

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 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：25460467

研究課題名(和文) 乳癌の初期浸潤に関する病理形態学的アプローチ

研究課題名(英文) Histopathological approach for early invasive breast carcinoma

研究代表者

森谷 卓也 (Moriya, Takuya)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤癌成分が少ない乳腺の初期浸潤癌について臨床病理学的に解析した。乳腺病理の専門家でも通常の染色標本のみでは浸潤成分の有無の判定にはらつきがあり筋上皮に対する免疫染色の併用が重要と思われた。浸潤径5mm以下の癌については、組織型や内因性サブタイプの分布は浸潤癌全体と同様で非浸潤癌とは異なっていた。一方、非浸潤癌の段階で浸潤癌に移行する可能性を推測する指標としてインテグリン $\alpha 6$ が有望と考えられた。また、浸潤前段階での基底膜変性などにuPARやPAI-1が関与し浸潤開始とともにMMPが発現することも明らかになった。しかし全ての癌症例が同じ過程を経ない可能性が残され、今後の検討課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Clinicopathological analysis of early invasive carcinomas of the breast had been performed. The criteria of invasion may not be consistent among expert pathologists using ordinal staining specimen, so immunohistochemical approach against myoepithelial cells should be recommended. The proportion of histological classification and intrinsic subtype among early invasive carcinoma (maximum invasive diameter 5mm or less) were similar to those of invasive carcinoma in general, but different from non-invasive carcinoma. The expression of integrin $\alpha 6$ may be the indicator for invasiveness, for non-invasive stage of carcinogenesis. In addition, uPAR and PAI-1 were related to degradation of basement membrane at pre-invasive stage, and MMP was expressed at early invasive stage. However, it was suggested that not all of breast carcinomas may progress the same manner, and further investigation will be necessary.

研究分野：人体病理学

キーワード：病理 乳癌 浸潤 間質 早期癌 初期浸潤 免疫組織化学 病理診断学

1. 研究開始当初の背景

(1)本邦女性の乳癌患者数は増加し、年間の新規患者が5万人を越え、女性の16人に1人程度が生涯のうちに乳癌を発症するといわれていた。乳癌の発生を予防する決定的な手段がないため、検診による早期発見・早期治療を実践することが重要視されていた。

(2)最も早期の乳癌は非浸潤癌だが、他臓器の癌とは異なり、上皮内癌であっても乳房内を広範囲に進展する症例がある。逆に、乳管内癌の状態に留まる時期が極めて早く早期に浸潤癌に進行する症例も存在する。このような、症例ごとのバイオロジーの差が、乳癌の発育進展に大きく関わっている。

(3)発育進展の早期に浸潤を開始する癌ほど悪性度が高く、予後が悪いため、それらをより早く発見し、適切な治療を施すことは乳癌全体の予後向上のために重要と考えられるが、初期浸潤がいつ、どの部位から、どのような形式で浸潤が開始するのか明らかではなく、初期浸潤の判定する基準も十分に策定されていなかった。

2. 研究の目的

(1)乳癌の初期間質浸潤の判定基準を明らかにする。

(2)浸潤性乳癌巣、およびその背景に見られる非浸潤癌(上皮内癌)における病理形態による浸潤様式の違い、筋上皮・基底膜物質・気質の形態変化を観察する。

(3)初期浸潤の開始部位や、浸潤巣の広がりについて、三次元立体再構築を実施して検証を行う。

(4)リンパ管や静脈内への初期浸潤(侵襲)について観察する。

(5)最終的に、初期浸潤の病理診断に関する具体的判定方法の提言を行い、さらに放射線画像診断との対比や手術術式選択などに対する足掛かりを作る。

3. 研究の方法

(1)最初に、既知の浸潤性乳癌において、乳管内癌が間質内に浸潤している病巣を探索し、浸潤開始のパターン解析による亜分類策定、および免疫組織染色による浸潤開始の裏付け解析を行う。得られた成果を初期浸潤癌症例において解析するとともに、これまでの病理検査では浸潤の有無を確定できなかった症例についても同様の手法を適用し探索する。

(2)初期浸潤の様子を詳細に確認する目的で、三次元立体再構築による観察を行う。さらに、早期に脈管侵襲を来した初期浸潤癌を抽出し、脈管侵襲形態と初期浸潤部の位置関係や初期浸潤巣のパターンによる影響を観察す

る。

(3)以上の解析結果から、乳癌初期浸潤の標準的な病理形態的診断手法を提唱するとともに、嚢胞内乳頭状癌における圧排浸潤など議論の余地が残されている病変の解釈について解決を諮る。

4. 研究成果

(1)浸潤径5mm以下の乳癌265例(平均年齢57歳、全例女性)について臨床病理学的に検討した。この中には多発癌(同時または異時性、同側多発または両側発生)が23例(8.7%)含まれていた。また、同一病巣内に乳管内癌を介する多発浸潤癌を認めたのは43例(16.3%)と高頻度であった。浸潤巣の多くは通常型の浸潤性乳管癌であったが、特殊型が22例(8.3%)みられ、粘液癌10例、浸潤性微小乳頭癌7例、浸潤性小葉癌3例、アポクリン癌2例であった。また、3例は被包型乳頭状癌に付随した浸潤癌であった。リンパ節転移は検索224例中24例(10.7%)に存在し、そのほとんどが2mm未満の微小な転移巣であった。内因性サブタイプ別にはLuminal A型166例(62.6%)、Luminal B型36例(13.8%)、erbB2型29例(10.9%)、トリプルネガティブ型29例(10.9%)で、通常型浸潤癌の分布と著差はなかった。以上の結果から、非浸潤癌の段階ではLuminal型が多くトリプルネガティブ型は少ないが、初期浸潤の段階ですでに浸潤癌全体と同じ症例分布が見られることが確認された。

(2)病理診断のコンサルテーションを受けた乳管内乳頭状病変(乳頭腫・乳頭状非浸潤性乳管癌)および初期浸潤癌20例をバーチャルスライド化し乳腺を専門領域とする10名のボランティア病理医に供覧した。非浸潤性乳管癌9例中7例でいずれか1名以上が浸潤癌あり、ないし浸潤の疑いありと判定した。一方、初期浸潤癌3例について浸潤なしと判定した医師はそれぞれ2名、4名、4名であった。以上の結果から、初期浸潤に関するHE染色のみによる形態診断には限界があることを示した。筋上皮マーカーの染色を含め、客観的な指標の策定の必要性が示唆された。

(3)最大浸潤径が5mm以下の初期浸潤癌78例について5種類の免疫染色マーカー(p63, uPAR, PAI-1, MMP-2, MMP-9)に対し免疫組織染色を施し解析した。p63は筋上皮マーカーであるため、消失していれば浸潤癌と考えた。膨張性増殖パターンを示すものは別途EPC(被包型乳頭癌)と分類した。腫瘍浸潤径は0.1~5(平均2.9)mm、リンパ節転移は76例中65例はpN0であった。uPARは非浸潤癌部で72/73例(98.7%)、浸潤癌部では58/64例(90.6%)で、PAI-1は、非浸潤癌部では69/72例(95.8%)、浸潤癌部では56/61例(91.8%)の癌細胞に発現が見られ、発現スコアはいずれも非浸潤癌で有意に高値であった。MMP-2は54/76例(71.1%)、MMP-9は56/76例(73.7%)の間質に発現を認めた。

浸潤癌間質に MMP-2 発現を認めた例は PgR 陽性率が低く、Ki-67LI が高かった。MMP-2、MMP-9 とともに浸潤径が大きい例ほど高発現であった。以上より、uPAR や PAI-1 は浸潤前段階での基底膜変性などに関与し、浸潤開始とともに MMP が発現を開始する可能性が示唆された。

(4)上記と同様の症例を用いて、インテグリン(v 6)に対する免疫染色を追加した。クローン E7P6 に対する染色では、27/76 例(34.2%)の癌細胞に発現があり、非浸潤癌部(24/74 例、32.4%)が浸潤癌部(12/61 例、19.7%)より有意に陽性例が多かった。また、非浸潤癌部においてインテグリンの発現が低い症例ほど MMP-9 陽性例が有意に多かった。別のクローン(6.2A1)では、67.1%の症例において非浸潤癌成分の辺縁に残存する筋上皮に強発現が認められた。また被包型乳頭状癌では発現低下傾向であった。高発現例は MMP-9 発現低下、高度核異型、HER2 陽性、浸潤部 uPAR 発現高率と有意な相関を認めた。後者の抗体の結果からは、インテグリン(v 6)は非浸潤癌における浸潤予測の指標と成り得る可能性が推測され、さらに浸潤開始とともに発現が低下すると考えられた。

(5)初期浸潤癌の3例について、200枚の連続切片を作成し、三次元立体構築の画像作成を試みた。

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16件)

Niikura N, Sakatani T, Arima N, Ohi Y, Honma N, Kanomata N, Yoshida K, Kadoya T, Tamaki K, Kumaki N, Iwamoto T, Sugie T, Moriya T. Assessment of the Ki67 labeling index: a Japanese validation ring study. *Breast Cancer*. 査読有、Vol 23, No 1, 2016, pp.92-100, DOI: 10.1007/s12282-014-0536-0, Tanaka S, Kanomata N, Teramura K, Wakita K, Kuniyoshi 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, 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、Vol 23, No3, 2016, pp425-436, 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、Vol 22, No3, 2015, pp.292-299, DOI: 10.1007/s12282-012-0380-z, Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, McShane LM, Enos RA, Badve SS, Bane AL, Borgquist S, Fineberg S, Lin MG, Gown AM, Grabau D9, Gutierrez C, Hugh JC, Moriya T, Ohi Y, Osborne CK, Penault-Llorca FM, Piper T, Porter PL, Sakatani T, Salgado R, Starczynski J, Lankholm AV, Viale G, Dowsett M, Hayes DF, Nielsen TO. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol*, 査読あり、Vol 28, No6, 2015, p.778-786, DOI: 10.1038/modpathol.2015.38, Morimoto M, Bando Y, Nakagawa M, Takechi H, Yoshida T, Honda J, Tadokoro Y, Moriya T, Sasa M, Tangoku A. Immunocytochemical results for HER2 and Ki67 in breast cancer touch-smear cell specimens are reliable. *Breast Cancer*, 査読あり、2015 [Epub ahead of print], Hida A, Bando K, Sugita A, Maeda T, Ueda N, Matsukage S, Nakanishi M, Kito K, Miyazaki T, Ohtsuki Y, Oshiro Y, Inoue H, Kawaguchi H, Yamashita N, Aogi K, Moriya T. Visual assessment of Ki67 using a 5-grade scale (Eye-5) is easy and practical to classify breast cancer subtypes with high reproducibility. *J Clin Pathol*. Vol.68, No.5, 2015, pp.356-361, DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202695, 米亮祐, 鹿股直樹, 福屋美奈子, 鐵原拓雄, 森谷卓也 乳腺細胞診検体における CK5/14+p63+CK7/18 カクテル抗体による多重染色の基礎検討, *日本臨床細胞学会雑誌*, 査読あり、Vol 54, No 2, 2015, pp170-171, URL: <http://doi.org/10.5795/jjssc.54.170>,

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、Vol 21, No2, 2014, pp214-222, DOI: 10.1007/s12282-012-0380-z, Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi SI. Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 査読あり、Vol15, No2, 2014, pp93-103, DOI: 10.1016/j.clbc.2014.11.002, 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、Vol 21, No 1, 2014, pp75-85, DOI: 10.1007/s12282-012-0356-z, 森谷卓也, よくわかる病理診断報告書 浸潤・偽浸潤の判定法と意義について 教えて下さい(Q&A), *Cancer Board 乳癌*, 査読なし、Vol6, No2, 2014, pp38-39, 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、Vol46, No4, 2013, pp193-197, DOI: 10.1007/s00795-013-0021-4, Hida A, Oshiro Y, Inoue H, Kawaguchi H, Yamashita N, Moriya T. Visual assessment of Ki67 at a glance is an easy method to exclude many luminal-type breast cancers from counting 1000 cells. *Breast Cancer*, 査読あり、Vol 22, No2, 2013, pp29-34, DOI: 10.1007/s12282-013-0460-8, Kimijima I, Yoshida K, Tamura R, Moriya T. Effectiveness of multi-detector row computed tomography in detection of the

presence and extent of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer*, 査読あり、Vol 20, No1, 2013, pp26-33, DOI: 10.1007/s12282-012-0395-5, 森谷卓也, 今村好章, 泉美貴, 大島孝一, 黒瀬顕, 八尾隆史, *病理診断コンサルテーションの現状 日本病理学会コンサルテーションシステムの現状と将来像*, *病理と臨床*, Vol 31, No12, 2013, pp1278-1283.

[学会発表](計15件)

森谷卓也, 鹿股直樹, 紅林淳一, 鈴木 貴, 乳癌の初期浸潤メカニズム解明に関する免疫組織学的検討、第24回日本乳癌学会学術総会、2016年6月17日、東京ビックサイト(東京)、

鹿股直樹, 鈴木聡一郎, 森谷卓也, 乳腺細胞診の DCIS 診断のための新たなアプローチ 分子生物学的見地からみた DCIS、第54回日本臨床細胞学会秋期大会、2015年11月22日、名古屋国際会議場(名古屋)

森谷卓也, 鈴木 聡一郎, 鹿股直樹, 若手医師のためのがん病理診断講座 ゲノム学との融合 乳がんのゲノム異常が病理組織像に表出する 内因性サブタイプ解析と臨床病理、第53回日本癌治療学会学術集会、2015年10月29日、京都国際会議場(京都)、

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, 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年7月2日、東京国際フォーラム(東京)、

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年7月2日、東国際フォーラム(東京)

森谷卓也, 鹿股直樹, 紅林淳一, 鈴木 貴, 水野貴伯, 徳田正弘, 早期乳癌に対するレクチン発現の意義に関する病理学的検討、第104回日本病理学会総会、2015年5月2日、名古屋国際会議場(名古屋)

森谷卓也, デジタルパソロジーの現状と展望、第104回日本病理学会総会、2015年5月2日、名古屋国際会議場(名古屋)

森谷卓也, 乳管内増殖性病変の病理診断、第103回日本病理学会総会、2014年11月21日、国立劇場おきなわ(浦添市)、長嶋真紀, 笠島敦子, 渡辺みか, 秋保信彦, 森谷卓也, 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 乳腺粘液産生性病変における良悪性の鑑別点について、第53回日本臨床細胞学会秋期大会、2014年11月8日、海峡メッセ(下関)、

吉田一也, 君島伊造, 鹿股直樹, 森谷卓也、手術標本における Ki 67labelingindex は針生検検体で代用できるか?、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2014 年 7 月 10 日、大阪国際会議場、(大阪)、森谷卓也, 鹿股直樹, 佐々木里菜, 猪谷嘉浩、浸潤性乳管癌に対する Ki 67 測定法の標準化に関する検討、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2014 年 7 月 10 日、大阪国際会議場、(大阪)、中山可南子, 矢形寛, 吉田敦, 林直輝, 森谷卓也, 鈴木高祐, 山内英子、核グレートと Ki 67 の大きな乖離を示した乳癌症例の検討、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2014 年 7 月 10 日、大阪国際会議場、(大阪)、米亮祐, 福屋美奈子, 荒木豊子, 小林江利, 小林博久, 鐵原拓雄, 鹿股直樹, 森谷卓也
乳腺細胞診検体における ADH-5 抗体による多重染色の基礎検討、第 55 回日本臨床細胞学会総会、2014 年 6 月 6 日、パシフィコ横浜 (横浜)
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 年 11 月 3 日、大阪国際会議場、(大阪)、森谷卓也, 鹿股直樹、DCIS の病理診断: 最近の話題、第 21 回日本乳癌学会学術総会、2013 年 6 月 27 日、アクトシティ浜松(浜松)

〔図書〕(計 1 件)

森谷卓也、腫瘍鑑別診断アトラス 乳癌 第 2 版 文光堂、2016 (編集)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

川崎学園 教員情報

<http://kweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmhp/KgApp?kyoinId=ykmmyodggy>

川崎医科大学 病理学 2

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

川崎医科大学附属病院 病院病理部

<https://www.kawasaki-m.ac.jp/hospital/dept/108.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森谷 卓也 (MORIYA TAKUYA)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230160

(2) 研究分担者

紅林 淳一 (KUREBAYASHI JUNICHI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10248255

鈴木 貴 (SUZUKI TAKASHI)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10261629

(3) 連携研究者

鹿股直樹 (KANOMATA NAOKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60263373

(4) 研究協力者

中野智裕 (NAKANO TOMOHIRO)