

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 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591421

研究課題名（和文） トリプルネガティブ乳癌の生物学的特性解明と治療戦略の構築

研究課題名（英文） Elucidation of the biological properties of triple negative breast cancer and construction of a therapeutic strategy

研究代表者

石田 孝宣（ISHIDA TAKANORI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00292318

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳癌は、高度な組織学的異型度、脈管侵襲、血管新生能、増殖能を有していた。また、最大浸潤径、リンパ節転移状況、Basal type、Ki-67 labeling index、Microvessel Density の5つの予後予測因子に基づいたリスクスコアシステムにより、low, intermediate, high score の3群に分類することができた。この予後予測モデルによる3群間で有意に生存率が異なっていた。結論として、このリスク分類がトリプルネガティブ乳癌の治療選択に有用であった。

研究成果の概要（英文）：Triple negative breast cancer observed high histological grade, further vascular invasion, high vascularization and proliferation potential. Results of our study demonstrated that triple negative breast cancer could be further sub-classified into three different groups (low, intermediate, high) according to the Risk Score System evaluating the following five prognostic variable (pathological tumor size, pathological node status, basal-like type, Ki67 labeling index and Microvessel Density). Difference was observed in the survival rate significantly in these three groups. In conclusion, this classification is useful as a therapeutic decision-making tool for triple negative patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：乳腺外科学

キーワード：乳癌、トリプルネガティブ、リスクスコア

1. 研究開始当初の背景

わが国では乳癌の罹患率、死亡率ともに上昇し続けており、特に年齢階級別死亡率では女性の30-64歳で第1位となっている。現在、乳癌においてその発生・増殖に関与する主要な因子として、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)が挙げられており、これら受容体を標的とした薬剤での治療が可能となったことが、予後の改善に大いに寄与している。

しかし一方で、これら3因子のいずれも発現しない乳癌(ER陰性/PgR陰性/HER2陰性)、いわゆるトリプルネガティブ乳癌が存在し、乳癌全体の約15%を占めている。トリプルネガティブ乳癌は他の乳癌に比べて若い世代に多くみられ、臨床経過は予後不良である。再発までの期間は1~3年と早く、遠隔転移を来しやすいことが報告されている。また、治療標的が無いために、化学療法が唯一の治療法であるが、トリプルネガティブ乳癌の中にも明らかに性質の異なるタイプが存在していると推察されるが、どのような症例で化学療法が有効であるかの詳細な検討はなされていない。

また、遺伝子発現プロファイリングによれば、基底細胞型とされた乳癌の多くは、ER、PR、HER2の発現を欠いており、またCK5/6およびCK17の発現、上皮成長因子受容体(EGFR)の発現を特徴としていた。しかし、トリプルネガティブ乳癌のすべてがこの基底細胞型ではなく、重複する部分はあるものの同義ではないと報告されている。

以上のように、トリプルネガティブ乳癌は一樣ではなく、その中には複数のタイプが混在しており、それぞれが異なった臨床動態を示すと考えられる。しかし、それらの細分化

はいまだなされておらず、その発生のメカニズムや増殖に関与する因子も不明である。

2. 研究の目的

(1) 臨床病理学的因子を中心に、トリプルネガティブ乳癌の生物学的特性を明らかにする事によって、その発生・増殖のメカニズムを解明し、トリプルネガティブ乳癌の細分化を目的とした検討を行う。

(2) 各因子と健存率、生存率、転移形式との相関について検討を行い、予後との相関がみられた因子をスコア化し、複数の予後規定因子によるリスク分類を確立する。

(3) トリプルネガティブ乳癌の生物学的メカニズムと治療標的を明らかにするとともに、その特性を基にトリプルネガティブ乳癌のサブタイプ、スコア別の治療法を開発し、予後の改善につなげる。

3. 研究の方法

(1) 発生・増殖のメカニズムを解明し、予後規定因子、リスク分類を確立するために、トリプルネガティブ乳癌症例を収集し、患者背景因子、臨床病理学的因子に加え、腫瘍増殖因子、血管新生因子、基底細胞(筋上皮)への分化、間葉系への分化を標的に免疫組織学的検討を行う。

(2) 治療効果予測因子を明らかにするために、上記の因子の発現率、実際の治療内容、転移・再発の有無、転移形式、および臨床経過、転帰をもとにスコア化し、多変量解析にて予後との相関を検討する。さらに、これらのスコアに基づき、トリプルネガティブ乳癌をサブグループに分類する。

(3) これらのサブグループにおける生物学的特性を明らかにし、それぞれに適した治療法を開発することで、トリプルネガティブ乳癌の予後改善につなげる。

4. 研究成果

(1) ①1998年1月から2007年12月に東北大学病院乳腺・内分泌外科で手術を施行した遠隔転移を伴わない原発性乳癌841例に対して、パラフィン包埋ブロックから薄切標本を作製し、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色と免疫染色(ER, PgR, HER2)を行った。その結果、642例(76.3%)がホルモン受容体(ER, PgR)陽性乳癌、138例(16.4%)がHER2陽性乳癌、118例(14.0%)がトリプルネガティブ乳癌(ER, PgR, HER2いずれも陰性)であった。更に、118例のトリプルネガティブ乳癌の中で、生物学的特徴や臨床動態、予後が大きく異なる非浸潤性乳管癌、アポクリン癌、髄様癌を除外した102例を本研究の対象とした。

②HE染色にて最大浸潤径を評価したところ、0-20mmが54例(53%)、21-30mmが18例(18%)、31-50mmが21例(21%)、51mm以上が9例(9%)、中央値は18mmであった。これは、同時期の全乳癌における最大浸潤径中央値14mmと比較し有意に高い値であった。また、Nottingham分類に基づいた組織学的異型度は、Grade Iが5例(5%)、Grade IIが32例(31%)、Grade IIIが65例(64%)であり、同時期の全乳癌における組織学的異型度分布：Grade I 30%、Grade II 49%、Grade III 21%と比較し、トリプルネガティブ乳癌では多くの症例が高い生物学的悪性度を有していた。

③脈管侵襲はD2-40染色を行い評価したところ、39例(38%)で中等度以上の脈管侵襲が認められた。また、血管新生能評価目的にCD31染色を行い、Microvessel Densityを計数した。その結果、48例(47%)が20以上の高値を示しており、約半数の症例で高い血管新生能を有していた。

④各種の増殖マーカーの免疫染色を行ったところ、最も客観的かつ定量的評価が可能であったのはKi-67染色であった。1000細胞で

計数したKi-67 labeling indexは、0-15%が18例(18%)、16-30%が25例(24%)、31-40%が11例(11%)、41-100%が48例(47%)、中央値は37%であり、30%以上の高い腫瘍増殖能を有する症例が約6割に認められた。

⑤トリプルネガティブ乳癌の基底細胞への分化を評価するために、CK5/6, CK14, CK17, p63, CD10, EGFR染色を行った。その結果、CK5/6は60例(59%)で陽性、EGFRは36例(35%)で陽性であり、CK14, CK17, p63, CD10陽性症例では全ての症例が、CK5/6もしくはEGFR陽性となっていた。よって、ここではCK5/6, EGFRのいずれかが陽性である事で基底細胞型と定義し、それによると67例(66%)が基底細胞への分化を有していた。

(2) (1)の結果によって得られた臨床病理学的因子と、実際の臨床動態、予後との関連性を明らかにするために、これらの102症例に対して診療録・臨床データベースをもとに、患者背景因子(年齢、乳癌既往歴、家族歴、閉経前後)、術前・術後薬物治療(化学療法、内分泌療法)の有無、手術術式、再発の有無・時期、再発後治療、転帰に関して情報を集積し、転帰等で不明な部分に関しては電話調査にて補足した。

①診断時年齢中央値は56(30-81)歳、閉経後乳癌が62例(61%)と半数以上であった。家族歴は12例(12%)に認められ、諸家の報告による日本人女性の乳癌全体における家族歴保有率と比較しやや高い傾向にあった。手術術式は乳房温存手術、乳房切除術が半数ずつみられ、全例に術前もしくは術後の薬物治療が行われていた。

②術後観察期間(7-146カ月、中央値68.5カ月)内に、37例に再発が認められ、28例が死亡していた。これらの再発・死亡イベントに対して、それぞれの臨床病理学的因子の予後予測因子としての意義をCox proportional

hazard model を用いて単変量解析したところ、最大浸潤径、リンパ節転移状況、脈管侵襲、Basal type、Ki-67 labeling index、Microvessel Density が有意に再発・死亡イベントと関連していた。一方、年齢、組織学的悪性度、他のバイオマーカーは予後との関連性は認められなかった。統計学的に有意であった因子に対して多変量解析を行ったところ、最大浸潤径、リンパ節転移状況、Basal type、Ki-67 labeling index、Microvessel Density は独立した因子として有意であった。③以上の5因子に対して、それぞれの因子が予後に与えるハザード比を元にリスクスコアを定義し、そのリスクスコアの合計値を各症例の有するリスクスコアと定義した。これらの統計学的手法は、循環器領域での急性心筋梗塞予測モデル、乳癌領域での術前内分泌療法後の予後予測モデルを応用する形で解析した。その結果、102例のリスクスコアは最小値0、最大値13となり、乳癌死リスク分類として、スコア0-3のlow risk群が29例、スコア4-7のintermediate risk群が34例、スコア8以上のhigh risk群が39例との結果であった。予後をみていくと、Low risk群の5年生存率は100%、10年生存率は95%、Intermediate risk群の5年生存率は85%、10年生存率は75%、high risk群の5年生存率は52%、10年生存率は29%との結果であり、3群で有意に生存率が異なっていた。

(3)トリプルネガティブ乳癌の予後規定因子をスコア化することにより、リスク分類を確立した。この結果から、low risk群に対しては化学療法に基づいた現行の治療法は効果が十分である事が証明された。一方intermediate risk群、high risk群に関しては現在の治療法では不十分であることが判明した。現行の化学療法に加えて、分子標的薬を基盤とした血管新生阻害剤、mTOR阻害

剤、PARP阻害剤などの新規治療法の早急な導入とevidenceの構築が必要と考えられる。

ベースラインリスクがある程度明らかになった現在、標的の解明とそれに対する新規治療法の併せた開発が課題である。

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 4 件)

(1) McNamara K, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, Kongdan Y, Wang L, Takagi K, Mayu T, Nakamura Y, Suzuki T, Nemoto N, Miyashita M, Tamaki K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumours: its correlation with tumour cell proliferation. *Cancer Sci*. There is peer review. doi:10.1111/cas.12121. [Epub ahead of print] 2013 Feb1.

(2) Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, Amari M, Tadano-Sato A, Takahashi Y, Watanabe M, McNamara K, Ohuchi N, Sasano H. Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer*, There is peer review. PMID:22782361

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 2012 Jul 11.

(3) Miyashita M, Ishida T, Ishida K, Tamaki K, Amari M, Watanabe M, Ohuchi N, Sasano H. Histopathological subclassification of triple negative breast cancer using prognostic scoring system: five variables as candidates. *Virchows Arch*. There is peer review. 458(1): 65-72. 2011.

(4) Matsubara Y, Sakabayashi S, Nishimura T, Ishida T, Ohuchi N, Teramukai

S, Fukushima M. Surrogacy of tumor response and progression-free survival for overall survival in metastatic breast cancer resistant to both anthracyclines and taxanes. *Int J Clin Oncol*. There is peer review. 16 (6): 623-629, 2011.

[学会発表] (計 6 件)

(1) 宮下穰、石田孝宣、大内憲明、他、トリプルネガティブ乳癌における臨床病理学的検討ならびに治療戦略、第 50 回日本癌治療学会学術集会、2012 年 10 月 26 日、横浜

(2) 宮下穰、石田孝宣、渡辺みか、大内憲明、他、Nano-imaging の病理組織検査への応用：新規 HER2 診断法の可能性、第 20 回日本乳癌学会、2012 年 6 月 28 日、熊本

(3) Miyashita M, Ishida T, Ohuchi N, et al. Histopathological Subclassification of Triple Negative Breast Carcinoma Using Prognostic Scoring System, 33rd annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 15/ Dec. 2011, San Antonio, USA

(4) 宮下穰、石田孝宣、渡辺みか、大内憲明、他、蛍光ナノ粒子を用いた定量的免疫組織化学法による HER2 診断法、第 19 回日本乳癌学会、2011 年 9 月 2 日、仙台

(5) 宮下穰、石田孝宣、大内憲明、他、トリプルネガティブ乳癌に対する病理組織学的層別化、第 69 回日本癌学会、2010 年 9 月 22 日、大阪

(6) 宮下穰、石田孝宣、大内憲明、他、内分泌感受性別にみた HER2 陽性乳癌の臨床病理学的検討、第 18 回日本乳癌学会、2010 年 6 月 25 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 孝宣 (ISHIDA TAKANORI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00292318

(2) 研究分担者

大内 憲明 (OHCHI NORIAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50400312

梅田 (渡辺) みか (WATANABE MIKA)
東北大学・病院・准教授

研究者番号：20292344

(3) 連携研究者

宮下 穰 (MIYASHITA MINORU)
東北大学・病院・助教

研究者番号：60710788