

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501039

研究課題名（和文）高悪性度乳がんにおける腫瘍浸潤リンパ球の解析と治療反応性、予後予測因子としての意義

研究課題名（英文）Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in high-grade breast cancer

研究代表者 津田 均

(TSUDA HITOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号：70217321

研究成果の概要（和文）：術前化学療法後、原発巣切除が行われたホルモン受容体陰性・HER2陰性（トリプルネガティブ）乳癌（TNBC）につき、治療前のコア針生検標本の組織学的情報から化学療法に対する病理学的完全奏効（pCR）予測指標を見出す検討を行い、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の程度が強い乳癌は pCR 率が有意に高いことを明らかにした。TNBC の中でも浸潤性乳管癌では TIL と pCR の関連がみられたが、化生癌においては見られなかった。Basal-like マーカーや p53 と pCR の間に相関は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present study was to identify histological surrogate predictive markers of pathological complete response (pCR) to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in triple-negative breast cancer (TNBC). 92 core needle biopsy (CNB) specimens obtained before NAC were available. As controls, CNB specimens from 42 tumors of the hormone receptor-negative and HER2-positive (HR-/HER2+) subtype and 46 tumors of the hormone receptor-positive and HER2-negative (HR+/HER2-) subtype were also included. Histopathological examination including tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor cell apoptosis, and immunohistochemical studies for basal markers were performed. In TNBC, the pCR rate of tumors showing a high TIL score was 37%, and significantly higher than that of the tumors showing a low TIL score (16%, $p = 0.05$). In a total of 180 breast cancers, the pCR rate of the tumors showing a high TIL score (34%) was significantly higher than that of the tumors showing a low TIL score (10%) ($p = 0.0001$). In TNBC, the pCR rate of tumors showing an apoptosis score 2 was 48%, and tended to be higher than that of the tumors showing an apoptosis score of 0 or 1 (23%, $p = 0.10$). In a total of 180 breast cancers, the pCR rate of the tumors showing an apoptosis score 2 (35%) was significantly higher than that of the tumors showing an apoptosis score of 0 or 1 (19%) ($p = 0.04$). The basal-like marker expression or p53 nuclear immunoreaction was not correlated with pCR in TNBC. Histologically, medullary/atypical medullary and apocrine types showed higher pCR rates (39% and 40%), while central acellular and metaplastic types showed lower pCR rates (21% and 17%). The degree of TIL correlated with immune response appear to play a substantial role in the response to NAC in TNBC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：腫瘍診断学

科研費の分科・細目：基盤研究 (C)

キーワード：乳癌、腫瘍浸潤リンパ球、治療効果予測、組織型

1. 研究開始当初の背景

ホルモン受容体陰性・HER2 陰性（トリプルネガティブ）乳癌（TNBC）は、内分泌療法や抗HER2 療法の適応とならないため、術前術後の全身療法としては化学療法のみが適応となる。TNBC を有する患者の約 30%は化学療法が奏効し、病理学的完全奏効（pCR）となり予後が良好であるが、化学療法に抵抗性の TNBC の場合予後が不良である。しかしながら化学療法反応性の TNBC を予測する指標は見出されていない。

2. 研究の目的

術前化学療法後、原発巣の切除が行われた TNBC につき、治療前のコア針生検標本の組織学的情報から化学療法に対する病理学的完全奏効予測マーカーを見出すことを目的とする。特に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）と組織型、basal-like マーカー発現と治療反応性との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

1999～2007 年の間に術前化学療法後、原発巣切除が行われた乳癌患者 474 名の中で TNBC は 102 例（22%）であったがその中で組織ブロックが得られ新たなエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2 の免疫染色もしくは FISH 法検査によって TNBC が確認された 92 例を対象とした。また、コントロール群としてホルモン受容体陰性・HER2 陽性（HER2 型）乳癌 42 例、ホルモン受容体陽性・HER2 陰性（luminal 型）乳癌 46 例を対象とした。コア針生検のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の HE 標本を検鏡し、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、組織型、グレード等を評価した。TIL の判定は浸潤癌周囲のリンパ球浸潤の程度から面積スコアを 0～3 点（0%、10%以下、>10～50%、>50%）と強度スコア 0～2 点（陰性、軽度、高度）に分け、それらの和が 3 点以上を TIL-high、2 点以下を TIL-low と判断した。また、治療前の腫瘍細胞のアポトーシ

スと化学療法反応性との関連を検討した。アポトーシスコアは、高倍 10 視野あたり 10 個以上の場合をスコア 2、5～9 個の場合をスコア 1、5 個未満をスコア 0 とした。さらに basal-like マーカー（EGFR、サイトケラチン 14、サイトケラチン 5/6）、p53 などの免疫組織化学的検討を行った。これらの所見や分子発現を半定量し、pCR との相関を統計学的に解析した。

4. 研究成果

TIL-high の例は TNBC の 67 例（73%）に見られたが、非 TNBC では 35%（31/88）で見られた。TNBC において TIL-low 群での pCR 率は 16%（4/25）にとどまったが、TIL-high の群では 37%（25/67）であった。同様に非 TNBC を含めた 180 例の検討において TIL-low 群での pCR 率は 10%（8/82）にとどまったが、TIL-high 群では 34%（33/98）であった。腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の程度が強い乳癌は化学療法に対する pCR 率が有意に高かった（TNBC で $p = 0.05$ 、全例で $p = 0.0001$ ）。

TNBC において、アポトーシスコア 2 の群 19 例においては 9 例（48%）に pCR が見られたのに対し、スコア 1 もしくは 0 の群 73 例においては 17 例（23%）が pCR を示し、アポトーシスコアが高い群に高頻度に pCR が認められる傾向を示した（ $p = 0.10$ ）。また非 TNBC コントロールを含む 180 例での検討では、アポトーシスコア 2 の群 40 例においては 14 例（35%）に pCR が見られたのに対し、スコア 1 もしくは 0 の群 140 例においては 27 例（19%）が pCR を示し、アポトーシスコアが高い群に高頻度に pCR が認められた（ $p = 0.04$ ）。

組織型は、TNBC では髄様癌/非定型髄様癌、中心部無細胞癌、化生を伴う癌、アポクリン癌が代表的とされるため、これらの組織型と化学療法反応性との関連を検討したところ、TNBC の中では髄様癌/非定型髄様癌とアポクリン癌における pCR 率が高い傾向にあり、

各々39% (9/23), 40% (2/5)であったのに対し、中心部無細胞癌、化生を伴う癌においてはTNBCの中で各々21%(4/19), 17%(1/6)と低い傾向があった。また、非TNBCにおいても髄様癌/非定型髄様癌とアポクリン癌はしばしばみられるが、非TNBCのこれらの組織型におけるpCR率も各々67%(2/3), 33%(3/9)と高い傾向にあった。

basal-like マーカー陽性乳癌(CK5/6, CK14もしくはEGFR陽性)はTNBCの59% (54/92)を占めた。一方、非TNBCコントロール88例では21例(24%)に見られた。Basal-likeマーカーの発現はTNBC群92例においても、またTNBC, 非TNBC合わせた180例においても化学療法効果予測因子として有意ではなかった。p53免疫染色についても検討したがpCRとの有意な相関は見られなかった。

TNBCは多彩な形態の癌種から構成されることから、上記の相関が組織型毎に成立つか否かを検討した。TNBCの組織型は優勢構造に基づき充実型(非定型髄様型や壊死を伴う例を含む)42例、硬癌型(中心部無細胞型を含む)33例、化生を伴う癌6例、アポクリン型5例、その他6例に分類した。充実型にてTILスコア0の8例にpCRを認めなかったが、TILスコア1, 2, 3の群では各々50%(7/14), 29%(5/17), 67%(2/3)でpCRがみられた。硬癌型でも同様にTILスコア0の13%(1/8)にpCRを認めたが、スコア1, スコア2の群では30%(6/20), 20%(1/5)の頻度であった。TILとpCRの関連はTNBCの主要な組織型では共通にみられることが示された。一方、化生を伴う癌(扁平上皮癌1, 基質産生癌2, 紡錘細胞癌3)ではTILスコア0, スコア2の例でのpCR率は25%(1/4), 0%(0/2)で、他の組織型とは異なりTILとpCRの関連は乏しいことが示唆された。予後との相関はeventが少なかつたこともあり、有意な結果を見出せなかった。

TILは癌細胞の化学療法反応性の一面を説明し得るが、それだけでは説明しきれないことも多く、今後、ゲノムの修復、間葉系マーカー発現等と免疫機構との組合せによってTNBCの化学療法感受性のマーカーを見出していくべきと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Chikako Shimizu, Masashi Ando, Kenji Tamura, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with three different cut-off values and histological

and nuclear grades in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. 査読有、Breast Cancer, in press

DOI 10.1007/s12282-013-0464-4

②Sota Asaga, Takayuki Kinoshita, Takashi Hojo, Junko Suzuki, Kenjiro Jimbo, Hitoshi Tsuda. Prognostic factors for triple-negative breast cancer patients receiving preoperative systemic chemotherapy. 査読有、Clinical Breast Cancer, 13巻1号、2013, pp. 40-46.

③Tomoya Nagao, Takayuki Kinoshita, Takashi Hojo, Hitoshi Tsuda, Kenji Tamura, Yasuhiro Fujiwara. The difference in the histologic types of the breast cancer and the response to primary systemic chemotherapy: clinicopathological characteristics and relation with outcome. 査読有、Breast, 21巻3号、2012, pp. 289-295.

④Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Chikako Shimizu, Sohei Yamamoto, Tatsuhiro Shibata, Harukaze Yamamoto, Taizo Hirata, Kan Yonemori, Tsutomu Kouno, Masashi Ando, Kenji Tamura, Noriyuki Katsumata, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara. Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. 査読有、Breast Cancer Research and Treatment, 132巻3号、2012, pp. 793-805.

⑤Shigeto Ueda, Hitoshi Tsuda, Toshiaki Saeki, Kazuhiko Fukatsu, Akihiko Osaki, Takashi Shigekawa, Jiro Ishida, Katsumi Tamura, Yoshiyuki Abe, Jiro Omata, Tomoyuki Moriya, Junji Yamamoto. Early reduction in standardized uptake value after one cycle of neoadjuvant chemotherapy measured by sequential DG PET/CT is an independent predictor of pathological response of primary breast cancer. 査読有、Breast Journal, 16巻6号、2010, pp. 660-662.

⑥Takayuki Kobayashi, Hitoshi Tsuda, Tomoyuki Moriya, Tamio Yamasaki, Ryoko Kikuchi, Shigeto Ueda, Junji Yamamoto, Osamu Matsubara. Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. 査読有、Breast Cancer Research and Treatment, 123巻3号、2012, pp. 733-745.

〔学会発表〕（計 6 件）

①津田 均. Intrinsic subtype 分類の病理学的考え方 (Histological significance of intrinsic subtype classification). 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会、国内合同シンポジウム、2012 年 7 月 26 日～28 日、大阪.

②神谷有希子、吉田正行、麻賀創太、神保健二郎、鈴木純子、北條隆、木下貴之、津田均. 乳癌紡錘細胞癌の病理学的リスク因子の検討. 第 20 回日本乳癌学会学術総会、2012 年 6 月 28 日～30 日、熊本.

③小野麻紀子、津田均、清水千佳子、温泉川真由、米盛勸、安藤正志、田村研治、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘. リンパ節転移陰性 luminal 乳癌の予後について. 第 19 回日本乳癌学会学術総会、2011 年 9 月 2～4 日、仙台.

④ Ono Makiko, Hitoshi Tsuda, Chikako Shimizu, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Masashi Ando, Kenji Tamura, Noriyuki Katsumata, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara. Long-term prognostic factors of node-negative invasive breast cancer of luminal subtype: A comparison between histological grades and molecular markers including Ki67 and HER2 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011 年 7 月 21～23 日、横浜.

⑤小野麻紀子、津田均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、米盛勸、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘. トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) における病理学的治療効果予測因子. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22～24 日、大阪.

⑥小野麻紀子、津田均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、平田泰三、米盛勸、河野勤、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘. トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) における病理学的治療効果予測因子：組織亜型と腫瘍浸潤リンパ球 (TIL). 第 18 回日本乳癌学会学術総会、2010 年 6 月 24～25 日、札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 均 (TSUDA HITOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号：70217321

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし