

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460425

研究課題名(和文) 乳腺浸潤性微小乳頭癌の特徴的な浸潤転移機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the peculiar invasion/metastasis mechanism of breast invasive micropapillary carcinoma.

研究代表者

鹿股 直樹 (Kanomata, Naoki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60263373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺の浸潤性微小乳頭癌は間質の裂隙中に偽乳頭状あるいは微小乳頭状構造を示す癌細胞の胞巣がみられる腫瘍である。通常型の浸潤性乳管癌に比してリンパ管侵襲の頻度、リンパ節転移の頻度が高いことが知られている。今回はあらかじめDNAマイクロアレイデータで得られた情報をもとに免疫染色的検討を行った。C21orf118(BC-1514)は浸潤性微小乳頭癌での発現が高く、CD1D、PJA2は、微小乳頭癌のほうが通常型の浸潤癌より発現が低かった。CD1Dは静脈侵襲($p=0.002$)、リンパ節転移($p=0.047$)と負の相関を示した。CD1Dはリンパ節転移に対して抑制的に働いている可能性があるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Invasive micropapillary carcinoma has the peculiar pseudopapillary and/or micropapillary structures. Invasive micropapillary carcinoma has been known to have more lymph vessel infiltration and nodal involvement than usual invasive ductal carcinoma. However, the mechanism of invasive micropapillary carcinoma has not been well understood. By immunohistochemical method, C21orf118(BC-1514) has higher expression in invasive micropapillary carcinoma than usual invasive ductal carcinoma. CD1D and PJA2 showed their lower expression in micropapillary carcinoma than usual carcinoma. CD1D has the significant inverse correlation with venous invasion ($p=0.002$) and lymph node metastasis ($p=0.047$). CD1D might suppress lymph node metastasis.

研究分野：乳腺病理

キーワード：浸潤性微小乳頭癌 リンパ節転移 免疫染色 乳癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳腺の浸潤性微小乳頭癌 (invasive micropapillary carcinoma) は、1993 年に初めて報告された組織型である (Siriaunkgul S and Tavassoli FA. Mod Pathol 6:660-662, 1993)。間質の裂隙中に偽乳頭状あるいは微小乳頭状構造を示す癌細胞の胞巣がみられる腫瘍である。また、免疫組織学的には、EMA, MUC1 および E-cadherin が胞巣周辺部 (最外層) にのみ陽性を示し、極性の逆転 ("inside out pattern" あるいは reversed polarity) を示す。 (De la Cruz C, Moriya T et al. Pathol Int 54:90-96, 2004, Gong Y, Sun X et al. Histopathol 46:24-30, 2004)。

(2) 浸潤性微小乳頭癌は通常型の浸潤性乳管癌 (invasive ductal carcinoma, not otherwise specified) に比してリンパ管侵襲の頻度、リンパ節転移の頻度が高いことが知られている (De la Cruz C, Moriya T et al. Pathol Int 54:90-96, 2004, Guo X, Chen L et al. Am J Clin Pathol 126:740-746, 2006)。また、予後については単変量解析では通常型乳管癌に比して悪いとされるが、病期なども考慮した多変量解析では有意差がないと報告されている。このため、リンパ管侵襲やリンパ節転移の研究を行う上で、良いモデルとなる組織型である。 (Nasser H, Wallis T et al. Mod Pathol 14:836-841, 2001, Kim MJ, Gong G et al. Arch Pathol Lab Med 129:1277-1282, 2005, Chen I and Fan Y et al. Int J Surg Pathol 16:155-163, 2008)。浸潤性微小乳頭癌の特徴的な形態がいかにして生じるか、また、リンパ管侵襲、リンパ節転移をきたしやすいのはなぜか、についてはほとんど解明されていない。研究分担者の山口等は、浸潤性微小乳頭癌では、免疫組織化学的に p63 (核での陽性像)、インボルクリンおよび 34 E12 の発現が高いことを明らかにし、この組織型の腫瘍では扁平上皮分化があり、これが高い悪性度と相関しているのだらうと主張した (Yamaguchi R, Tanaka M et al. Jpn J Clin Oncol 40:781-7, 2010)。また、連携研究者の森谷等は、浸潤性微小乳頭癌では、血管密度が高いことを CD34 による免疫染色で示した (De la Cruz C, Moriya T et al. Pathol Int 54:90-96, 2004)。さらに、浸潤性微小乳頭癌では CD44+/CD24- のいわゆる癌幹細胞マーカーの比率が、通常型の浸潤性乳管癌に比して高いことも報告されている (Li W, Liua F et al. Pathol Res Pract. 206:828-34, 2010)。

(3) 我々は、混合型の浸潤性微小乳頭癌症例 (2 例) から、浸潤性微小乳頭癌の部分と通常型浸潤癌の部分とで分けて mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイにて検討した。その結果、浸潤性微小乳頭癌部分での発現が、通常型浸潤癌での発現に比して 3 倍以上の高値を示した因子は、C21orf118 (B lymphocyte activation-related protein BC-1514) だけ

であった。また、浸潤性微小乳頭癌部分での mRNA 発現が、通常型浸潤癌部分での発現よりも 1/3 以下であったのは、SAMP13 (sterile alpha motif domain-containing protein 13), CAMK2N1 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase inhibitor 1), TCF4 (transcription factor 4), TNXIP (thioredoxin-interacting protein), RPL5 (60S ribosomal protein L5), PJA2 (E3 ubiquitin-protein ligase Praja2), CD1D (T-cell surface glycoprotein CD1d precursor) であった。

2. 研究の目的

(1) 浸潤性微小乳頭癌と通常型の浸潤性乳管癌とで DNA マイクロアレイにて差が認められた因子について、免疫染色を施行して、それらの発現を確認し局在などを調べる。

(2) 浸潤性微小乳頭癌と通常型浸潤癌との間での発現形式や強度などに違いがあるかどうか、組織学的異型度、ホルモン受容体、HER2 発現、Ki-67 インデックス、TNM ステージや予後などとの関連についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 川崎医科大学で 2009 年 6 月から 2010 年 12 月までに手術が施行された浸潤性乳癌症例のうち、微小浸潤癌を除いた連続症例 231 例 (11 例の浸潤性微小乳頭癌を含む) および、その後の 64 例の浸潤性微小乳頭癌の計 294 例を用いて行った。代表的なパラフィンブロックを抽出し、組織マイクロアレイを作成した。

(2) 免疫染色は、2 種類の抗 C21orf118 (BC-1514) ポリクローナル抗体 (C-15 及び W-12 Santa Cruz), CaMK2N1 (ポリクローナル抗体 GeneTex), RPL5 (ポリクローナル抗体 GeneTex), PJA2 (ポリクローナル抗体 Abcam), CD1D (マウスモノクローナル抗体 ab11076 Abcam), および特異的合成アミノ酸をもとに作成したポリクローナル抗体 3 種類 (SAMP13, TCF4, TNXIP) を用いた。免疫染色結果は面積と染色強度の積をスコアとして検討した。

4. 研究成果

(1) C21orf118 (BC-1514) C-15 では、浸潤性微小乳頭癌での発現 (218.77 ± 64.87 , 中央値 200) が通常型浸潤癌 (139.41 ± 67.45 , 中央値 180) より有意に高かった ($p < 0.001$)。また、C21orf118 (BC-1514) W-12 でも浸潤性微小乳頭癌での発現 (242.84 ± 58.32 , 中央値 200) が通常型浸潤癌 (211.43 ± 75.59 , 中央値 200) より有意に高かった ($p = 0.001$)。

(2) 一方、CD1D, PJA2 では浸潤性微小乳頭癌での発現が通常型浸潤癌より有意に低かった (CD1D 浸潤性微小乳頭癌 81.71 ± 74.03 , 中央値 70: 通常型浸潤癌 111.65 ± 68.48 , 中央値 95, $p < 0.001$) (PJA2 浸潤性微小乳頭癌 134.53 ± 72.79 , 中央値 100: 通常型浸潤癌

164.32 ± 67.00, 中央値 200, p=0.002)。

これらの因子をロジスティック回帰解析すると, C21orf118(BC-1514) C-15 (p<0.001), CD1D (p=0.001), PJA2 (p<0.001)は, 浸潤性微小乳頭癌の形態像に関して, 各々独立した因子であることが分かった (C31orf118(BC-1514) W-12 は p=0.145)。

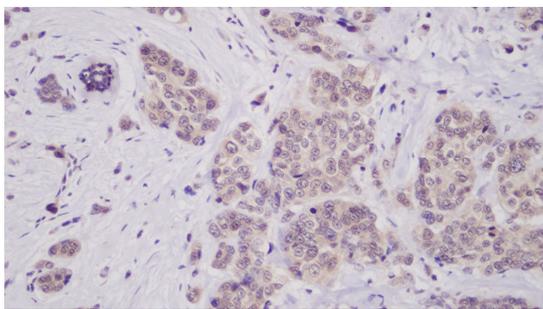
(3)C21orf118(BC-1514) C-15 発現は, pT 因子 (p=0.307), 術後ステージ(p=0.064), 組織学的異型度 (p=0.226), 脈管侵襲 (ly p=0.907, v p=0.617), ホルモン受容体 (ER p=0.724, PgR p=0.921), HER2 (p=0.393), Ki-67(p=0.325)とは有意差がなかった。一方で, リンパ節転移陽性例では, C21orf118(BC-1514) C-15 発現が低い傾向であった(p=0.001)。

(4)CD1D は pT 因子(p=0.068), 術後ステージ (p=0.082), 組織学的異型度(p=0.307), リンパ管侵襲 (p=0.617), ホルモン受容体 (ER p=0.327, PgR p=0.102), HER2(p=0.578)とは有意差がなかった。一方で CD1D は静脈侵襲 (p=0.002), リンパ節転移(p=0.047)と負の相関を示し, Ki-67 とは正の相関を示した (p=0.033)。

(5)PJA2 は pT 因子(p=0.168), リンパ節転移 (p=0.483), 術後ステージ(p=0.157), 組織学的異型度(p=0.955), 脈管侵襲 (ly p=0.161, v p=0.615), ホルモン受容体 (ER p=0.067, PgR p=0.196), HER2(p=0.145), Ki-67(p=0.798)のいずれとも有意な相関は示さなかった。

(6)Cox 単変量解析では, C21orf118(BC-1514) C-15 発現は, 無再発生存率(p=0.034)と全生存率(p=0.024)に有意差を示した。ただし, いずれも C-15 が高発現するほど予後が良い傾向を示した。CD1D は無再発生存率 (p=0.338), 全生存率(p=0.412)との有意差はなく, PJA2 も無再発生存率(p=0.987), 全生存率(p=0.276)とも有意差は示さなかった。

(7)以上から, 浸潤性微小乳頭癌の独特な形態像は, C21orf118(BC-1514)の増加, CD1D と PJA2 の減少が重要であることが示唆された。また, リンパ節転移と CD1D が有意な相関を示したことから, 浸潤性微小乳頭癌がリンパ節転移を起こしやすいことの原因として CD1D の発現低下が重要と思われた。



図は C21orf118(BC-1514) C-15 免疫染色の陽性所見である。

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 16 件)

Tanaka S, Kanomata N, Teramura K, Wakita K, Kunihisa T, Yano Y, Moriya T, Hayashi Y.

Usefulness of immunocytochemistry using a Breast Marker antibody cocktail targeting P63/cytokeratin7/18/cytokeratin5/14 for fine needle aspiration of the breast: a retrospective cohort study of 139 cases. *Cytopathology*. 査読あり 2016. [Epub ahead of print] DOI:10.1111/cyt.12335

Morita M, Yamaguchi R, Tanaka M, Tse GM, Yamaguchi M, Kanomata N, Naito Y, Akiba J, Hattori S, Minami S, Eguchi S, Yano H.

CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes contribute to spontaneous "healing" in HER2-positive ductal carcinoma in situ. *Cancer Med*. 査読あり 2016[Epub ahead of print]doi: 10.1002/cam4.715.

Morita M, Yamaguchi R, Tanaka M, Tse GM, Yamaguchi M, Otsuka H, Kanomata N, Minami S, Eguchi S, Yano H.

Two progressive pathways of microinvasive carcinoma: low-grade luminal pathway and high-grade HER2 pathway based on high tumour-infiltrating lymphocytes. *J Clin Pathol*. 査読あり 2016[Epub ahead of print] doi:

10.1136/jclinpath-2015-203506.

Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Shimo T, Moriya T.

Antitumor and anticancer stem cell activities of eribulin mesylate and antiestrogens in breast cancer cells. *Breast Cancer*. 査読あり 2016 :

23(3):425-36. doi: 10.1007/s12282-014-0580-9

Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Shimo T, Mizutoh A, Moriya T, Sonoo H.

Prognostic value of phosphorylated HER2 in HER2-positive breast cancer patients treated with adjuvant trastuzumab. *Breast cancer*. 査読あり 2015;22(3):292-299. doi:

10.1007/s12282-013-0478-y

Kurebayashi J, Kanomata N, Shimo T, Yamashita T, Aogi K, Nishimura R, Shimizu C, Tsuda H, Moriya T, Sonoo H.

Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity, and

high Ki67 labeling index predict poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone.

Breast Cancer. 査読あり
2014;21(2):214-22. doi:
10.1007/s12282-012-0380-z.

Yamaguchi R, Tanaka M, Tse GM, Yamaguchi M, Terasaki H, Hirai Y, Nonaka Y, Morita M, Yokoyama T, Kanomata N, Naito Y, Akiba J, Yano H.

Management of breast papillary lesions diagnosed at ultrasound-guided vacuum-assisted and core needle biopsies.

Histopathology. 査読あり
2014;66(4):565-76. doi:
10.1111/his.12477.

Shimo T, Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Kozuka Y, Moriya T, Sonoo H.
Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. Breast Cancer. 査読あり 2014;21(1):75-85. doi: 10.1007/s12282-012-0356-z.

森谷卓也, 鹿股直樹 トピックス: 腫瘍病理診断の up to date(1)乳癌 臨床病理 査読なし 62(6): 560 -567 2014
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=co3labor/2014/006206/005&name=0560-0567j&UserID=202.244.205.67>

Kanomata N, Hasebe T, Moriya T, Ochiai A.

Simultaneous demonstration of gelatinolytic activity, morphology, and immunohistochemical reaction using zymography film.

Med Mol Morphol. 査読あり
2013;46(4):193-197. doi:
10.1007/s00795-013-0021-4.

〔学会発表〕(計 20 件)

鹿股直樹, 紅林淳一, 山口倫, 森谷卓也
浸潤性微小乳頭癌の新マーカーBC-1514 発現の臨床病理学的検討

第 23 回日本乳癌学会学術総会(2015.7.2)
(東京国際フォーラム 東京都・千代田区)

紅林淳一, 鹿股直樹, 下登志朗, 山下哲正, 小池良和, 太田裕介, 森谷卓也
乳癌治療薬による癌幹細胞の制御機構に関する基礎的研究

第 23 回日本乳癌学会学術総会(2015.7.2)
(東京国際フォーラム 東京都・千代田区)

鹿股直樹, 山口倫, 紅林淳一, 森谷卓

也

乳腺アポクリン病変での遺伝子変異解析による新たな診断法の開発

第 104 回日本病理学会総会(2015.4.30) (名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)

森谷卓也

乳管内増殖性病変の病理診断

第 60 回日本病理学会秋季特別総会(2014.11.21) (国立劇場おきなわ 沖縄県・那覇市)

鹿股直樹

最近の病理分類と細胞像 乳頭状病変、アポクリン病変など、良悪の鑑別点について 乳腺腫瘍病理分類の変遷

第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会(2014.11.8)(下関市民会館 山口県・下関市)

鹿股直樹, 紅林淳一, 森谷卓也

術後トラスツズマブ投与を受けている HER2 陽性症例での pHER3 とトラスツズマブ直接ラベル法免疫染色の検討

第 22 回日本乳癌学会学術総会(2014.7.11)
(大阪国際会議場 大阪府・大阪市)

森谷卓也, 鹿股直樹

乳癌の個別化治療を目指した病理・細胞学的評価の意義

第 52 回日本臨床細胞学会秋期大会(2013.11.3)(大阪国際会議場 大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

鹿股直樹

文光堂 腫瘍病理鑑別診断アトラス 乳癌 第 2 版 2016 年 151-155.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/pathology2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿股直樹 (KANOMATA, Naoki)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60263373

(2) 研究分担者

山口倫 (YAMAGUCHI, Rin)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 10309750

(3) 連携研究者

紅林淳一 (KUREBAYASHI, Junichi)

川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：10248255

森谷 卓也 (MORIYA, Takuya)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00230160