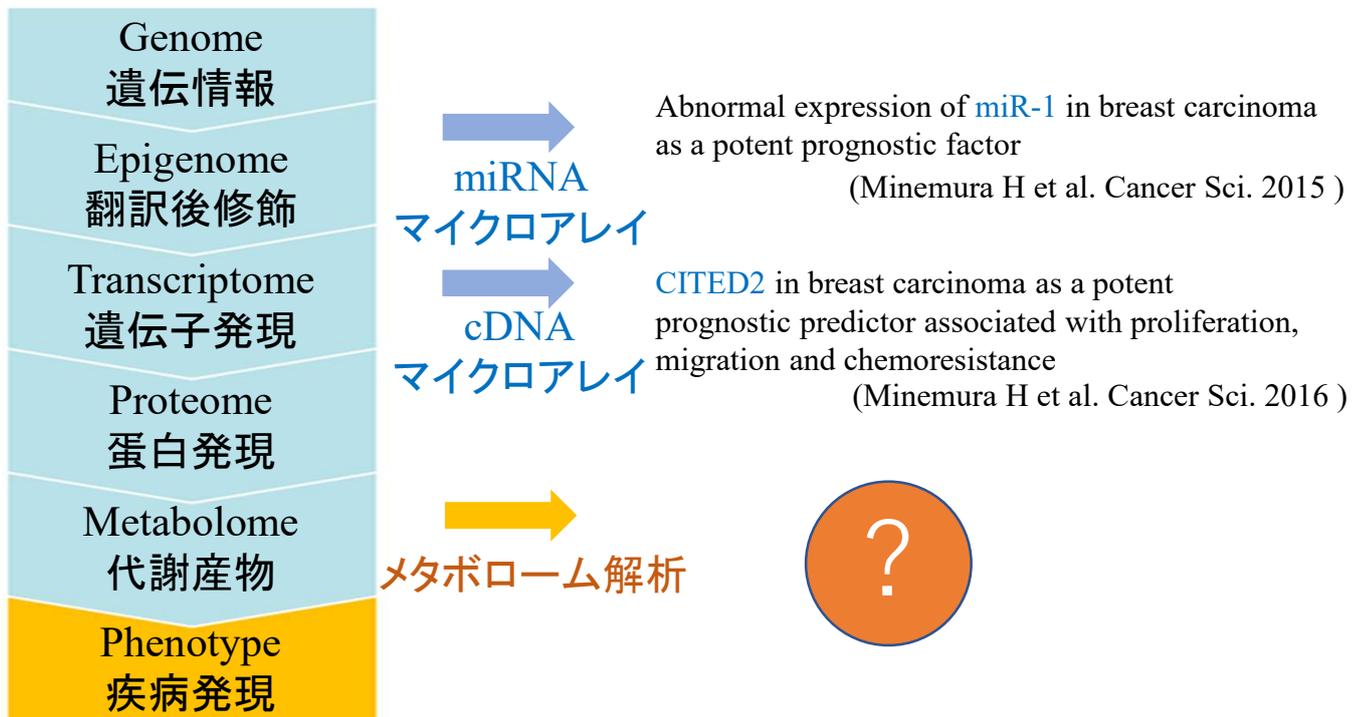
A; ワーブルグ効果時の代謝経路の変化と IDH2 の役割。低酸素環境では TCA 回路の利用が低下し、解糖系やペントースリン酸回路、グルタミン代謝の亢進が生じる。TCA 回路からのアセチル CoA の供給は減少するが、IDH2 がカルボキシル化によって α -KG をイソクエン酸に変換することでアセチル CoA の供給につながる経路が知られている。B; IDH2 と ROS の関係。代謝活動や化学療法、放射線により産生された ROS が蓄積すると DNA 障害が生じアポトーシスが誘導される。IDH2 は抗酸化酵素が ROS を除去し細胞環境を維持するために必要な NADPH の供給を行う。C; IDH2 と HIF-1 α の関係。HIF-1 α は正常環境では常に α -KG 依存性酵素である PHD により分解される。IDH2 による α -KG の消費、もしくは 2HG 産生により、PHD は機能不全となり、HIF-1 α の分解が起こらなくなり VEGF のような遺伝子発現が促進され血管新生が誘導される。

図 9. 乳癌における IDH2 発現の意義

IDH2 は正常乳腺組織では発現陰性だったが、癌において過剰発現していた。IDH2 の発現は細胞増殖、血管新生、薬剤耐性などに関与し、乳癌の進行、再発に寄与すると考えられる。

図1.

A



B

ステージIV乳癌におけるメタボライトの変動

増加 (倍)		減少 (倍)	
Citrate	12.3	Glycerophosphorylcholine	0.44
2-HG	3.0	G1P	0.45
N-Acetylaspartate	2.1	Glutarate	0.45

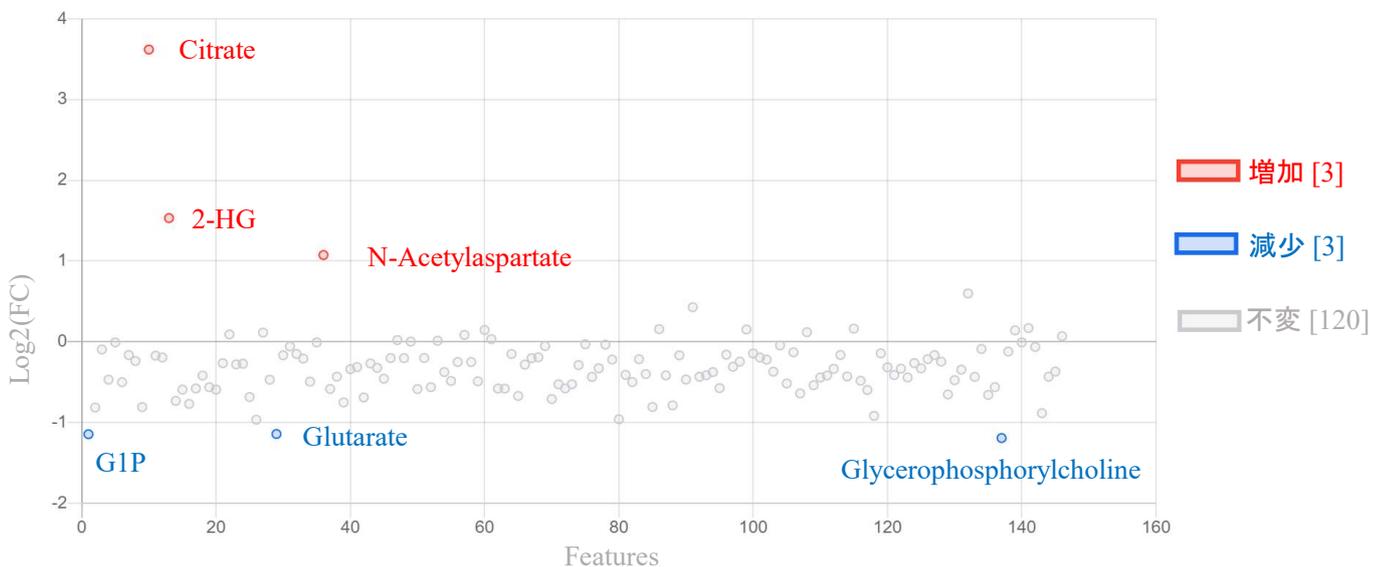
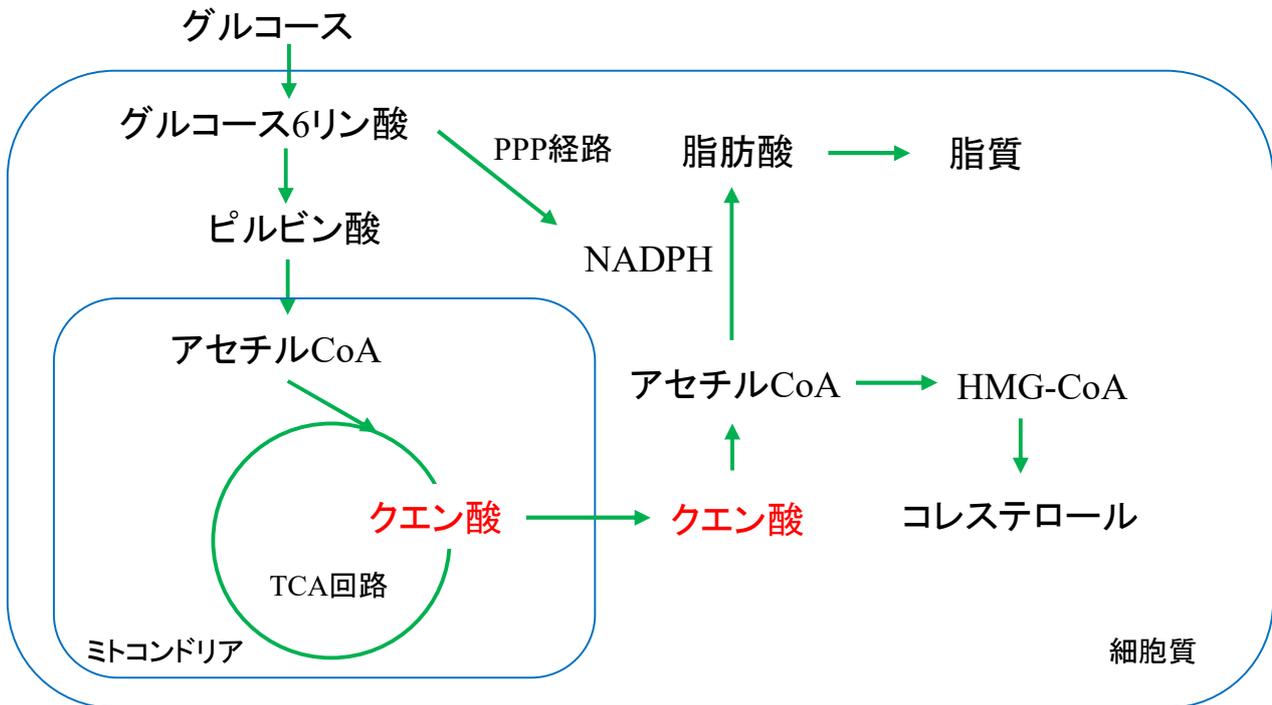


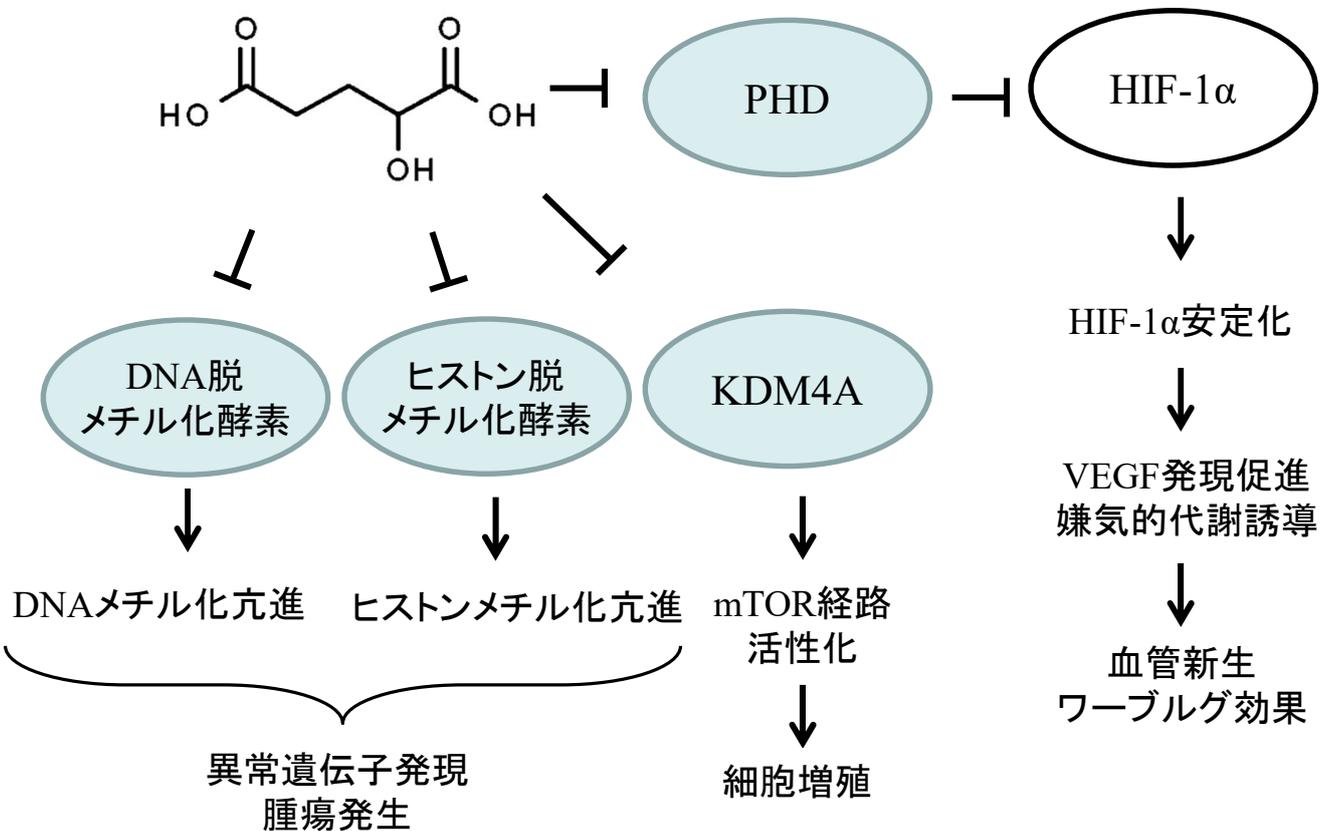
図2.

A



B

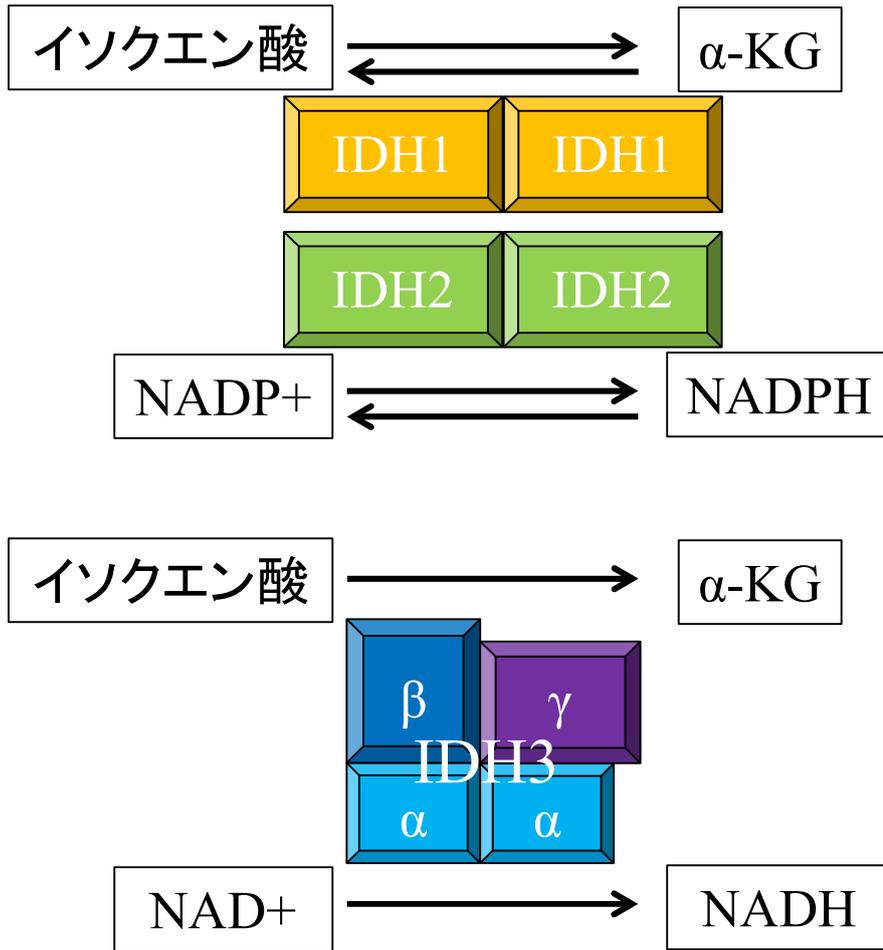
2-ヒドロキシグルタル酸



○ : α-KG依存性酵素

図3.

A



B

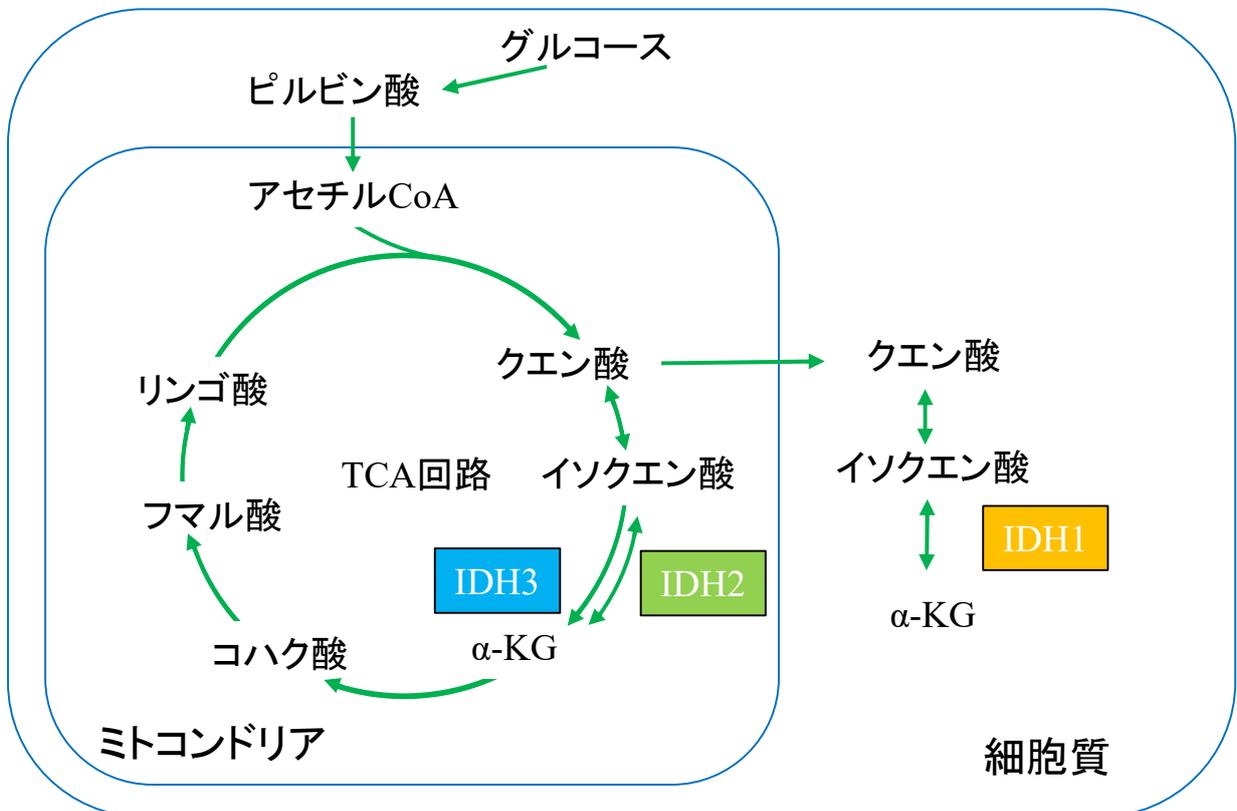
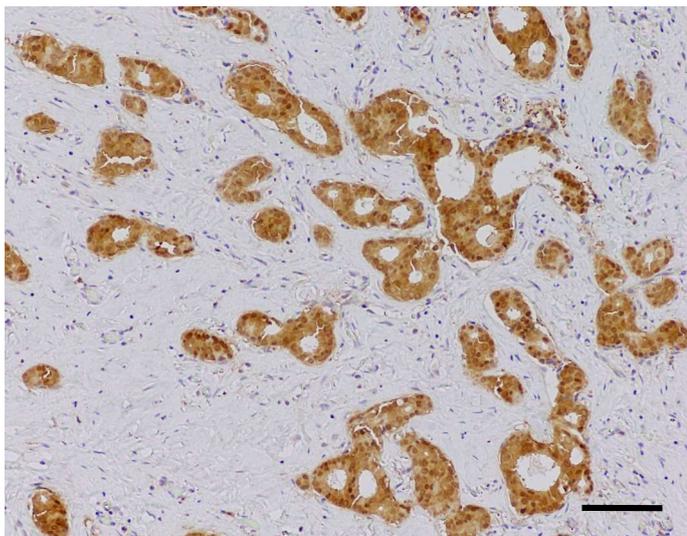
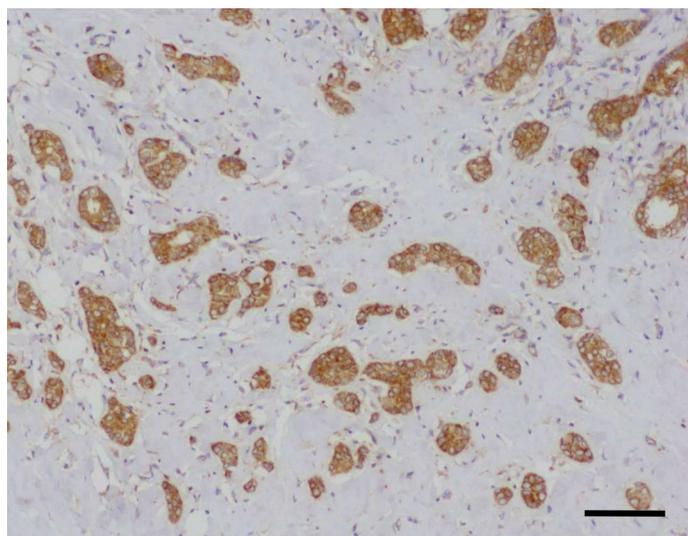


图4.

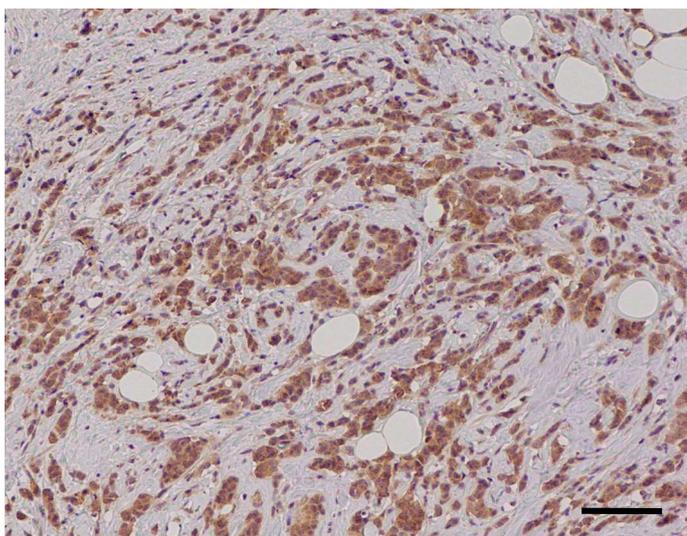
A



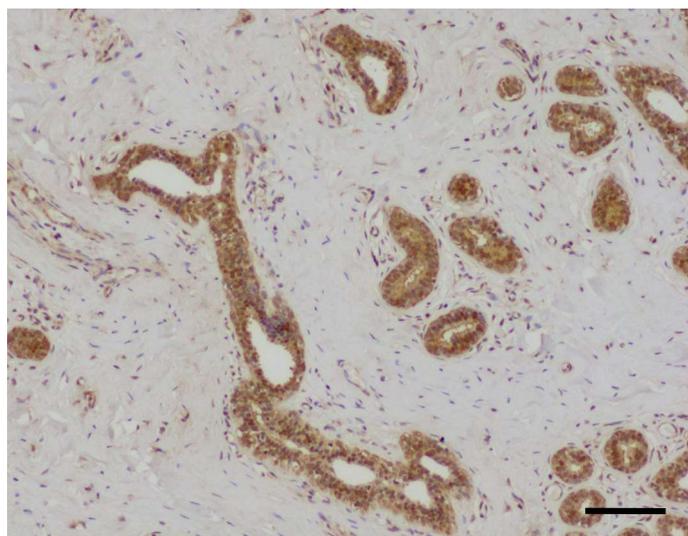
B



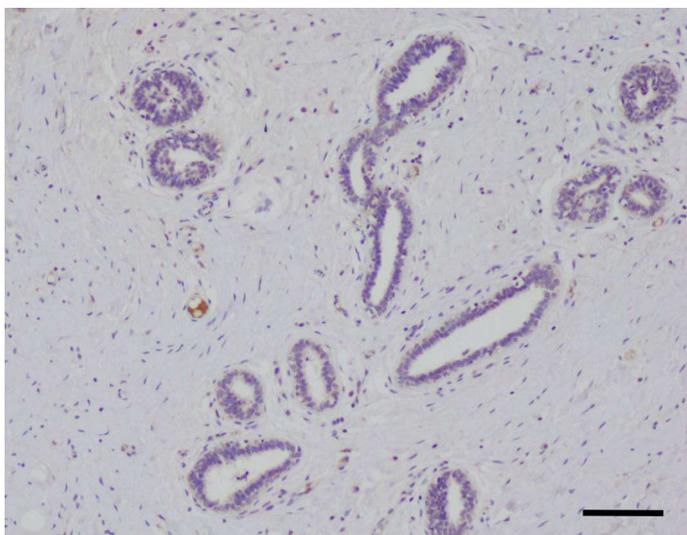
C



D



E



F

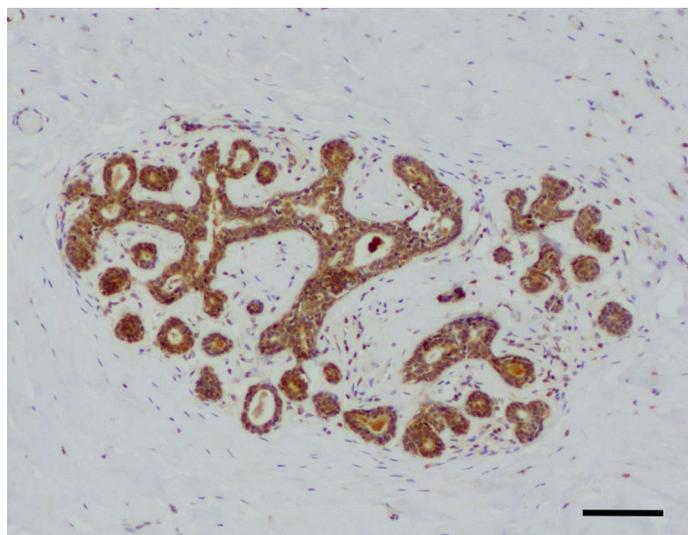


図5.

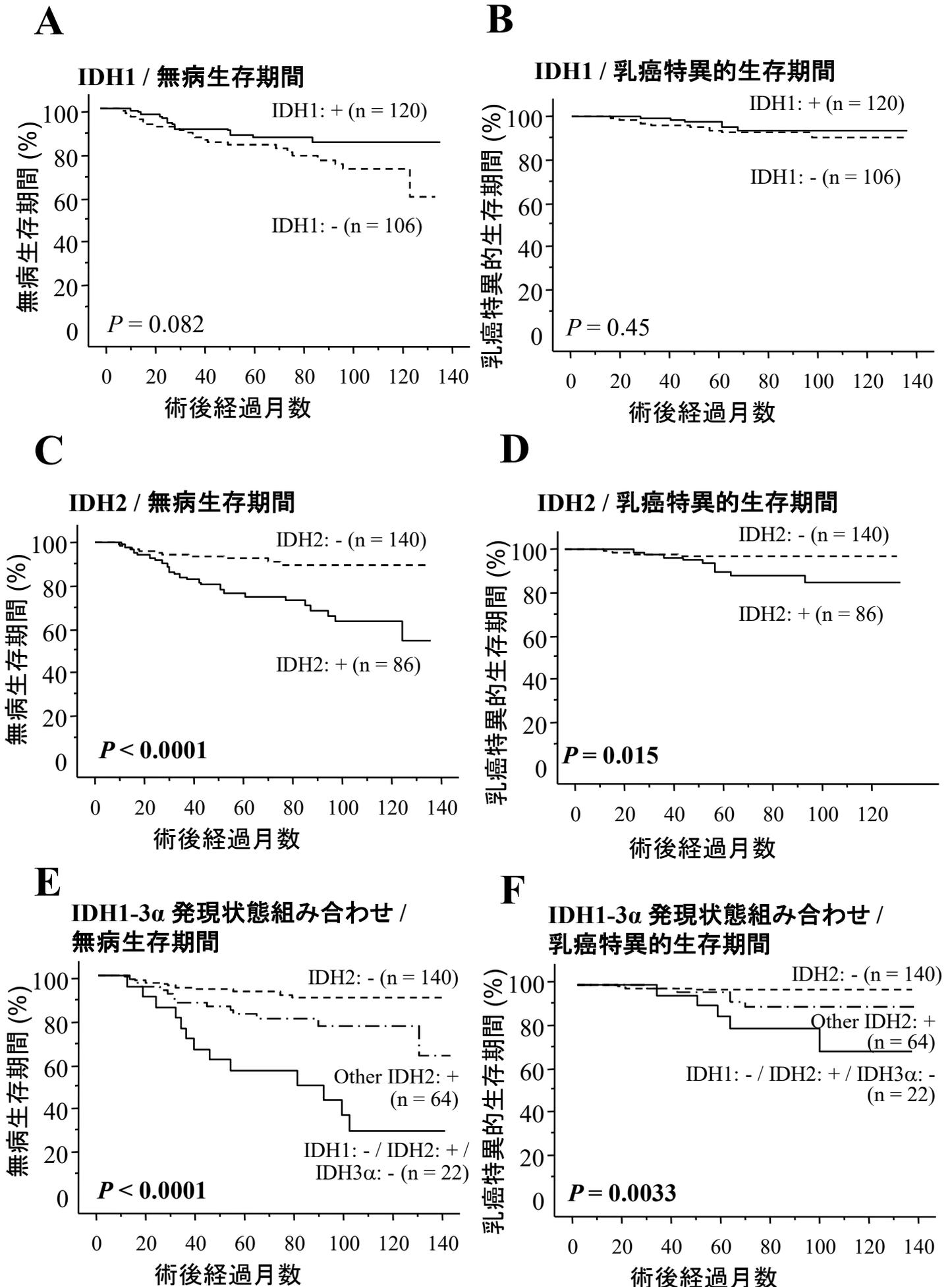


图5.

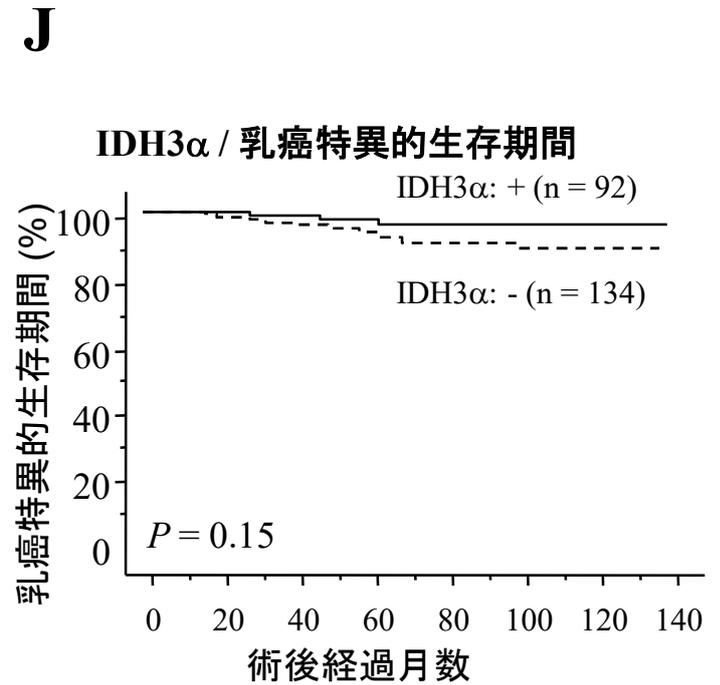
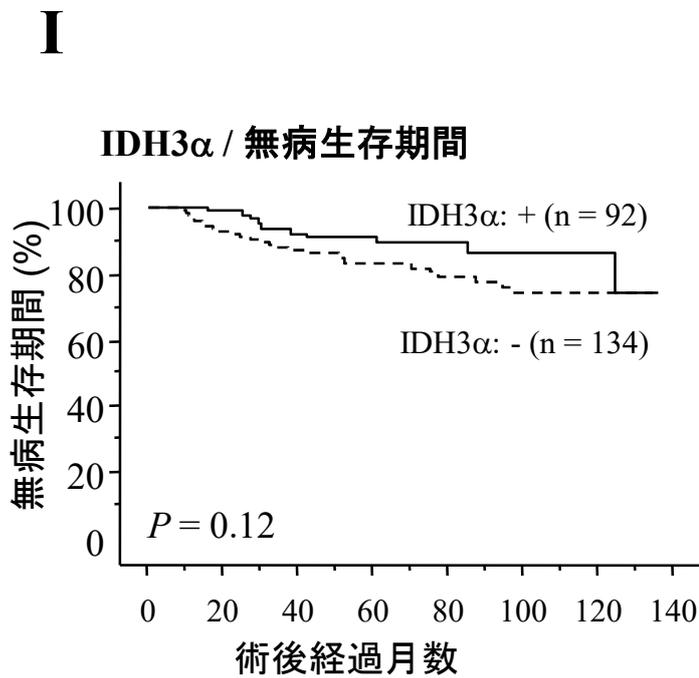
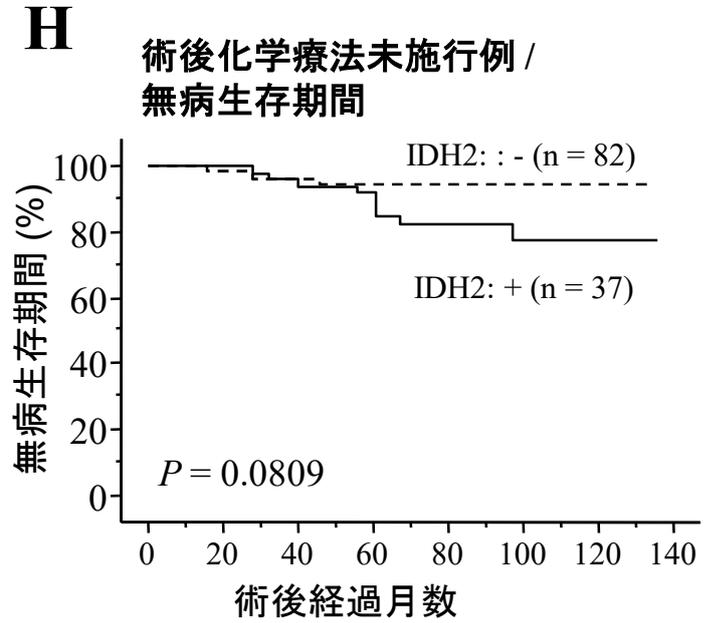
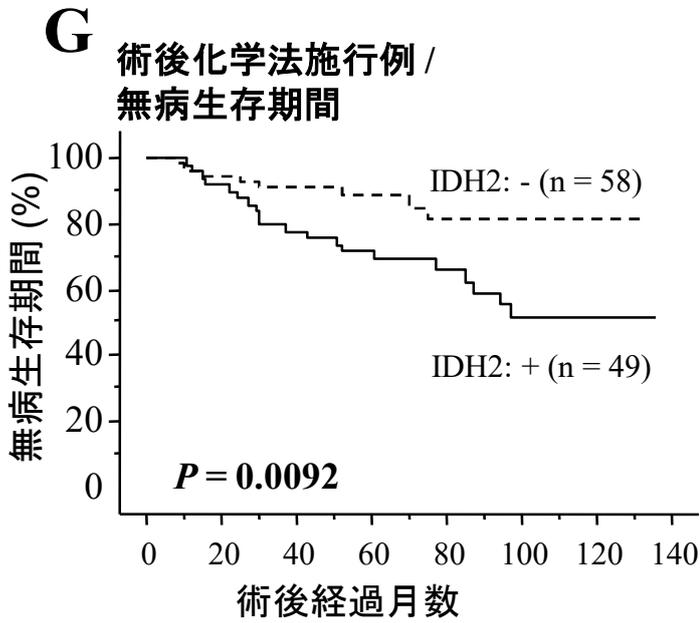


圖6.

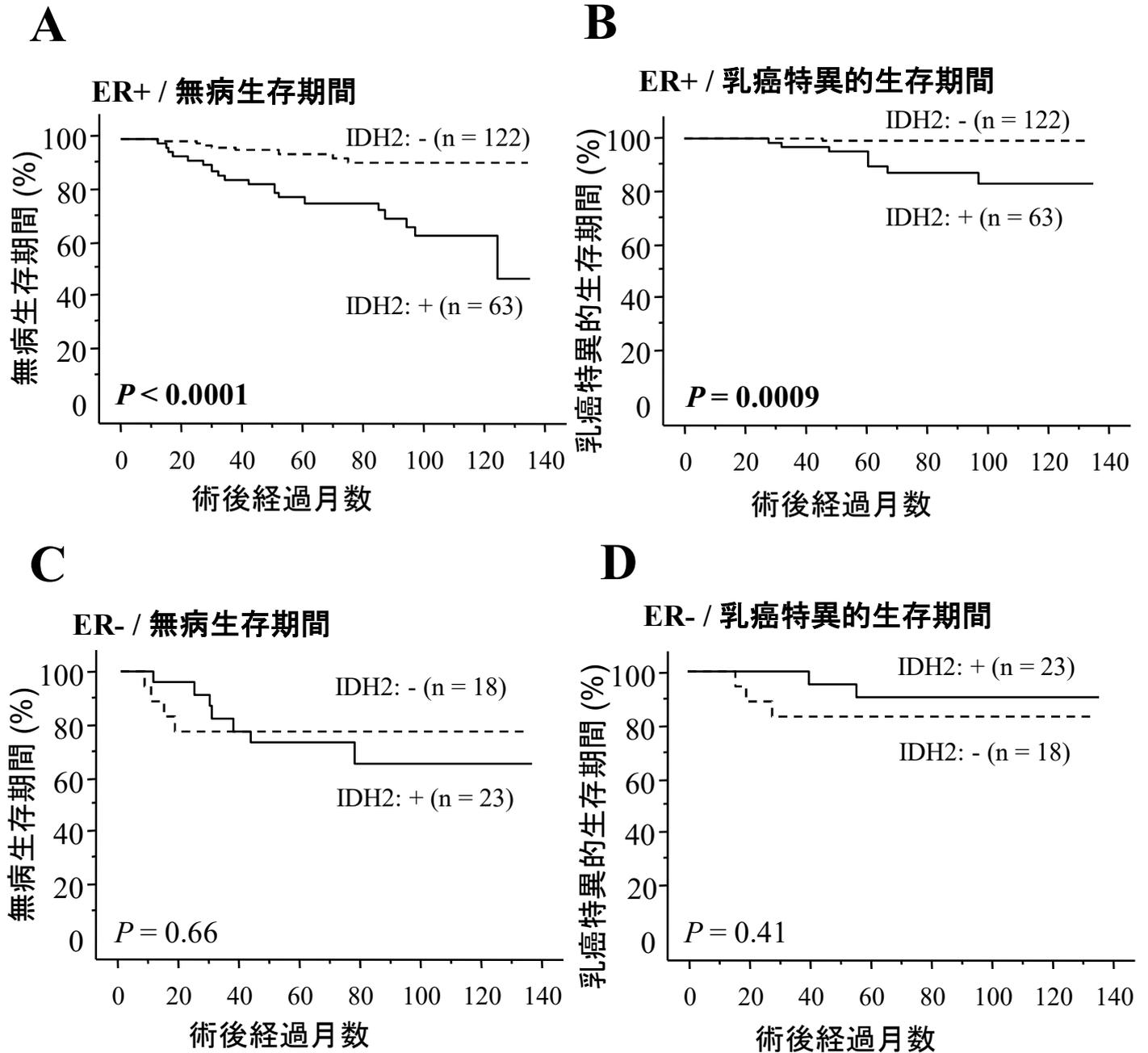
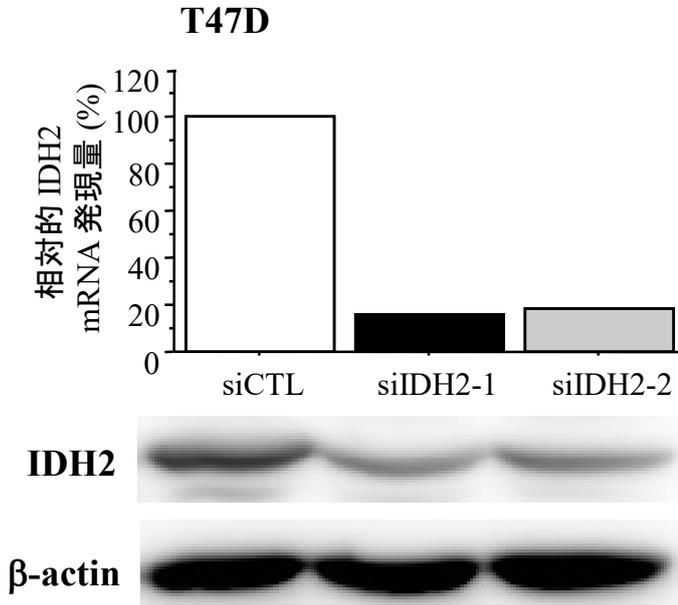
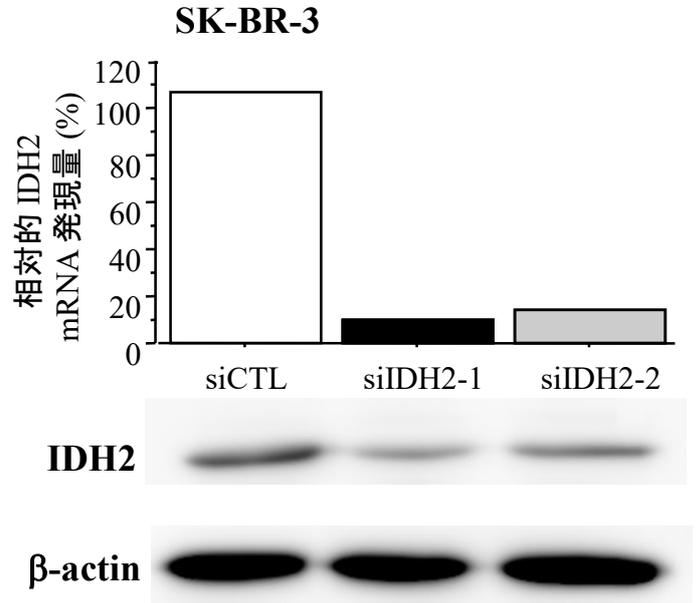


图7.

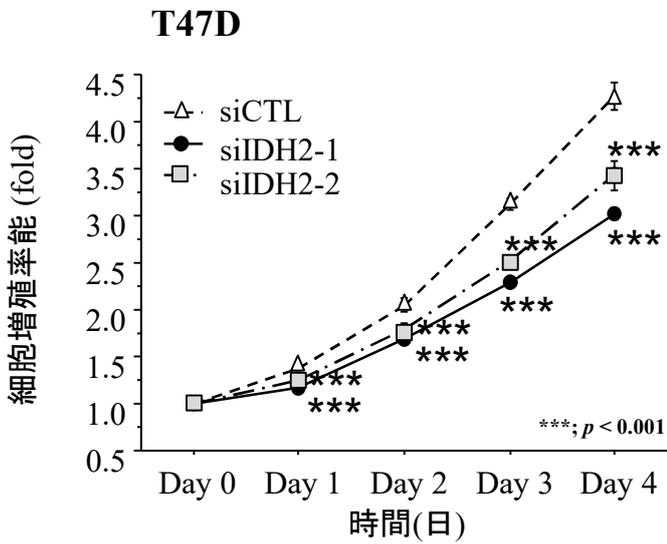
A



B



C



D

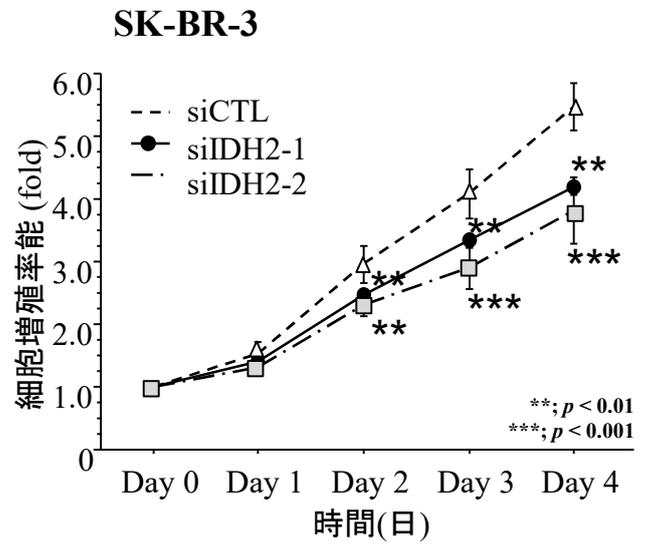
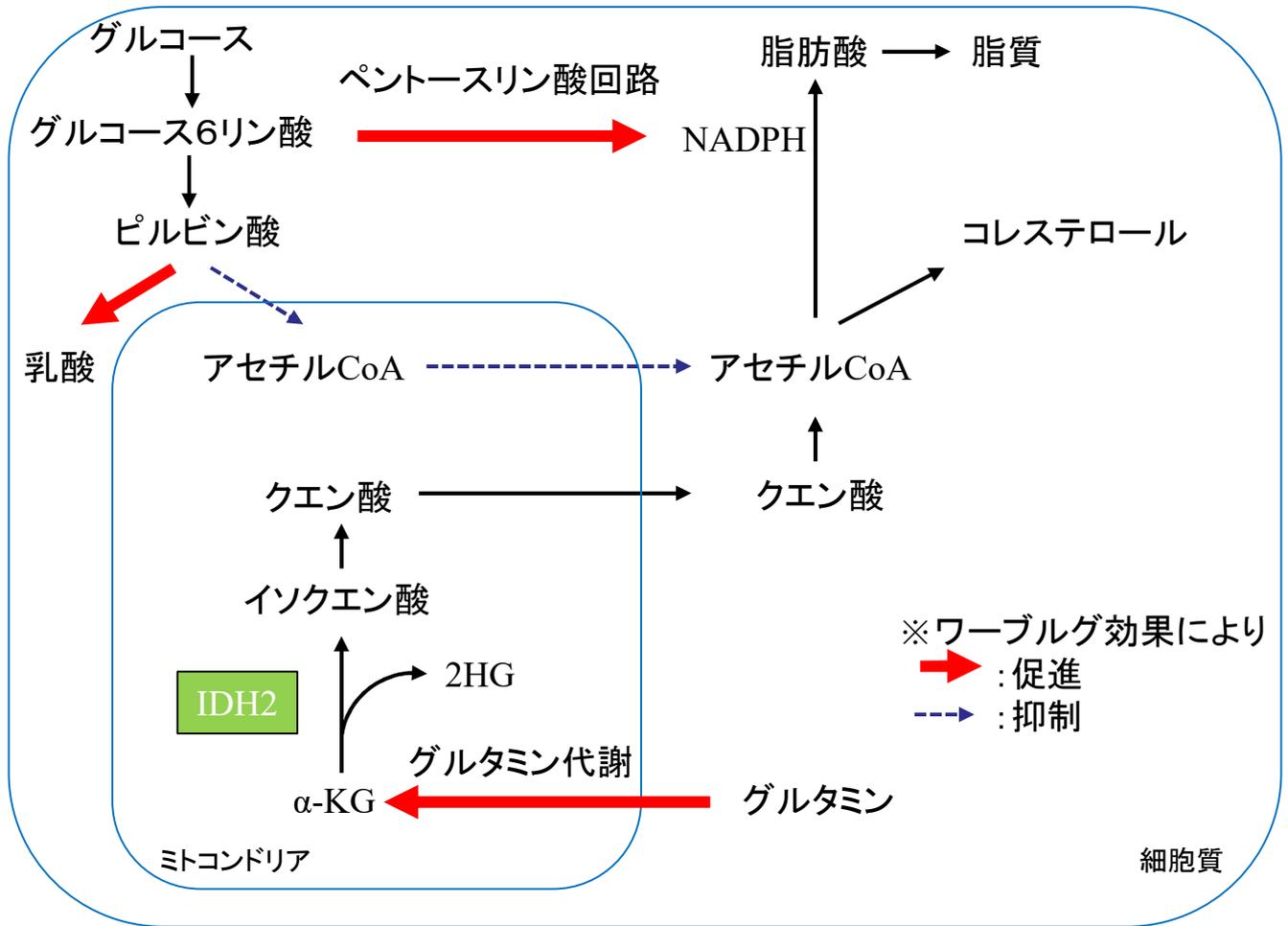
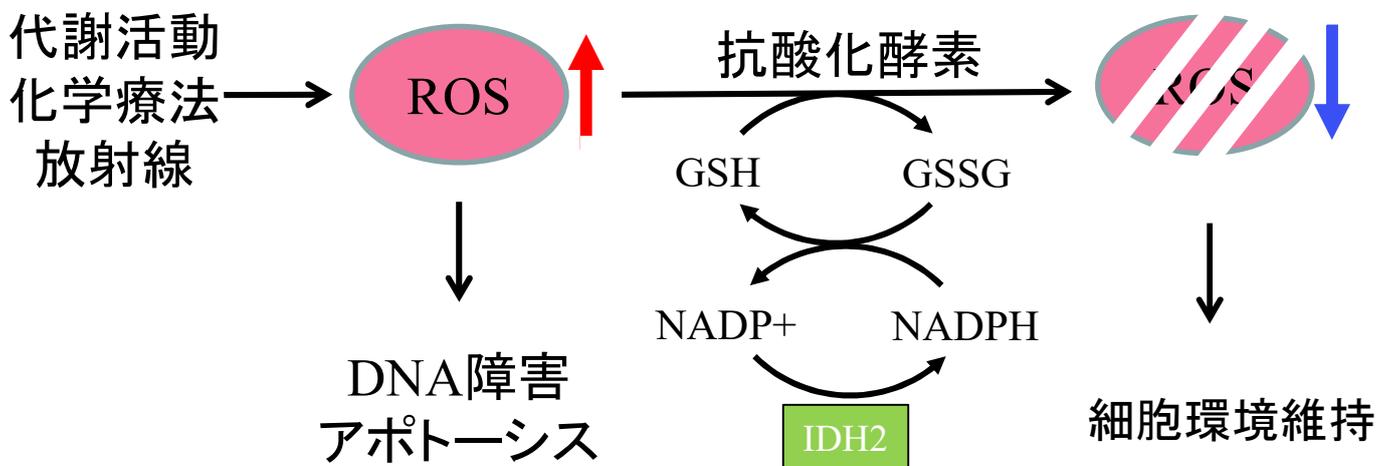


図8.

A



B



※GSH : Glutathione
GSSG : Glutathione disulfide

図8.

C

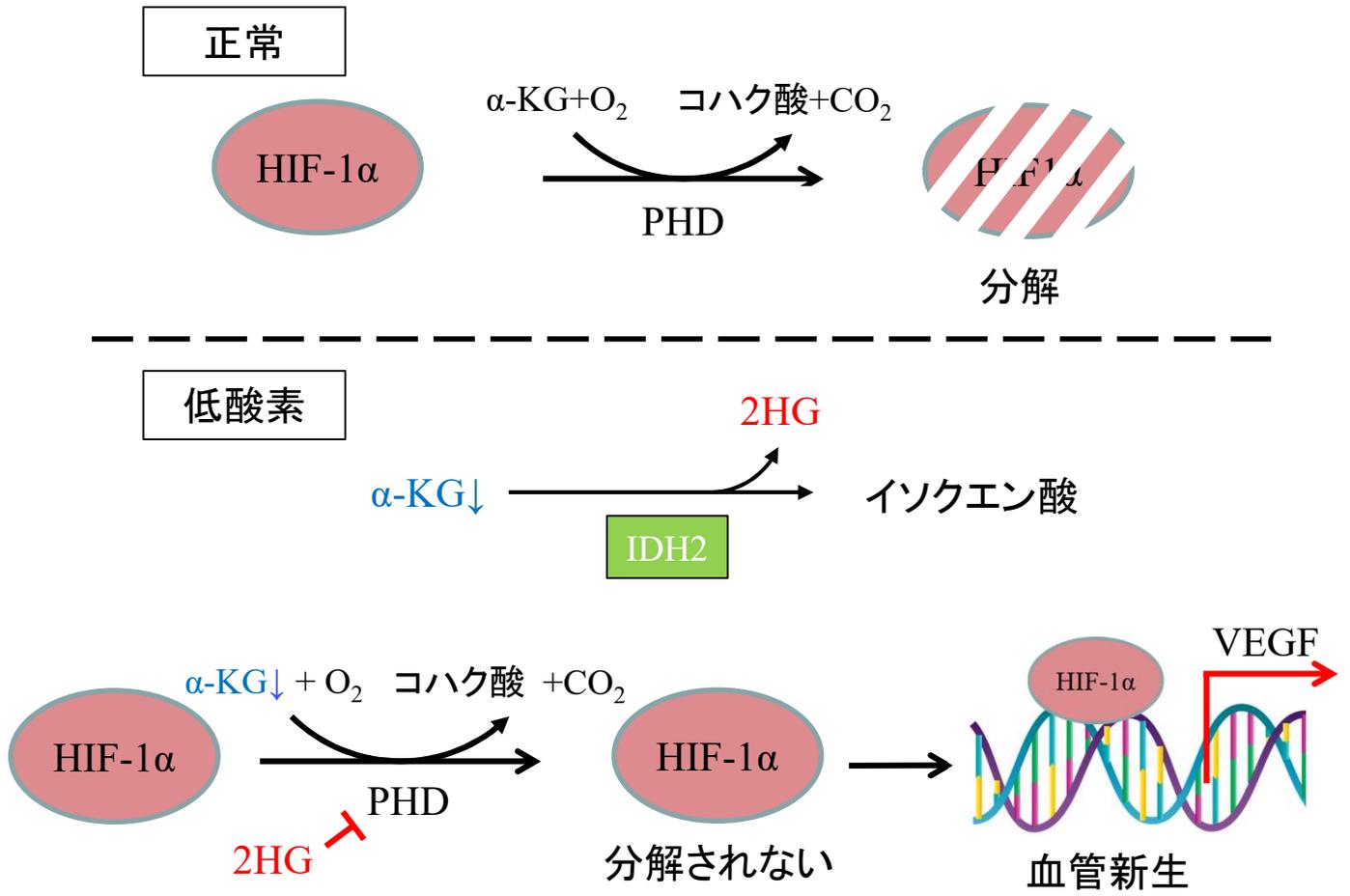
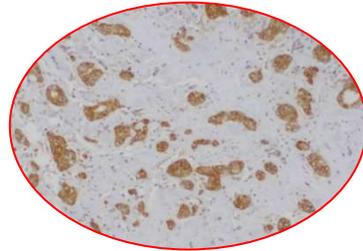
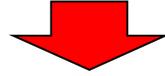


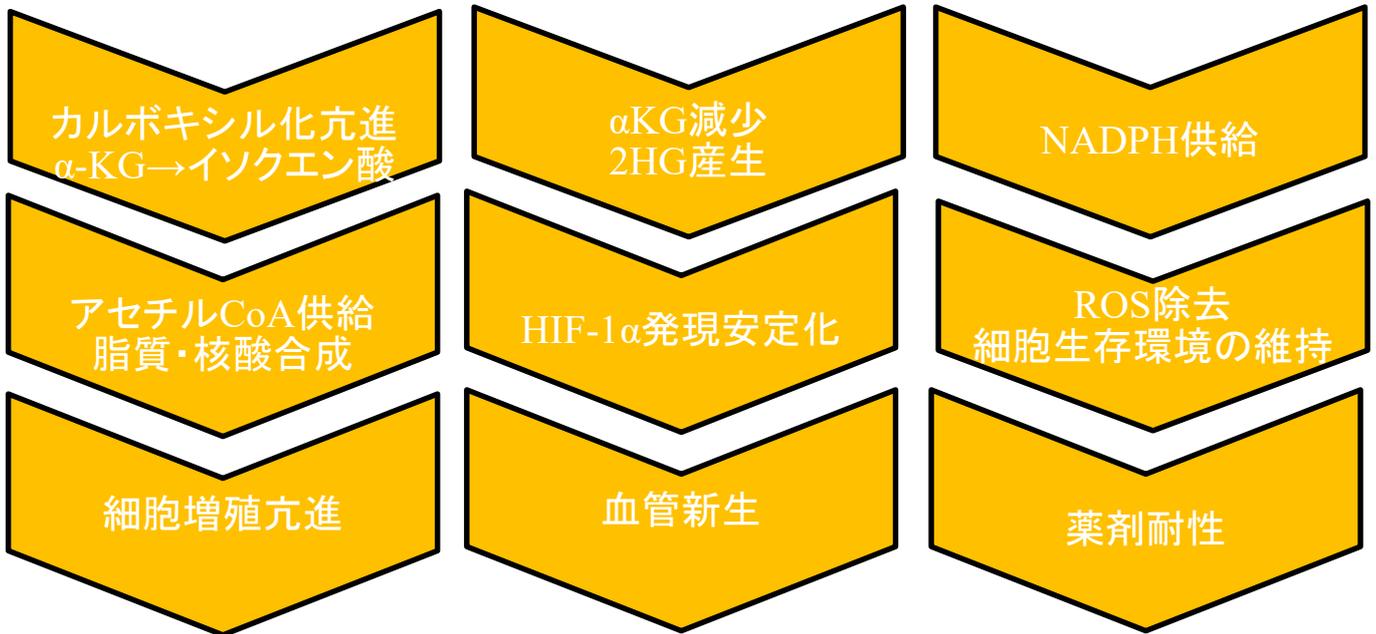
図9.



正常乳腺組織
IDH2陰性



乳癌
IDH2陽性



乳癌の進行、再発

表 1. 免疫染色によるIDH1の発現状態と乳癌症例226例の病理学的因子との関係

変数	IDH1 発現状態		P 値
	+(n = 120)	-(n = 106)	
年齢 [§] (年)	57.2±1.0	54.4±1.3	0.094
ステージ			
I	74	55	
II+III	66	51	0.14
病理学的T因子 (pT)			
pT1	95	62	
pT2-4	25	44	0.0007*
リンパ節転移			
陽性	38	35	
陰性	82	71	0.83
組織学的異型度			
1-2	96	86	
3	24	20	0.83
脈管侵襲			
有り	70	66	
無し	50	40	0.55
ER			
陽性	97	88	
陰性	23	18	0.67
PR			
陽性	77	77	
陰性	43	29	0.56
HER2			
陽性	21	14	
陰性	99	92	0.37
Ki-67 LI [§] (%)	13.6±1.0	17.3±1.4	0.024*
微小血管密度 [§]	25.3±1.5	29.1±2.0	0.11
IDH2			
陽性	53	33	
陰性	67	73	0.044*
IDH3α			
陽性	62	30	
陰性	58	76	0.0004*

§; データは平均値と±標準偏差で表し、他の値はその症例数で表す

*; P < 0.05 を有意差とし、太字で示す

表 2. 免疫染色によるIDH2の発現状態と乳癌症例226例の病理学的因子との関係

変数	IDH2 発現状態		P 値
	+ (n = 86)	- (n = 140)	
年齢 [§] (年)	56.3±1.3	55.7±1.1	0.72
ステージ			
I	41	88	
II+III	45	42	0.025*
病理学的T因子 (pT)			
pT1	51	106	
pT2-4	35	34	0.0093*
リンパ節転移			
陽性	34	39	
陰性	52	101	0.068
組織学的異型度			
1-2	61	121	
3	25	19	0.0043*
脈管侵襲			
有り	59	77	
無し	27	63	0.041*
ER			
陽性	63	122	
陰性	23	18	0.0085*
PR			
陽性	48	106	
陰性	38	34	0.0018*
HER2			
陽性	11	15	
陰性	66	125	0.011*
Ki-67 LI [§] (%)	19.3±1.4	12.9±1.0	0.0002*
微小血管密度 [§]	32.8±1.3	23.5±1.3	0.0002*
IDH3α			
陽性	47	45	
陰性	39	95	0.0008*

§; データは平均値と±標準偏差で表し、他の値はその症例数で表す

*; $P < 0.05$ を有意差とし、太字で示す

表 3. 免疫染色によるIDH3aの発現状態と乳癌症例226例の病理学的因子との関係

変数	IDH3a 発現状態		P 値
	+	-	
年齢 [§] (年)	56.3±1.2	55.7±1.1	0.73
ステージ			
I	52	77	
II+III	40	57	0.89
病理学的T因子 (pT)			
pT1	63	94	
pT2-4	29	40	0.79
リンパ節転移			
陽性	31	42	
陰性	61	92	0.71
組織学的異型度			
1-2	75	107	
3	17	27	0.76
脈管侵襲			
有り	53	83	
無し	39	51	0.51
ER			
陽性	75	110	
陰性	17	24	0.91
PR			
陽性	63	91	
陰性	29	43	0.93
HER2			
陽性	14	16	
陰性	73	118	0.075
Ki-67 LI [§] (%)	14.5±1.1	16.0±1.2	0.38
微小血管密度 [§]	25.0±1.8	28.5±1.6	0.16

§; データは平均値と±標準偏差で表し、他の値はその症例数で表す

*; $P < 0.05$ を有意差とし、太字で示す

表 4. 免疫染色による反対のIDH表現型の発現状態と乳癌症例226例の病理学的因子との関係

変数	IDH アイソフォームの表現型			P 値
	IDH1: - / IDH2: + / IDH3α: - (n = 22)	Other IDH2: + (n = 64)	IDH2: - (n = 140)	
年齢 [§] (年)	56.6±3.1	56.1±1.4	55.7±1.1	0.93
ステージ				
I	7	34	38	
II+III	15	30	52	0.018*
病理学的T因子 (pT)				
pT1	9	42	106	
pT2-4	13	22	34	0.0046*
リンパ節転移				
陽性	12	22	39	
陰性	10	42	101	0.041*
組織学的異型度				
1-2	12	49	121	
3	10	45	19	0.0013*
脈管侵襲				
有り	17	42	77	
無し	5	22	63	0.073
ER				
陽性	16	47	122	
陰性	6	17	18	0.031*
PR				
陽性	13	35	106	
陰性	9	29	34	0.0072*
HER2				
陽性	2	18	15	
陰性	20	46	125	0.0042*
Ki-67 LI [§] (%)	24.4±3.3	17.5±1.4	12.9±1.0	< 0.0001*
微小血管密度 [§]	29.3±5.3	30.9±2.2	23.5±1.3	0.0002*

反対のIDH表現型; IDH1陰性 / IDH2陽性 / IDH3α陰性

§; データは平均値と ± 標準偏差で表し、他の値はその症例数で表す

*; P < 0.05 を有意差とし、太字で示す

表 5. 乳癌症例226例の無病生存期間における単変量および多変量解析

変数	単変量	多変量	
	P 値	P 値	相対リスク (95% CI)
病理学的T因子 (pT)			
(pT1 / pT2-4)	< 0.0001 †	0.0096 *	2.65 (1.27-5.54)
IDH2			
(陰性 / 陽性)	0.0002 †	0.014 *	2.44 (1.20-4.99)
Ki-67			
(<20% / ≥20%)	0.0005 †	0.027 *	2.12 (1.09-4.11)
リンパ節転移			
(陰性 / 陽性)	0.020 †	0.74	1.13 (0.55-2.32)
微小血管密度			
(高 / 低)	0.053		
組織学的異型度			
(1,2 / 3)	0.07		
IDH1			
(陰性 / 陽性)	0.087		
ER			
(陽性 / 陰性)	0.091		
IDH3α			
(陽性 / 陰性)	0.13		
HER2			
(陰性 / 陽性)	0.15		

†: $P < 0.05$ となった因子を単変量解析における有意差ありとし、その因子に対しては続けて多変量解析を行った。

*: 多変量解析で $P < 0.05$ となった因子を独立した予後不良因子とする

95% CI; 95% 信頼区間(confidence interval)

表 6. 乳癌症例226例の乳癌特異的生存期間における単変量および多変量解析

変数	単変量	多変量	
	P 値	P 値	相対リスク (95% CI)
病理学的T因子 (pT)			
(pT1 / pT2-4)	0.0017†	0.056	3.68 (0.97-14.05)
Ki-67			
(<20% / ≥20%)	0.0078†	0.084	3.30 (0.85-12.74)
リンパ節転移			
(陰性 / 陽性)	0.016†	0.34	1.81 (0.54-6.11)
IDH2			
(陰性 / 陽性)	0.024†	0.30	1.92 (0.56-6.52)
組織学的異型度			
(1,2 / 3)	0.045†	0.75	1.25 (0.33-4.66)
ER			
(陽性 / 陰性)	0.11		
IDH3α			
(陽性 / 陰性)	0.16		
微小血管密度			
(高 / 低)	0.29		
IDH1			
(陰性 / 陽性)	0.45		
HER2			
(陰性 / 陽性)	0.81		

†; $P < 0.05$ となった因子を単変量解析における有意差ありとし、その因子に対しては続けて多変量解析を行った。

95% CI; 95% 信頼区間(confidence interval)

表 7. 免疫染色によるIDH2発現状態と乳癌症例226例のER発現状態毎の病理学的因子との関係

変数	IDH2 発現状態	
	ER: + (n = 185)	ER: - (n = 41)
年齢 (年)	0.75	0.58
ステージ	0.09	0.6
病理学的T因子 (pT)	0.017*	0.51
リンパ節転移	0.19	0.15
組織学的異型度	0.071	0.53
脈管侵襲	0.048*	0.99
HER2	0.049*	0.77
Ki-67	<0.0001*	0.45
微小血管密度	0.016*	0.29

データはP 値として示している.

*; 有意差あり

表 8. ER陽性乳癌症例185例の無病生存期間における単変量および多変量解析

変数	単変量	多変量	
	P 値	P 値	相対リスク (95% CI)
IDH2			
(陰性 / 陽性)	0.0002†	0.0041*	3.52 (1.49-8.31)
病理学的T因子 (pT)			
(pT1 / pT2-4)	0.0026†	0.06	2.15 (0.96-4.80)
Ki-67			
(<20% / ≥20%)	0.0044†	0.17	1.84 (0.77-4.37)
組織学的異型度			
(1,2 / 3)	0.019†	0.48	1.46 (0.52-4.14)
血管密度			
(高 / 低)	0.052		
リンパ節転移			
(陰性 / 陽性)	0.091		
IDH1			
(陰性 / 陽性)	0.43		
IDH3α			
(陽性 / 陰性)	0.43		
HER2			
(陰性 / 陽性)	0.74		

†; $P < 0.05$ となった因子を単変量解析における有意差ありとし、その因子に対しては続けて多変量解析を行った。

*; 多変量解析で $P < 0.05$ となった因子を独立した予後不良因子とする

95% CI; 95% 信頼区間(confidence interval)

表 9. ER陽性乳癌症例185例の乳癌特異的生存期間における単変量および多変量解析

変数	単変量	多変量	
	P 値	P 値	相対リスク (95% CI)
組織学的異型度			
(1,2 / 3)	0.0033†	0.14	3.05 (0.70-13.26)
Ki-67			
(<20% / ≥20%)	0.0099†	0.27	2.24 (0.54-9.35)
IDH2			
(陰性 / 陽性)	0.012†	0.034*	9.64 (1.18-78.61)
リンパ節転移			
(陰性 / 陽性)	0.046†	0.17	2.69 (0.65-11.05)
病理学的T因子 (pT)			
(pT1/pT2-4)	0.069		
微小血管密度			
(高 / 低)	0.32		
HER2			
(陰性 / 陽性)	0.23		
IDH3a			
(陽性 / 陰性)	0.73		
IDH1			
(陰性 / 陽性)	0.8		

†; $P < 0.05$ となった因子を単変量解析における有意差ありとし、その因子に対しては続けて多変量解析を行った。

*; 多変量解析で $P < 0.05$ となった因子を独立した予後不良因子とする

95% CI; 95% 信頼区間(confidence interval)