

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：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790344

研究課題名(和文)高精度蛍光ナノ計測を用いた乳癌遅発性再発と乳癌幹細胞の相関性の解明

研究課題名(英文)Correlation between late recurrence in breast cancer and breast cancer stem cell using fluorescence nano-particle

研究代表者

多田 寛(Tada, Hiroshi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50436127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌では5年以降の再発である遅発性再発(late recurrence)が他の癌腫に比較して多いのが特徴であるが、この遅発性再発に乳癌幹細胞が関与している可能性が最近示唆されている。本研究では、従来の免疫染色法に加え、無機系蛍光ナノ粒子を用いて、抗ALDH1抗体及び抗ABCトランスポーター抗体MDR-1が遅発性乳癌と乳癌幹細胞の関連を検討することを目的とした。結果、遅発性再発はliminal Aが有意に多く、その中でMDR-1陽性は26%であったが独立した予後因子ではなかった。温存乳房内再発症例での検討でも、ALDH-1、MDR-1とも遅発性再発と有意な相関が認められないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：While some cancers are considered cured after 5 years, this is not the case for breast cancer. Recent study shows that late recurrence of breast cancer is correlated with cancer stem cells. In this research, we investigated whether breast cancer stem cells correlated with late recurrence using immunohistochemical and inorganic fluorescence nanoparticle assessing MDR-1 & ALDH-1. Late relapses of breast cancer are mainly observed in ER positive tumors. Among these cases, MDR-1 positivity was 26%, and there was no significant relationship between the MDR-1 positivity and disease free/overall survival. According to ipsilateral breast cancer recurrence, we found that there was no correlation between MDR-1/ALDH-1 positivity and late recurrence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：乳腺外科学 乳癌幹細胞 遅発性再発

1. 研究開始当初の背景

乳癌は術後5年以上過ぎても再発する遅発性再発(late recurrence)が他の癌腫に比べて多く見られるのが特徴の一つであり、術後10年過ぎてもしばしば再発が認められる。この遅発性再発の予測因子として、手術検体でのエストロゲン受容体(ER)陽性が挙げられている(Cancer Epidemiology 2009)。このER陽性乳癌は乳癌全体の約80%を占めており、毎年数万人の乳癌患者がこの乳癌の遅発性再発の危険性を背負うことになる。しかしこの乳癌遅発性再発の予測は困難である。

一方、癌細胞は自己複製能と分化能を備えた少数の「癌幹細胞」を中心とした階層性を正常組織と同様に構成し、癌幹細胞のみが腫瘍を形成できるとする「癌幹細胞仮説」という概念が唱えられて久しい。乳癌においては2003年に細胞表面マーカーとしてCD44+/CD24-のパターンをとる少数の細胞集団が腫瘍形成能を持つことが明らかにされ(PNAS 2003)、これらの多くはアルデヒド脱水素酵素1(ALDH1)陽性の性質を示すことも示された(Cell Stem Cell 2007)。乳癌において、これらの性質を示す乳癌幹細胞を多く発現する乳癌は、そうではない乳癌と比較して、転移再発を起こしやすく、予後不良に関与することが報告されている(N Engl J Med. 2007)。この乳癌幹細胞は薬物を排出する役割であるATP結合カセット(ABC)トランスポータータンパク質が強く発現していることが多いため化学療法に耐性を持つとされる。乳癌幹細胞は細胞周期を長く静止期に維持するため、抗癌剤や放射線の攻撃を受けにくく、修復機構も行われやすいと考えられるが、これらの性質が乳癌の遅発性再発に関連するのではないかと考えられてきている。また、癌幹細胞の腫瘍内分布も再発のメカニズムを解明する上で重要であり、再発脳腫瘍において癌幹細胞が腫瘍内脈管の近傍に存在することが再発に関わっている可能性がある(PNAS, 2009)との報告があるが、乳癌においては乳癌幹細胞と脈管の位置との関連は明らかになっていない。

申請者らのグループは、計測が非常に困難なマウス腫瘍内において蛍光ナノ粒子の1粒子イメージングに成功し(Tada et al, Cancer Res, 2007, 111 編の論文に引用)さらに病理組織標本において極めて蛍光強度が高い蛍光ナノ粒子によって標識された抗体を、1粒子蛍光解析法を用いることで膜蛋白の高感度定量化に成功している(JST 支援海外出願: PCT/JP2011/004762, PCT/JP2011/004763)。蛍光ナノ粒子のメリットは、(1)耐光性が優れており時間においても観察が可能であるため病理診断に向いている(従来のFITCなどの有機系蛍光色素では直ぐに消光してしまうため不可)、(2)1種類の蛍光波長のみで多重染色が可能である(多くの有機系蛍光色素は励起波長のピー

クが異なり数種類の励起光が必要)、(3)抗体をダイレクトに結合させることができる(1次抗体を反応させて2次抗体を反応させるという手順が不要)、(4)非常に明るく(蛍光強度が有機系蛍光色素の数十倍以上)、1個の粒子レベルで定量化することが可能、などが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、従来のDABによる免疫染色法に加え、蛍光ナノ粒子を用いた技術を応用して、乳癌幹細胞の存在を示唆する抗ALDH1抗体及び乳癌幹細胞の機能を表す抗ABCトランスポーター抗体と蛍光ナノ粒子を結合させて乳癌病理組織切片での蛍光免疫染色を行い、高感度計測系で乳癌幹細胞の“量と機能の定量化”と“乳癌組織内での存在部位の可視化”を行うことで、遅発性乳癌に乳癌幹細胞がどのように関わっているかの解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)再発時期での検討:東北大学乳腺内分泌外科において2001年から2011年に乳癌根治術を施行した症例のうち再発が確認された80症例について検討を行った。症例を手術から再発までの期間で2年以内再発(35例)、2-5年での再発(22例)、5年以降の再発(23例)の3群に分けて検討を行った。

(2)ABCトランスポーターの通常免疫染色での検討:2007-200年の東北大学病院乳腺内分泌外科で手術を施行したliminal Aの85症例において、ABCトランスポーターであるMDR-1(JSB-1, Abcam)を用い、IRS(immunoreactive score:染色濃度スコア(0:染色なし、1:弱、2:中等度、3:強度)と染色領域(0:なし、1:<10%、2:10%~50%、3:51%~80%、4:>80%)とを掛け合わせた1~12で得られるスコア)で4以上を陽性として、無再発生存率、全生存率を検討した。

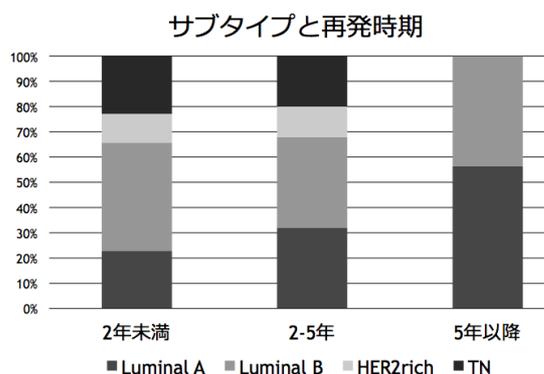
(3)温存乳房内再発症例での検討:東北大学病院で乳房温存療法を施行した前期[前期(1990-1996年)85例、後期(1997-2007)527例、計613例]平均観察期間は前期245ヶ月、後期125ヶ月を対象とし、MDR-1及びALDH-1と遅発性再発の関連について検討した。

(4)蛍光ナノ粒子(Quantum dot®705, invitrogen)を用いた検討:病理組織標本において、DABを用いた通常免疫染色と蛍光ナノ粒子を用いた蛍光免疫染色を行い、染色性について検討した。

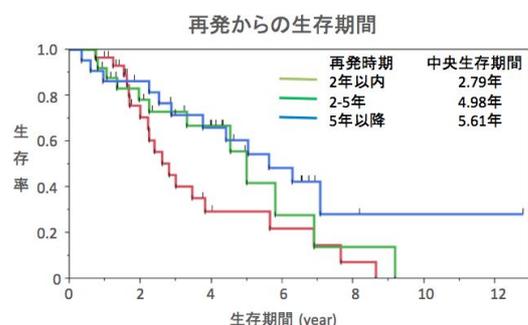
4. 研究成果

(1)術後初再発部位は全体で、骨(34.0%)、リンパ節(24.5%)、肺(20.2%)、肝(9.6%)、皮膚・胸壁(8.51%)、脳(3.2%)であった。ただし再発時期と初再発部位の相関は見ら

れなかった。再発時期とサブタイプの検討では、2年以内ではLuminal Aが20.6%、Triple Negative(TN)が23.5%であったが、5年以降ではLuminal Aが68.8%、TNが0%であった。



また各群間において手術時の年齢、組織型、Nottigham Histological Gradeは差が見られなかった。再発後の予後の検討では、DFSが長いものほど長期生存が期待できるという結果であった(中央生存期間、2年以内再発:2.79年、2-5年:4.98年、5年以降:5.61年)。また再発部位は予後には関係しなかった。



(2) ABC トランスポーターである MDR-1 (abcam) を使用した通常免疫染色での検討では、Luminal A 症例中、MDR-1 陽性は22例(26%)、陰性63例(74%)であり、両者で無再発生存率では有意差は認められなかった。MDR-1 は年齢、閉経状況、ステージ、腫瘍径(pT)、リンパ節転移(pN)、核グレード、組織学的グレード、ER、PgR、HER2、Ki-67 LIのいずれとも相関は認められなかった。全生存率では単変量解析ではMDR-1において有意差が認められたが、(p=0.032)、多変量解析では、独立した予後規定因子とはならなかった。(p=0.058)。

(3) 照射群の率は前期47.1%、後期64.1%。照射、非照射両群の乳房内再発率は、前期で10.0% vs 2.2%、後期で4.1% vs 5.3%。初発・再発巢でのER・HER2の一致率は、81%と76%。再発後5年遠隔無再発生存率は前期照射群 vs 非照射群で、75% vs 100%、後期照射群 vs 非照射群で86% vs 100%。7例(照射群3例、非

照射群4例)に再温存手術が行い、非照射群1例に遠隔再発を認めた。初回手術時検体において、乳癌幹細胞系マーカーであるALDH1とMDR-1と予後との相関は認められず(ALDH1: p=0.56, MDR-1: p=0.57)、また遠発性再発との関連も認められなかった。

(4) 通常の免疫染色であるDAB法は、温度や基質、反応時間に影響を受けるため蛋白量の定量化は困難であり、蛍光物質を用いた蛍光免疫染色の方が、定量的に優れている。しかしQuantum dotを用いた蛍光免疫染色は定量化には優れるが、自家蛍光の影響やnon-specific bindingなどの問題が認められた。今後、パラフィン包埋組織標本でも自家蛍光に埋もれずに蛍光輝点を計測できる新規の有機系蛍光物質を用いた手法が有用であると考えられた。

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2件)
1. 多田寛, 石田孝宣, 大内憲明. 乳房温存手術におけるLTFを用いた一次的乳房形成のテクニック: 手術、査読無、66(10): 1449-1454, 2012, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012368937>
 2. 多田寛, 石田孝宣, 鈴木昭彦, 大内憲明. 患者目線の乳癌医療: 概論(インフォームドコンセントについて). 査読無 Nippon Rinsho 70(Suppl 7):747-750, 2012, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012369740>

- (学会発表)(計6件)
1. 多田寛, 石田孝宣, 根本紀子, 佐藤章子, 江幡明子, 佐藤馨, 宮下 穰, 渡部 剛, 鈴木昭彦, 大内憲明: バイオリロジーからみた温存乳房内再発症例の検討, 第75回日本臨床外科学会総会 シンポジウム 03 「乳房内再発のバイオリロジーと治療戦略」, 2013年11月21日, 名古屋
 2. Hiroshi Tada, Kosuke Gonda, Noriaki Ohuchi: Single Molecular Cancer Imaging Using Nano-particle for Clinical Application, 第11回日本臨床腫瘍学会学術総会 ワークショップ, 2013年8月31日, 仙台
 3. 多田寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 渡辺みか, 甘利正和, 石田孝宣, 大内憲明: 新規有機系蛍光色素を用いた高精度ナノイメージングによる乳癌病理組織診断の可能性, 第21回日本乳癌学会総会ポスター, 2013年6月28日, 浜松
 4. 多田寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 渡辺みか, 甘利正和, 鈴木昭彦, 石田孝宣, 大内憲明: 蛍光ナノイメージングを用いた病理組織診断による分子標的治療の新たな展開, 第113回日本外科学会定期学術集会パネルディスカッション 5 乳癌分子標的治療の現状と展望, 2013年4月11日, 福岡
 5. 多田寛, 河合賢朗, 石橋忠司, 山田

隆之、鈴木昭彦、甘利正和、渡部剛、石田孝宣、角森昭教、大内憲明：マンモグラフィ描出困難な症例の臨床病理学的特徴の解析、第22回日本乳癌検診学会学術総会、2012年11月8日、沖縄

6. 多田寛、石田孝宣、甘利正和、鈴木昭彦、渡部剛、大内憲明：乳房温存療法における放射線照射の意義 -照射群と非照射群における検討-、第20回日本乳癌学会学術総会、2012年6月30日、熊本

〔図書〕(計1件)

3. 多田寛、石田孝宣、大内憲明. 乳がんの外科療法: チームで取り組む乳がんの放射線療法、メディカル教育研究社、22-26、2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 寛 (Tada, Hiroshi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：50436127