

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460456

研究課題名(和文) 乳癌におけるNAC-1タンパク発現と、臨床病理学的因子との相関

研究課題名(英文) The correlation between expression of nucleus accumbens-1 (NAC-1) protein and clinicopathological factors in breast cancer

研究代表者

丸山 理留敬 (Maruyama, Riruke)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：60190576

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)：我が国において乳癌は女性で最も多い癌であり、そこで病理診断の果たす役割が重要になってきている。一方、新たな分子標的治療も模索されている。我々は以前から Nucleus accumbens-1 (NAC-1) タンパクに注目しており、膵癌ではその発現と予後との関連が婦人科系の癌とは逆であるという報告をしている。今回はその発現が乳癌患者の予後と関連するかどうかを検討した。しかし結果的には浸潤性乳管癌の免疫染色でのNAC-1発現と患者予後との間に、統計学的に有意な相関を見いだせなかった。しかし発現が低いほど予後が悪いという傾向は出ており、さらに検討を加えて、本研究を発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is the most common malignant tumor in the female population in Japan, but personalized medicine has greatly improved the treatment of breast cancer. Pathological diagnosis has recently played an important role in personalized medicine, and further contribution of pathology is expected. We reported in 2012 that low expression of nucleus accumbens-1 (NAC-1) protein was correlated with poor prognosis of the pancreatic carcinoma patients. Thus, we tried to clarify the relationship between NAC-1 expression and breast carcinoma patients' prognosis. Our immunohistochemical result showed that low NAC-1 expression tended to have worse prognosis, but the difference was not statistically significant. However, we feel that improvement of the method of immunohistochemistry and image analysis by the software could change the result with significant difference between high and low expression groups, and we would like to continue the experiment further to get better results.

研究分野：人体病理学

キーワード：NAC-1 乳癌 予後 臨床病理学的因子

1. 研究開始当初の背景

我が国において乳癌の罹患率は近年増加しつつあり、現在約4万人が診断されている、女性で最も多い癌である。日本では近年死亡率が増加してきているものの、ホルモン治療や Trastuzumab の登場で乳癌の個別化治療は大きく進歩し、そこで病理診断の果たす役割が非常に重要になってきている。一方、新たな分子標的治療も模索されつつあり、そのためには乳癌の遺伝子異常と進展についてさらに知見を得ることが必要である。これに関して我々は Nucleus accumbens-1 (NAC-1) タンパクに注目した。NAC-1 は BTB/POZ gene family に属し、Nanog, Oct4, Sox2 などとの相互作用によって、ES 細胞の pluripotency に関連すると考えられている転写制御因子である。その発現は固形腫瘍では卵巣癌において高く、Gadd45 pathway の抑制を介して腫瘍の増殖や再発率に強く関連することが我々の大学の産婦人科教室と Johns Hopkins 大学との共同研究により示されており、NAC-1 に対する分子標的療法の可能性にも言及されている。また、卵巣癌、子宮頸癌においてはパクリタキセルに対する耐性に関与する可能性も示唆されている。当時我々もその核内移行に関しての研究を公表していた (Okazaki K, et al. Carcinogenesis, 2012)。さらに、NAC-1 は乳癌と膀胱癌、大腸癌においても mRNA 発現が高いことが示されており、我々も乳癌と膀胱癌の手術材料を用いた NAC-1 の免疫染色で、いずれも核に比較的明瞭に染色されるという結果を得たため、本研究に先行して膀胱癌での研究を発表した (Nishi T, et al. Pathol. Int, 2012)。その結果、興味深いことに膀胱癌ではむしろそのタンパク発現と overall survival (OS) や disease free survival (DFS) との関連が卵巣癌や子宮頸癌の場合とは全く逆であり、脈管侵襲やリンパ節転移陽性率とも逆相関し、NAC-1 は GADD45 pathway に影響を与えないという結果を得た。しかし乳癌と NAC-1 との詳細な関連性に言及した論文は全くなかったため、婦人科癌と同様、ホルモン標的臓器である乳癌に関して研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では申請者の所属する大学にある過去の乳癌症例において、NAC-1 の発現を認める症例の割合を調べ、その発現パターンと、内因性亜型を含めた臨床・病理学的因子や、予後、薬剤に対する耐性との間に関連があるかどうかを検討することを主要目的とし、関連が認められれば、乳癌細胞株を用いて、卵巣癌で判明しているような GADD45 pathway への関与があるのか、あるいは膀胱癌で我々が発表したように関連がないのかどうか、検討することを予定していた。さらに予後との関連が認められれば、NAC-1 発現と乳癌細胞株の浸潤能についても調べる予定であった。

3. 研究の方法 (当初の予定も含む)

(1) 対照となる乳癌症例の抽出と病理学的再検討

過去 18 年間に病理部システム内に蓄積された全乳癌症例から、ホルマリン固定パラフィン切片を得ることができた症例を抽出した。抽出症例で乳癌の大きさ (pT 分類)、組織型 (WHO 分類)、核グレード、高度な脈管侵襲の有無、断端陽性が陰性か、リンパ節転移の有無、及び組織学的治療効果判定を、H.E. 染色とエラスチカワンギーソン染色、免疫染色を用いて見直した。同時に臨床進行期 (stage 分類) に関してセンチネルリンパ節転移も含めて再検討した。

古い症例でホルモンレセプターや Her2/neu タンパクの免疫組織化学がなされていないものに関してはそれを行い、それぞれ既存のシステムを用いて score を出す。同様に Ki-67 免疫染色が行われていない症例に関しても、染色を行い MIB-1 index を計測する。これらにより、それぞれの症例を、ここ数年世界的に用いられている intrinsic subtypes にも分類する予定であったが、後述のごとくこの作業は必要なくなった。

(2) NAC-1 の発現検討

上記 (1) で抽出できた症例において NAC-1 と cytokeratin (CK)19 の 2 重染色を行う予定であった。これは間質に存在する陽性細胞の影響を除くためである。NAC-1 抗体は当大学病態生化学教室で作製されたマウスモノクローナル抗体を用いた。しかし、実際に NAC-1 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、膀胱癌とは異なり間質細胞の染色性が非常に弱く (その原因は不明である)、CK19 が必要ないと判断した。その際の結果の解析方法は膀胱癌で検証済みである。また、膀胱癌での我々の経験からすると、2000 年以前のは NAC-1 の染色性が悪く評価が困難な可能性が高いが、染色の至適条件を工夫して可能な限り施行しようとした。しかし残念ながらやはりこれらを研究に用いることはできなかった (何故 2000 年なのかは不明)。染色できた標本は全てバーチャルスライドシステム (浜松ホトニクス社製、Nanozoomer 2.0) を用いてバーチャルスライドの ndp ファイルとした。画像取り込みに関しては、アップグレードした Nanozoomer 2.0-HT 用のソフトウェアを用いた。このファイル上で、画像解析ソフト (ドイツ DEFiNiENS 社製、Tissue Studio, version 2.0) を用いて、腫瘍最大断面全体の陽性腫瘍細胞の割合と染色強度に関して検討した。しかしそのまま計測したのでは母集団の数に間質細胞の数が入ってしまう。したがって当初計画していなかった液晶タブレット (Wacom DTK-2241/Medical) を購入し、モニター上で腫瘍細胞の部分だけを液晶ペンを用いて囲み、その部分を対象として計測することとした。(Figure 1)

(3) 対照となる乳癌症例の NAC-1 発現と種々の臨床・病理学的因子との関連

NAC-1 免疫染色結果の score と、当院乳癌外科に蓄積してある患者データを用いて、NAC-1 発現の程度と DFS や OS との関連を調べる。実験を進める過程で、統計学的有意差が出る印象であったため、画像解析ソフトの計算した NAC-1 発現陽性率と陽性強度を用いて、DFS や OS との関連が出る、低発現群と高発現群を分けるカットオフ値を探った。統計学的解析はすべて JMP software (ver. 8; SAS Institute)を用いて行った。

以下は当初の予定。

この両群と 1, 2 で再検討した病理学的因子との相関を調べる。

同データを用いて、パクリタキセル等の抗癌剤を術前化学療法に用いたものに関しては、術前生検検体の NAC-1 発現と組織学的治療効果判定(乳癌取り扱い規約第 17 版)との相関を調べる。抗がん剤を術後化学療法に用いたものに関しては、抗がん剤耐性との関連の可能性をみる。

NAC-1 タンパク発現と病理学的因子や予後との間に何らかの関連が得られた場合、数種類の乳癌細胞株(MCF7, MDA-231 等)を用いて、siRNA(オフターゲット効果を考慮して 2 種類以上)による NAC-1 の knockdown を行い、NAC-1 タンパクと GADD45/GIP1 タンパクの発現をウェスタンブロットで見る。同時に、すでに NAC-1 の GADD45 pathway への関与が調べられている、子宮頸癌細胞株(HeLa)と膵癌細胞株(MiaPaca 2)でも同様の実験を改めて行う。

(4) 凍結検体が保存してある最近の約 100 例の中で、H.E.染色でできるだけ間質の少ない腫瘍を選び、Western blot 法による NAC-1 タンパク発現と real time PCR による mRNA 発現を調べ、免疫組織化学との相関をみる。

4. 研究成果

2000 年以前の検体に対する NAC-1 の免疫染色に関しては上記の通りであるが、何故か 2010 年のものに関してもほとんど染色ができないという状態に陥った。染色不良の原因は最終年度になっても判明しなかったものの、それらと非浸潤性乳管癌を除外し、染色状態が良好であった 2001 年から 2009 年までの検体を用いて、NAC-1 発現と予後との関連について統計解析を行なうことができた。症例数は非浸潤癌を除外して 179 例となり、今年度改めて予後調査を行なったところ、40 例が追跡不能であったため、残りの 139 例を対象として無再発生存率、疾患特異的生存率及び粗生存率を、NAC-1 陽性率のカットオフ値を変えながら高発現群と低発現群で Kaplan-Meier 曲線を描いて比較した。その結果、残念ながら無再発生存率(Figure 2)、疾患特異的生存率(Figure 3)、粗生存率(Figure 4)、いずれも 2 群間で有意差を認

めなかった(それぞれ、ログランク検定で $p=0.3473$, $p=0.5795$, $p=0.7302$)。しかしいずれの指標でも NAC-1 陽性率の低い症例(赤線)が、高い症例(青線)より予後が悪い傾向にあり、膵癌での結果に比較的近いと思われる。種々の臨床病理学的因子との関連に関しては、残念ながら時間的余裕がなく、検討することができなかったが、上記の結果を考えるとさほど大きな意義はないと推測される。

<今後の展望>

現時点では、NAC-1 の発現と患者予後との間には有意な関連はないという結果であり、これを negative data として報告することも考えたが、できればもう少し検討を行った後にしたい。2010 年の検体がほとんど染色されなかった原因が最も問題であるため、まずはその究明を行ないたい。その後、浸潤性乳管癌に対してのみであるが、再染色を行ない、我々が膵癌で行なったように、当初の計画通り上皮系マーカー(cytokeratin AE1/AE3)も染色して、間質細胞の影響を除いた状態で Tissue Studio にかけてカウントを行なえば、膵癌で見られたような傾向は出るのではないかという印象を持っている。また、今回は NAC-1 陽性率をもとにした検討しか行えなかったが、組織学的スコアをもとにした比較を行ないたい。その上で「3. 研究の方法」で述べたような培養細胞を用いた研究に進めたいと考えている。

今回の研究が当初の計画通り進まなかった原因は、染色に手間取ったこともあるが、平成 26 年度半ばから極端な病理学講座及び病理部での人員不足に陥り、病院での日常病理診断に大きな時間を割かざるを得なかったことが大きい。しかし平成 28 年度半ばから、徐々に人手不足が解消されることが期待されるため、今後は本研究をさらに進めて NAC-1 の乳癌における増殖と浸潤への関与を明らかにし、最終的には NAC-1 の免疫染色が日常の病理診断において個別化治療に役立つかどうかを明らかにしたいと考えている。

Figure 1 画像解析ソフトを用いた解析の例(癌細胞を赤線で囲んである)

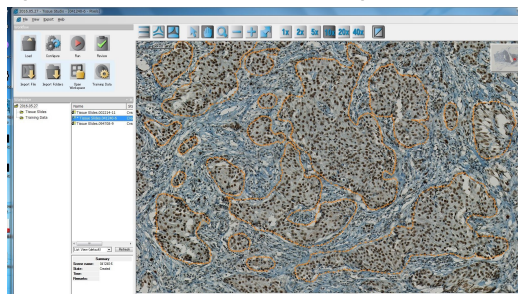


Figure 2 無再発生存率（カットオフ値：陽性率 10%）

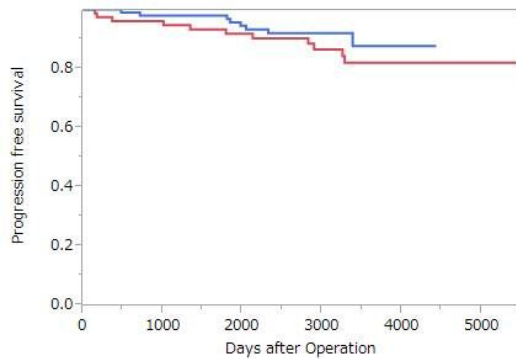


Figure 3 疾患特異的生存率（カットオフ値：陽性率 10%）

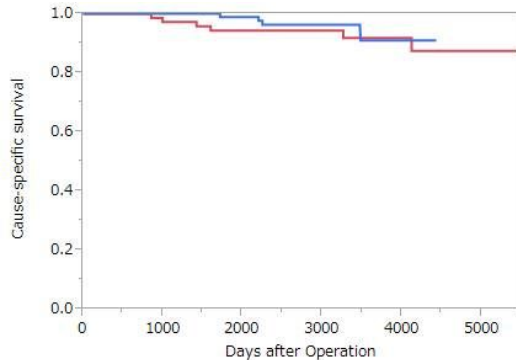
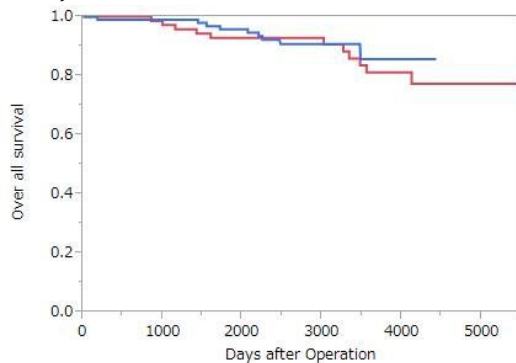


Figure 4 粗生存率（カットオフ値：陽性率 10%）



5 . 主な発表論文等

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 理留敬 (MARUYAMA, Riruke)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：60190576

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者

板倉 正幸 (ITAKURA, Masayuki)
島根大学・医学部・講師
研究者番号：60223070

百留 美樹 (HYAKUDOMI, Miki)
島根大学・医学部・助教
研究者番号 (40758471)

(4)研究協力者

吉田 学 (YOSHIDA, Manabu)