

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590439

研究課題名(和文) 癌間質の組織形態像並びに生物学的性状に基づく癌悪性度評価

研究課題名(英文) The assessment of malignant degree of carcinoma based on histological and biological factors of carcinoma.

研究代表者

長谷部 孝裕 (Hasebe, Takahiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00250209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌腫瘍間質線維芽細胞におけるp53蛋白発現、リンパ管腫瘍塞栓異型度(Ly-Grade)、乳癌異型腫瘍間質線維芽細胞、リンパ節転移腫瘍核分裂数は乳癌患者の予後因子となることを報告してきた。さらに研究を展開し、異型腫瘍間質線維芽細胞とリンパ管腫瘍塞栓異型度は、予後の中でも、乳癌患者の局所再発と密接に関係することを明らかとした。加えて、静脈腫瘍塞栓異型度(BV Grade)を新たに提唱した。BV Gradeは、今までに我々が報告したFibrotic focus (FF)、異型腫瘍間質線維芽細胞、Ly Gradeに勝るとも劣らない、病理組織学的予後因子であることを、世界で始めて明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The present study clearly demonstrated that the best factor for accurately predicting locoregional recurrence was grade 3 lymph vessel tumor embolus, followed by type 2 invasive ductal carcinoma, grade 2 lymph vessel tumor embolus, primary invasive tumor cell-related factors and >5 mitotic figures in metastatic carcinomas to the lymph node. We classified 263 invasive ductal carcinomas into the following three grades according to the numbers of mitotic and apoptotic figures in tumor cells located in blood vessels within 1 high-power field: grade 0, grade 1, and grade 2. Multivariate analyses with well-known prognostic factors demonstrated that grade 2 blood vessel tumor emboli significantly increased the hazard ratios for tumor recurrence independent of the nodal status, pathological TNM stage, hormone receptor status or HER2 status.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 癌間質 癌悪性度 異型腫瘍間質線維芽細胞 リンパ管腫瘍塞栓 静脈腫瘍塞栓

### 1. 研究開始当初の背景

我々は腫瘍間質成分の生物学的性状が癌の増殖・進展に密接に関係することを以前より指摘し、殊に浸潤性乳管癌におけるFibrotic focus (FF、線維化巣)に着目し研究を行ってきた。FFの存在は浸潤性乳管癌患者の短期・長期予後と密接に関係する組織形態学的因子であり(Hasebe T, et al. Jpn J Cancer Res 1996;87:385-94、Hasebe T, et al. Breast Cancer Res Treat 1998;49:195-208、Hasebe T, et al. Mod Pathol 2002;15:502-16、Hasebe T, et al. Hum Pathol 2008;39:681-93)、FFを有する浸潤性乳管癌はFFを有さない浸潤性乳管癌に比べ、腫瘍内血管新生が有意に高いことを明らかとした(Jitsuiki Y, Hasebe T, et al. Mod Pathol 1999;12:492-8)。FFの予後因子としての重要性は、欧米施設においても確認され(Colpaert C, et al. Histopathology 2001;39:416-25、Colpaert C, et al. J Pathol 2001;193:442-9、Colpaert C, et al. Breast Cancer Res Treat 2003;81:137-47、Baak JPA, et al. Eur J Cancer 2005;41:2093-101)、腫瘍内血管新生にも密接に関係することが確認された(Colpaert C, et al. J Pathol 2001;193:442-9、Van den Eynden GG, et al. Br J Cancer 2005;93:1128-36)。さらにリンパ節転移陰性浸潤性乳管癌において、FFの存在は低酸素関連遺伝子、リンパ管・血管新生関連遺伝子、予後不良規定遺伝子の発現と密接に係ることがcDNAマイクロアレイ解析により明らかとなった(Van den Eynden GG, et al. Clin Cancer Res 2008;14:2944-52)。我々は、この後、腫瘍間質線維芽細胞において、p53蛋白発現を示す線維芽細胞が重要な予後因子となること(Hasebe T, et al. Cancer Sci 2009;100:2101-2108、Hasebe T, et al. Hum Pathol 2010;41:262-270、Hasebe T, et al. Mod Pathol 2010;23:662-672)、並びに異型腫瘍間質線維芽細胞 (Atypical tumor-stromal fibroblast, ATF) が、術前薬物療法の有無に関係なく浸潤性乳管癌の重要な組織学的予後因子となることを明らかとし(Hasebe T, et al. Am J Surg Pathol 2011;35:325-336、Hasebe T, et al. Hum Pathol 2011;42:998-1006)、ATFは、非ATFに比べ、p53蛋白の発現が有意に高いことも報告した。

次に、脈管内癌成分及びリンパ節転移癌成分の癌悪性度評価における重要性について研究を行い、リンパ管腫瘍塞栓異型度(Ly-Grade)を提唱し、Ly-Gradeは、術前薬物療法の有無を問わず、極めて有用な乳管癌患者の予後因子となることを明らかとした(Hasebe T, et al. Hum

Pathol 2010;41:706-715、Hasebe T, et al. Mod Pathol 2010;23:581-592)。また、リンパ節転移腫瘍の核分裂像の有用性を報告した(Hasebe T, et al. Hum Pathol 2011;42:1823-1832)。さらに、乳管癌患者の極めて重要な予後因子として、静脈腫瘍塞栓異型度を提唱した(Sugiyama M, Hasebe T, et al. Hum Pathol 2015.46:906-916)。

### 2. 研究の目的

- 1) 腫瘍細胞、腫瘍間質細胞の生物学的性状の検討
- 2) 腫瘍細胞の腫瘍間質細胞化生の臨床病理学的意義の検討
- 3) Stem cell関連因子発現の検討
- 4) 腫瘍間質性状の相違に基づくプロテオーム解析

### 3. 研究の方法

- 1) 病理組織形態像を中心とする検討  
H24-25年6月末までは、2000~2005年において、国立がんセンター中央病院で手術された浸潤性乳管癌1,368症例を対象とし、H25年7月からH26年3月末までは、埼玉医科大学国際医療センターで手術された263例を対象とした。評価対象成分は原発癌組織、脈管内癌組織、リンパ節転移癌組織の3癌組織成分である。各成分において既知乳癌病理組織学的因子に加え、腫瘍間質性状であるFibrotic focus (FF)、腫瘍間質細胞化生、及びリンパ管腫瘍塞栓組織異型度(Ly-Grade)を評価し予後との相関を調べると共に、新たに静脈腫瘍塞栓異型度(BV Grade)を提唱し、BV Gradeが浸潤性乳管癌患者の転帰を正確に推測する上で、有用な組織学的因子となるか否か、検討を加える。
- 2) 腫瘍細胞・腫瘍間質細胞の生物学的性状相違の有無についての検討
  - (1) 増殖因子蛋白・増殖因子受容体蛋白: HGF/HGFR、FGF/FGFR、PDGF/PDGFR、EGF/EGFR等
  - (2) 腫瘍・腫瘍抑制遺伝子蛋白: nm23、c-fos、c-jun、c-myc、Fascin等
  - (3) 細胞周期調節蛋白: Skp2、p27、Cyclin-D1、Cyclin-E、Kruppel-like factor (KLF5)等
  - (4) ケラチン蛋白発現: CK5/6、CK8/18、34betaE12等
- 3) 腫瘍間質細胞化生の臨床病理学的意義の検討
  - (1) FFを含む腫瘍間質において、腫瘍細胞間質細胞化生像を示唆する所見があるか否か HE で観察する。
  - (2) 免疫組織化学による検討: 間質細胞化生を示す腫瘍細胞におけるKeratin、間葉系蛋白発現、接着因子蛋白発現などを検討することにより、

間質細胞化生をより客観的に評価する。

- 4) Stem cell 関連因子蛋白発現の検討  
原発癌組織、リンパ管内癌組織、リンパ節転移癌組織において腫瘍細胞、腫瘍間質に分け、下記に記す Stem cell marker の発現の有無を免疫組織染色により比較検討する。
- 5) 腫瘍間質性状の相違に基づくプロテオーム解析  
(1) 蛍光二次元電気泳動法  
(2) Western blotting 法：約 1000 種類の市販抗体を用いて発現および翻訳後修飾の定量的比較解析を行う。

#### 4. 研究成果

国立がん研究センターで手術切除された、1042 例の浸潤性乳管癌症例を対象とし、層別化検討(リンパ節転移、pTNM、術後薬物療法)を行い、初回臓器特異的再発(遠隔臓器、骨、肺、肝、局所再発)と密接に相関する組織因子を解明した。検討因子は既知及び我々提唱因子 (Fibrotic focus、異型線維芽細胞、静脈腫瘍塞栓アポトーシス、リンパ管腫瘍塞栓異型度、リンパ節転移腫瘍核分裂数等)であり、各因子をグループ(G)化 (臨床病理学因子 G、原発浸潤癌因子 G、腫瘍間質線維芽細胞因子 G、脈管腫瘍塞栓因子 G、リンパ節転移因子 G) し、多変量解析にて検討した。結果：遠隔臓器転移と最も密接に相関した G は、腫瘍間質線維芽細胞 G であり、骨転移、肺転移、局所再発の有意な指標ともなった。次いで、脈管腫瘍塞栓因子 G、リンパ節転移因子 G であり、両者は骨、肺、肝転移とも有意に相関し、特に前者は局所再発とも密接に相関した。結論：IDC の臓器転移再発を正確に推測する上で、我々提唱の因子は既知因子に比べ、優位であることを明らかとした。

次に、埼玉医科大学国際医療センターで手術された 263 例の浸潤性乳管癌 (IDC) 症例を対象とし、静脈腫瘍塞栓異型度 (BV-Grade) を考案し、BV-Grade が IDC 患者の初回再発 (TR) の有意な組織学的指標となるか否か、既知臨床病理学的因子との多変量解析による subgroup 解析 (リンパ節転移、pTNM、luminal B subtype) により解明した。BV-Grade は静脈腫瘍塞栓細胞の核分裂数 (MF) 及びアポトーシス数 (AF) により規定し、静脈侵襲陰性例を BV-Grade 0、陽性例を 1 (低悪性度：MF、AF 共に低値)、2 (高悪性度：MF、AF 共に高値) とした。検討の結果、BV-Grade 0、1、2 症例は各々 195、55、13 であった。BV-Grade 0 と BV-Grade 1 症例では、腫瘍再発に有意差を認めなかった。BV-Grade 2 は全症例；リンパ節転移陽性、陰性群；pTNM stages I+II, III

群；Luminal B subtype 群の全群において、TR の有意な指標となった。以上より、BV-Grade は極めて有用な IDC 患者の病理組織学的予後因子と考えられた。

#### 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. Hasebe T, Iwasaki M, Hojo T, Shibata T, Kinoshita T, Tsuda H. Histological factors for accurately predicting first local recurrence of invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci* 2013; 104: 1252-1261.
2. Kanomata N, Hasebe T, Moriya T, Ochiai A. Simultaneous demonstration of gelatinolytic activity, morphology, and immunohistochemical reaction using zymography film. *Med Mol Morphol* 2013; 46: 193-197.
3. Hasebe T. Tumor-stromal interactions in breast tumor progression-significance of histological heterogeneity of tumor-stromal fibroblast. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17: 449-460
4. Sugiyama M, Hasebe T, Shimada H, Takeuchi H, Shimizu K, Shimizu M, Yasuda M, Ueda S, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T. Grading system for blood vessel tumor emboli of invasive ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 2015; 46: 906-916.

[学会発表](計 7 件)

1. 長谷部孝裕. 正確な悪性度評価に必要な病理診断:乳癌 浸潤性乳管癌を中心に. 第 87 回山梨ぶどうの会・山梨大学医学部基礎研究棟 6 階大会議室, 2012 年 7 月 27 日.
2. 長谷部孝裕. 浸潤性乳管癌の正確な悪性度評価に有用な病理組織因子. 2013 年国際病理アカデミー (IAP) 教育シンポジウム「乳腺病理最近の動向 Current topics of breast pathology」山梨大学工学部講堂、2013 年 11 月 23 日
3. 長谷部孝裕. 癌の増殖・転移における癌間質の役割 第 2 回青森乳腺診断フォーラム 2014 年 4 月 19 日、青森市文化会館
4. 長谷部孝裕、柴田龍弘、津田均. 浸潤性乳管癌患者転帰を正確に推測する上で、重要な病理組織学的因子は何か? 第 101 回日本病理学会総会 東京 2012 年 4 月 26-28 日.

5. 長谷部孝裕、岩崎基、柴田龍弘、木下貴之、津田均 . 浸潤性乳管癌の臓器転移を正確に推測する上で重要な病理組織形態因子 . 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012 年 9 月 19-21 日 .
6. 長谷部孝裕、柴田龍弘、津田均 . 浸潤性乳管癌、初回遠隔臓器転移・局所再発を正確に推測する上で重要な組織因子 . 第 102 回日本病理学会総会(札幌) 2013 (平成 25) 年 6 月 6-8 日 .
7. 杉山迪子、長谷部孝裕、島田浩子、清水京子、清水道生、安田政実、大崎昭彦、佐伯俊昭 . 静脈腫瘍塞栓異型度 - 浸潤性乳管癌の有用な予後因子 . 第 104 回日本病理学会総会(名古屋:名古屋国際会議場) 2015 (平成 27) 年 4 月 30 日 - 5 月 1・2 日

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者 :  
長谷部孝裕 (TAKAHIRO HASEBE)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00250209

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )