

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590388

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌の発生進展とLAT1発現 分子治療の可能性

研究課題名(英文)LAT1 expression and triple negative breast cancer

研究代表者

小山 徹也(OYAMA, TETSUNARI)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50233622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Triple negative (以下TN)乳癌の発生・進展とその治療に関する研究の重要性が高まっている。アミノ酸トランスポーター、LAT1/CD98の発現は、HER2およびTN type1において発現率が高く、ER/PgRと逆相関した。TN type1において、5年生存率はCD98/LAT1共陽性例において有意に悪かった。Tissue microarray (TMA)を用いた検討では、LAT1発現はstem cell marker CD44、CD24と相関をした。すなわちLAT1/CD98発現とTN乳癌の発生進展との関係が示唆され、TN乳癌発生のstem cellが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of amino acid transporter, LAT1/CD98 was examined in various breast cancer, because the importance of clarify the carcinogenesis and progression of the triple negative breast cancer (TNBC) is increasing. The positive ratio of LAT1 expression in luminal A cases was 7.9%, 30.0% in luminal B cases, 71.4% in HER2 cases and 64.0% in TN cases. HER2 and TN subtypes expressed LAT1 and CD98 at higher levels than luminal A and B subtypes. LAT1 and CD98 expression correlated with tumor size, nuclear grade and Ki67 labeling index. LAT1 and CD98 expression was negatively associated with ER and PgR. Multivariate analysis confirmed that CD98+ or LAT1+/CD98+ expression were risk factors for relapse in TNBC. LAT1 expression is correlated with stem cell marker, CD44 and CD24 by immunohistochemical examination, using tissue microarray. Thus, in our study we clarify the importance of LAT1 and CD98 in carcinogenesis and progression of TNBC and it might be related with stem cell.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 人体病理学

キーワード：triple negative breast cancer LAT1 CD98 EGFR ductal component amplification

## 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、乳癌発生の機構を解し、その早期病変を認識することが、わが国乳癌診療の大きなポイントであるという立場で、ER 陽性非浸潤性乳管癌の発生に関する研究を継続して進めてきた。現在**トリプルネガティブ乳癌 (triple negative 以下 TN 乳癌)**の発生・進展とその治療に関する研究の重要性が高まっている。我々は早くからこの問題に注目し、TN乳癌の多様性について気づいていた。もともとマイクロアレイによる解析によって Perouらによって分類された乳癌の分類のうち Basal-like breast cancer として提唱されたもので、basal type の cytokeratin である keratin 5/6 の発現が特徴である。しばしば ER/PgR/HER2 (Triple negative 以下 TN 乳癌)であり、増殖因子である EGFR の発現が見られるとされる。また病理組織学的には(異型)髄様型の腫瘍が多いとの報告がある。しかしこれらのTN乳癌には必ずしも basal-like でなく、多様な腫瘍を含んでいると考えられる。そこで、この多様な腫瘍を大きく2つの切り口からこの問題に取り組んできた。

1. TN乳癌の発生、進展に関わる本質的に重要な因子、治療にまで還元しうる重要な因子は何か？

2. 病理組織学的見地から見た、triple negative 乳癌の組織学的特徴は何か？また TN乳癌を組織発生や臨床病理学的な立場から亜分類可能か？

そこで、今回は特に TN 乳癌発生、進展にかかわる因子として、癌関連アミノ酸トランスポーターである **LAT1 (L-type amino acid transporter 1)** および関連蛋白(ヘテロダイマー形成 heavy chain) CD98 に注目していた。

## 2. 研究の目的

- (1) 目的の1つは TN 乳癌と一括されるものの中を、特に組織亜型により個別化して悪性度や治療感受性を検討するものである。乳管内成分も含めた初期病変の解析は、いつから TN 癌となるか、発生機構解明の一助になる可能性が高い。
- (2) もう1つは EGFR や P53 といたこれまで報告された増殖因子、癌遺伝子に加えて、我々はアミノ酸トランスポーターである LAT1 が、TN 乳癌に高率に発現するという知見を得つつある点を踏まえ、さらに TN 乳癌における LAT1 発現と関連するシグナル系の解明するものである。このことは TN 乳癌の発生進展だけでなく、新たな診断、治療法への展開も期待される。
- (3) さらに我々は癌幹細胞に注目して、stem cell marker の発現と LAT1 の関係について検討する。特に CD44 のバリエーション形式(CD44v)による酸化ストレス抵抗性促進機構が報告され、CD44v は、CD98 と結合する酸性アミノ酸輸送系に属する xCT を安定化させ

ることでその機能を発揮する。この他 stem cell marker である ALDH1 や CD24 についても検討した。この検索は、予後解析も行う目的で Tissue microarray (TMA) 標本を用いて免疫組織学的手法で検討した。TN 乳癌の新たな特徴が見出される可能性がある。

## 3. 研究の方法

- (1) 群大病院において、Triple negative 浸潤癌 (以下 TN 乳癌) 約 100 例の外科手術材料について検討した。組織亜分類として、通常型の浸潤性乳管癌(type C)、乳癌特殊型(type D)に加えて、異型髄様型(type A)や中心無細胞型(type B)の大きく4分類にわけて比較し、その他 Basal type (EGFR や keratin14 陽性) と unclassified type (同陰性)に分けた比較などを行った。またそれぞれの癌を浸潤部分(iIC)と、付随する乳管内成分(dIC)に分けてその性格を検討した。
- (2) 50例のTN乳癌含む約120例のホルマリン固定パラフィン包埋材料による組織学的免疫組織学的検討を行った。CD98及びモノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用してLAT1蛋白発現を検索した。このほか抗体はER/PgR/HER2/EGFRに加えてbasal-markerであるkeratin 5/14及びそのほかp53、MIB1について、自動免疫染色装置 (Ventana benchmark) を使用して染色した。TN乳癌とその対照として Luminal A, B, HER2 type乳癌も加えた。予後についても検討した。
- (3) 1999年から2002まで10生存率の解析可能な乳癌のうち、十分材料の得られた約200例の連続した組織ブロックからTMA標本作製した。免疫組織学的方法(ポリマー法、LSAB法)でTMA標本から発現を検討した。使用した抗体はER、PgR、HER2、Ki67に加え、乳癌幹細胞マーカーとしてALDH1、CD44、CD24、アミノ酸トランスポーターとしてLAT1、CD98である。それぞれの発現の相互関係や予後との関係を検討した。Disease free survival (DFS)および Overall survival (OS)はKaplan-Meier methodで検討した。

## 4. 研究成果

- (1) TN乳癌では、乳管内成分は少なく、特に異型髄様型(A)ないし中心無細胞型(B)で、有意に少なかった。TN浸潤癌で乳管内が non-TN細胞なものは6%で、その大部分が通常型乳癌であった(表1)。また中心無細胞型(B)において、OSが有意に低かった(図1)。

表1(上) 図1(下) (雑誌論文 より)

	dcI	ilC	n	%
ER	(+)	(-)	5	5.2
	(-)	(-)	24	24.7
PR	Does not exist	(-)	68	70.1
	(+)	(-)	1	1.0
HER2	Does not exist	(-)	28	28.9
	(+)	(-)	68	70.1
EGFR	(-)	(-)	1	1.0
	Does not exist	(-)	28	28.9
	(+)	(+)	7	7.2
	(-)	(+)	13	13.4
	(-)	(-)	9	9.3
	Does not exist	(-)	68	70.1

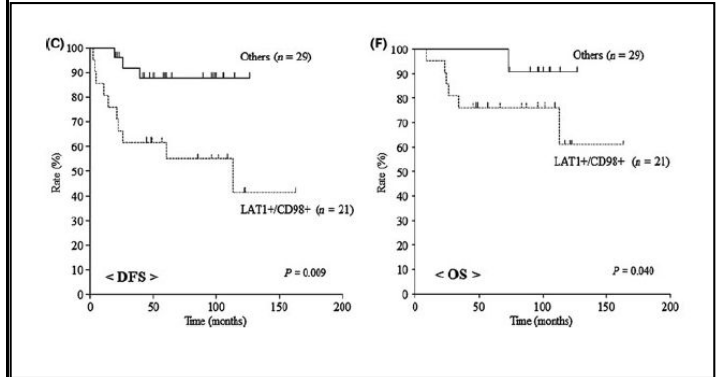
Bold value, ER, PR, HER2 and EGFR expressions were not consistent between dcI and ilC. ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor.

(2) LAT1発現頻度はluminal A,B typeの乳癌に比較して、TN乳癌で有意に高かった(表2)。TN乳癌の中でもCD98陽性ないしCD98とLAT1両方陽性のは、有意にOS、DFSが低かった(図2)。多変量解析でも、CD98及びLAT1陽性は有意に予後不良因子であった。

表2 (雑誌論文 より)

Subtype	n	LAT1 score					LAT1+ (%)
		0	1	2	3	4	
All cases	129	46	27	22	17	17	56 (43.4)
Luminal A	38	31	4	1	1	1	3 (7.9)
Luminal B	20	9	5	3	2	1	6 (30.0)
HER2	21	2	4	2	6	7	15 (71.4)
TN	50	4	14	16	8	8	32 (64.0)

図2 (雑誌論文 より)



(3) 乳癌症例は Intrinsic subtype では、Luminal A 63%、Luminal B 9%、HER2 13%、TNBC 14%であった。発現率はLAT1 64%、CD98 65%、ALDH1 6%(その中で subtype 別ではHER2 typeで19%、TNBCで18%と相対的に高い)、CD44 27%、CD24 14%であった(表3)。LAT1発現とCD98とCD24,44に相関がみられた(図6)。アミノ酸トランスポーターのLAT1発現陽性例ではDFSで予後不良因子であった。Stem cell markerと予後との関係は明らかでなかった。

表3 (雑誌論文 より) アミノ酸トランスポーター、Stem cell marker と intrinsic

	LAT1	CD98	ALDH1	CD44	CD24	CD44+CD24-
luminal A	47.6%(59/124)	55.6%(69/124)	0.8%(1/124)	25.0%(31/124)	8.9%(11/124)	21.0%(26/124)
luminal B	88.8%(16/18)	66.7%(12/18)	5.6%(1/18)	38.9%(7/18)	16.7%(3/18)	44.4%(8/18)
HER2	92.3%(24/26)	96.2%(25/26)	19.2%(5/26)	23.1%(6/26)	30.8%(8/26)	15.4%(4/26)
TNBC	92.9%(26/28)	78.6%(22/28)	17.9%(5/28)	32.1%(9/28)	17.9%(5/28)	17.9%(5/28)
P=	<0.01	<0.01	<0.01	0.52	<0.05	0.13

subtype

表4 (雑誌論文 より)

LAT1発現とstem cell markerとの相関

Variable	LAT1 発現	
	Spearman $\gamma$	P=
CD98	0.631	<0.01
ALDH1	0.094	0.10
CD44	0.124	<0.05
CD24	0.176	<0.01

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)

半田正、本田周子、矢島尚生、片山彩香、井出宗則、時庭英彰、堀口淳、金井好克、小山徹也 Tissue microarray を利用した乳癌の Stem cell marker 及びアミノ酸トランスポーター発現の検討 乳癌基礎研 (*in press*)

Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, Sano T, Ohno Y, Horiguchi J, Oyama T. Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2014 ;21(1):66-74.

doi: 10.1007/s12282-012-0354-1.

Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci*. 2012 ;103(2):382-9.

doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02151.x

Ishikawa Y, Horiguchi J, Toya H, Nakajima H, Hayashi M, Tagaya N, Takeyoshi I, Oyama T.

Triple-negative breast cancer: histological subtypes and immunohistochemical and clinicopathological features. *Cancer Sci*. ;102(3):656-62. 2011

doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01858.x

〔学会発表〕(計5件)

半田正、本田周子、小山徹也 他 Tissue microarray を利用した乳癌の Stem cell marker 及びアミノ酸トランスポーター発現の検討 第22回乳癌基礎研究会 2013年7月21日 三重

半田正、古谷未央、小山徹也 他 乳癌特に TNBC における Aquaporin の発現 第102回日本乳癌学会総会 2013年6月6日 札幌

片山彩香、中島弘樹、小山徹也 他 Triple-negative 乳癌における EGFR タンパク発現と遺伝子異常の検討 第101回日本乳癌学会 2012年4月28日 東京

Nakajima H, Ishikawa Y, Oyama T et al. Dual color in situ hybridization and mutational analysis of triple negative breast cancer with EGFR protein overexpression. EBCC8 22th March 2012, Vienna, Austria

小山徹也、片野未央、堀口淳 他 乳癌における Ki-67 の検索の諸問題 第100回日本病理学会総会 2011年4月29日 横浜

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 徹也 (OYAMA TETSUNARI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50233622