

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460639

研究課題名(和文) 乳癌術前化学療法後の転移リンパ節での乳癌幹細胞の量・機能の高感度蛍光ナノ解析

研究課題名(英文) quantitative diagnosis of Breast cancer stemness-related protein by single particle nano imaging

研究代表者

多田 寛(Hiroshi, Tada)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：術前化学療法を施行した乳癌症例の病理組織切片を用いて、癌幹細胞マーカーのABCトランスポーターBCRPの蛍光免疫染色及び高感度定量化を行い、BCRP蛋白量が予後とどのように関連しているかを検討した。術前化学療法前の針生検検体を用いてBCRP nano patho scoreと臨床病理学的因子との比較検討を行った結果、悪性度の指標となるKi67とBCRP nano patho scoreの相関係数は0.623と有意な相関を認めた($p=0.023$)。再発の有無について有意な相関は認められなかった(再発群：11.3-24.0、無再発群：8.8-15.6、 $p=0.317$)。

研究成果の概要(英文)：Assessing breast cancer tissues for expression of cancer stemness biomarkers, such as breast cancer resistance protein (BCRP) which is a member of ABC transporter, may provide critical information for patient prognosis. We developed a novel immunohistochemical method with new fluorescent nanoparticle, phosphor integrated dot (PID), by single-particle imaging using tissue samples from patients with clinical information. We successfully calculated the number of PID particles in a cell and defined it as nano patho score that reflects the level of BCRP protein expression in cancer cells. The BCRP nano patho score in 13 cases was correlated proportionally with the score of Ki67 as assessed by immunohistochemical method ($R=0.62$). But BCRP nano patho score were not correlated with breast cancer recurrence rate in breast cancer patients who were treated with preoperative chemotherapy

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：蛍光ナノ粒子 ABCトランスポーター 乳癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

乳癌の乳房温存率を向上させ、抗癌剤の薬剤感受性の情報を得られるため、実臨床の場で現在広く行われている。術前化学療法後に手術で摘出した組織は、手術や放射線治療の影響を受けずに抗がん剤を癌に暴露させた状態を観察できるため、腫瘍生物学的な観点から重要な研究対象である。術前化学療法施行後、腫瘍が完全に消失する病理学的完全寛解(pathological complete response ;pCR)が得られた症例では5年無再発生存率(Disease-free survival; DFS)は85.7%と予後が良好であり、乳腺原発巣で癌細胞が残存している場合は5年DFSが76.9%と予後が比較的不良とされている(JCO. 2012)。さらに、腋窩リンパ節のpCR症例では5年DFSが87%で、術前化学療法後に腋窩リンパ節で癌細胞が残存している場合の5年DFSは60%と特に予後が不良であることが報告されている(JCO.2005)。

一方、癌細胞において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)、中でもCD44のサブタイプCD44v6が有用なマーカーとされている。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)。このような性質を示す乳癌幹細胞を多く発現する乳癌は、そうではない乳癌に比較して、転移再発を起こしやすく予後不良であ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。その中で特に機能が抗癌剤耐性と関連することが明らかとなっているのは、MDR1(multidrug resistance 1)とBCRP(breast cancer related protein)である。これらの乳癌幹細胞はエストロゲン受容体陰性、プロゲステロン受容体陰性、HER2陰性の所謂トリプルネガティブ乳癌に特に多く存在すると考えられている。

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 H et al, Cancer Res,2007. 171回/引用)、さらに病理組織標本に1粒子蛍光解析法を応用し、蛍光ナノ粒子で標識した膜蛋白質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(半導体性ナノ粒子の量子ドット)のメリットは、(1)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、(2)1種類の蛍光波長のみで多重染色が可能(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)1次抗体の直接標識で十分な感度を得られるため手技の簡略化が可能(2次抗体反応手順が不要)、(4)耐光性が優れており時間をかけても観察が可能であるため病理診断に向いている(従来の有機系蛍光色素では直ぐに消光してしまうため不可)などが挙げられる。

このように、高輝度かつ蛍光寿命の長い蛍光ナノ粒子を用いることで、病理組織標本内で蛋白質量を粒子数の単位で評価可能なため、従来為し得なかった高感度な蛋白定量が可能となる。さらに明視野と蛍光画像をオーバーラップさせることにより、病理組織内の蛋白を含んだ細胞の位置情報が計測可能である。

2. 研究の目的

本研究では、この蛍光ナノ粒子を用いた計測技術を応用して、術前化学療法を施行した乳癌症例の病理組織切片を用いて、癌幹細胞マーカーと考えられるABCトランスポーターのBCRP (Breast Cancer resistance protein)の蛍光免疫染色及び高感度定量化を行い、BCRP蛋白量が予後とどのように関連しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳癌培養細胞及び組織標本でのABCトランスポーターの染色性検討

BCRP陽性細胞としてA549、HEK29、低発現細胞としてSKBR3を用い、細胞ペレットでのパラフィン切片を作成し使用した。また、組織切片としては、陽性コントロールとして精巣腫瘍、陰性コントロールとして大腸癌組織を用いた。1次抗体として抗ABCトランスポーターである抗BCRP抗体(clone BXP-21, Merck Millipore 製 MAB4146)、2次抗体としてビオチン化 anti-IgG を使用。蛍光標識はストレプトアビジン標識蛍光ナノ粒子PIDを使用した。脱パラフィン・賦活化・ブロッキング後、1次抗体を反応(4°C, overnight)させ洗浄後、2次抗体を反応させ、ストレプトアビジン標識蛍光ナノ粒子により蛍光標識、洗浄後、4%PFAにて固定、水洗し、ヘマトキシリン染色後、脱水・透徹・封入したものを、蛍光顕微鏡(オリンパス社製 BX53、透過光源ハロゲン光源 U-LH100、蛍光光源水銀ランプ、カメラ DP-73)にて観察、蛍光粒子計測はPID Analyzerを用いて行った。

(2) 術前化学療法施行乳癌症例での検討

抗癌剤耐性と乳癌幹細胞との関連を明らかにするため、当院での初発乳癌手術症例における、手術前に抗癌剤を投与しても腋窩リンパ節転移が遺残していた症例の選定と、ホルモン受容体、HER2 ステータスなどの臨床病理学的検討を行った（東北大学倫理委員会 承認番号 2015-1-603）。2004～2010 年に当院で手術を行いリンパ節転移陽性と診断された 49 例の原発巣および転移リンパ節巣の切除標本を対象として免疫組織学的に解析を行った。また、術前化学療法前後の変化を検討するために、同症例中から標本作成が可能であった 35 例の術前治療前の針生検検体に対しても同様の検討を行った。更に無作為に抽出した再発症例 7 例と、無再発群 6 例の術前化学療法前の針生検検体を用いて（1）と同様の方法で BCRP の nano patho score を算出し、臨床病理学的因子との比較検討を行った。

4. 研究成果

（1）乳癌培養細胞及び組織標本での ABC トランスポーターの染色性検討

上記方法で蛍光染色を行い、細胞当たりの平均粒子数、即ち細胞当たりのアクセス可能な BCRP 蛋白数の平均は、A549: 169.0、HEK293: 111.5、SKBR2: 79.5、1 次抗体なしのネガティブコントロール: 5.7 であり、陽性細胞 (A549, HEK293) と低発現細胞 (SKBR3) 間で 1.4～2.1 倍の差があり、細胞数当たり粒子数は陽性細胞 (A549, HEK293) とネガティブコントロール間で 25.5～29.9 倍の差が認められ、良好に BCRP 蛋白を染め分けることが可能であった（図 1）。

図 1. 培養細胞での BCRP 蛋白の蛍光免疫染色と蛋白定量

	A549	HEK293	SKBR3	Negative control
明視野				
暗視野				
BCRP Nano patho score	169.0	111.5	79.5	5.7

更に文献的に BCRP 陽性組織として用いられる精巣腫瘍組織と、陰性組織として用いられる大腸癌組織のホルマリン固定後パラフィン標本の薄切切片での蛍光免疫染色による BCRP 蛋白の高感度定量化を行った。結果として、精巣腫瘍の細胞当たり粒子数 135.0～180.0、大腸癌組織の細胞当たり粒子数が 9.5～13.4 となり、その粒子数比が、13.4～14.2 と高く、自家蛍光が強く蛍光免疫染色による定量化が困難とされていたパラフィン包埋組織標本においても、蛍光ナノ粒子 PID を用いることで良好に BCRP 蛋白を染め分けることが可能であることを確認した（図 2）。

図 2. 組織標本での BCRP 蛋白の蛍光免疫染色と蛋白定量

	重ね合わせ画像	蛍光画像	細胞当たりの平均粒子数
精巣腫瘍組織			135.0-180.0
大腸癌組織			9.5-13.4

（2）術前化学療法施行乳癌症例での検討
術前化学療法を施行し、原発巣及びリンパ節に癌が遺残していた 49 例において、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2 の発現は、原発巣と転移リンパ節巣の間に有意な相違は見られなかった。転移リンパ節巣のサブタイプ毎の解析では、乳癌幹細胞性の少ないとされる luminal A type は、luminal B type に比較して予後良好であったという結果が得られた。さらに、無作為に抽出した再発症例 7 例と、無再発群 6 例の術前化学療法前の針生検検体を用いて BCRP nano patho score と臨床病理学的因子との比較検討を行った結果、悪性度の指標となる Ki67 と BCRP nano patho score の相関係数は 0.623 と有意な相関を認めた ($p=0.023$) が、BCRP nano patho score と再発の有無について有意な相関は認められなかった（再発群: 11.3-24.0、無再発群: 8.8-15.6、 $p=0.317$ 、図 3）。

図 3. 術前化学療法施行乳癌症例組織標本での BCRP 蛋白の蛍光免疫染色と蛋白定量

	重ね合わせ画像	蛍光画像	細胞当たりの平均粒子数
再発症例			11.3-24.0
無再発症例			8.8-15.6

これらの結果より、症例数の少ない検討であるが、化学療法耐性及び乳癌幹細胞性との関連が考えられる ABC トランスポーターは、術前治療前の原発巣での細胞当たりの BCRP 蛋白量の平均と予後とに相関が認められないことが示唆された。

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 3 件)

1. 多田 寛, 郭 墨蓉, 宮下 穰, 権田 幸祐, 大内 憲明: ナノテクノロジーの乳癌診療へ

の応用. *日本臨牀* 75: 180-185, 2017 (査読なし)

2. Tada H, Gonda K, Miyashita M, Ohuchi N: Potential Clinical Applications of Next Generation Fluorescence Immunohistochemistry for Multiplexed and Quantitative Determination of Biomarker in Breast Cancer. *Int J Patho Clin Res* 2:022, 2016 (査読あり)

3. Nemoto N, Shibahara Y, Tada H, Uchida K, McNamara KM, Chan MS, Watanabe M, Tamaki K, Miyashita M, Miki Y, Gonda K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Clinical significance of subtype classification in metastatic lymph nodes of breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Int J Biol Markers*. 30(2), 174- 183. 10.5301/jbm.5000128. 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 多田 寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 渡辺みか, 大内憲明. 乳癌各種バイオマーカーの1粒子蛍光ナノイメージングによる定量的病理診断と臨床的意義. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日~5月14日, 仙台, 仙台国際センター

2. 多田 寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 鈴木昭彦, 渡部 剛, 原田成美, 佐藤章子, 渡辺みか, 石田孝宣, 大内憲明. 蛍光ナノ粒子PIDを用いたHER2・Ki67定量化とヒストグラム解析による術前抗HER2療法の治療効果予測の検討(ワークショップ(4)「乳癌個別化治療を目指した新規診断法の開発の最前線」). 第116回日本外科学会定期学術集会. 2016年4月14日, 大阪, リーガロイヤルホテル大阪.

3. 多田 寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 鈴木昭彦, 渡部 剛, 佐藤章子, 渡辺みか, 石田孝宣, 大内憲明: 蛍光ナノ粒子を用いた高感度HER2定量化のための基礎的検討と臨床応用. 第23回日本乳癌学会学術総会, 2015年07月02日~2015年07月04日, 東京, 東京国際フォーラム

4. 多田 寛, 権田幸祐, 宮下 穰, 鈴木昭彦, 渡部 剛, 渡辺みか, 石田孝宣, 大内憲明: 新規蛍光ナノ粒子を用いた定量的免疫組織診断法と乳癌抗HER2療法の治療効果予測. 第115回日本外科学会定期学術集会, 2015年04月16日~2015年04月18日, 名古屋, 名古屋国際会議場

〔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 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

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
(2)研究分担者
大内 憲明(Ohuchi Noriaki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号:90203710

権田 幸祐(Gonda Kohsuke)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号:80375435

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
根本 紀子(Nemoto, Noriko)
東北大学・医学系研究科・大学院生