

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10058

研究課題名(和文) 乳癌における新規腫瘍マーカーMECA-79の臨床的意義と転移における機能解析

研究課題名(英文) Ectopic expression of MECA-79 in breast cancer

研究代表者

阿部 宣子 (Abe, Noriko)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30622336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胃癌症例の約20%に糖鎖抗原MECA-79が異所性に発現し、予後に関連することを報告した。本研究では、MECA-79の乳癌における臨床的、生物学的意義について、手術検体および培養細胞株を用いて、主に免疫組織学的検討やフローサイトメトリー等により検討した。胃癌・大腸癌などの消化器癌に比べ、乳癌組織におけるMECA-79発現陽率は5%程度と非常に低く、臨床病理学的因子や予後との関連は認められなかった。乳癌細胞株はいずれも細胞表面にMECA-79発現を認めなかった。乳癌における異所性MECA-79発現の意義は不明でありさらなる検討を要する。

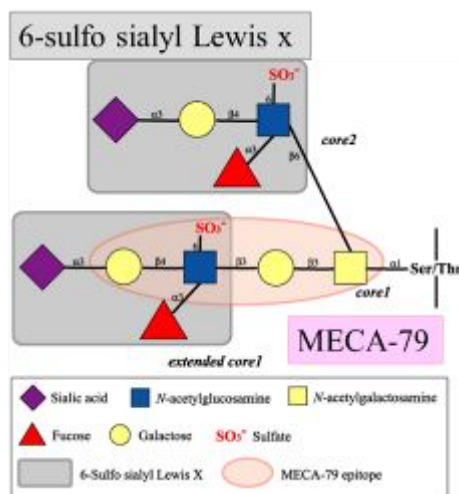
研究成果の概要(英文)：We previously reported that a carbohydrate determinant, MECA-79, is ectopically expressed in gastric cancer, and is associated with clinical outcomes. The present study attempted to focus on the clinical and functional implication of MECA-79 expression in breast cancer, using breast cancer specimens and breast cancer cell lines, mainly by immunohistochemistry and flow cytometry. Unlike gastric and colorectal cancer, only approximately 5% of breast cancer was considered positive for MECA-79 expression, although MECA-79 expression was occasionally observed in membrane and/or cytoplasm of breast cancer cells. MECA-79 expression was not significantly associated with clinicopathological parameters or clinical outcomes in breast cancer. Flow cytometric analysis revealed that cell surface MECA-79 expression was found in none of the 5 breast cancer cell lines. The role of ectopic expression of MECA-79 in breast cancer remains unclear, and further studies would be required.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

日本のがん死亡数あるいは罹患数の上位を占めているのは胃癌、大腸癌、乳癌などの固形癌である。胃・大腸癌は罹患数においてそれぞれ1・2位、死亡数のそれぞれ2・3位を占める。乳癌は女性において最多の罹患数を示す。これら固形癌は進行とともに肺、肝、脳、骨など全身諸臓器へ遠隔転移をきたす。比較的早期の症例に対しては手術や化学療法が効果的であるが、再発や転移を来すと不良な転帰をたどることも少なくない。それゆえ早期癌においては一定割合存在する予後不良症例(易再発・転移例)の抽出と介入、進行癌症例においては再発・転移機序の解明とそれに基づく治療法の開発が求められていると考える。



糖鎖抗原は古くから血清腫瘍マーカーとして広く臨床応用されており、代表的なものにシアリルルイス A および X (CA19-9 および SLX)がある。近年当研究室は、MECA-79 と呼ばれる糖鎖抗原が胃癌に発現していることを報告した(引用文献)。MECA-79 はシアリルルイス X 構造にやや近似するもの硫酸基の付加などの特徴的な構造を有し(上図) 既知の糖鎖マーカーとは異なる意義が推測され、MECA-79 が新たな臨床腫瘍マーカーとなり得る可能性を強く示している。胃癌組織においては、シアリルルイス X 発現が癌細胞のみでなく、正常胃粘膜にも広範に認められるのに対し、MECA-79 発現は一部特定の細胞(後述)を除いては、癌細胞に特異的である。

2. 研究の目的

CA19-9、SLX など、糖鎖を認識する血清腫瘍マーカーは、日常臨床の場において胃癌のみならず、乳癌や大腸癌をはじめとする種々の固形癌に対しても広く使われている。代表的な固形癌である乳癌における MECA-79 発現の臨床的意義、特に転移や予後との関連を検討することが本研究の第1の

目的であり、同時に硫酸基転移酵素にも着目し、その遺伝子発現レベルでの臨床的意義を追求するものである。MECA-79 はリンパ組織の特殊な血管内皮(高内皮細静脈:High endothelial venules:HEV)に発現し、血液中リンパ球上の L-セレクトインとの接着(リンパ球ホーミングと呼ばれる免疫機構)に関連している。MECA-79 が癌細胞表面に発現し、また(少なくとも胃癌においては)遠隔転移と関連していることから、MECA-79 を発現する癌細胞はこの免疫機構を模倣することで遠隔転移を促進していると推測できる。L-セレクトインが癌転移を促進することはすでによく知られている。その概要は血液中で L-セレクトインを発現する白血球が癌細胞を取り囲み細胞集塊となって、遠隔臓器の微小な血管に捕捉され転移巣を形成するというものである。このことから、MECA-79 は L-セレクトインとの接着を介して遠隔転移を促進するという仮説が成り立つと考える。よって第2の目的は、MECA-79 の乳癌における生物学的意義を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 乳癌培養細胞株における MECA-79 発現 (フローサイトメトリー:FACS)

すでに11株の胃癌細胞株のうち、唯一 MKN7 細胞が MECA-79 を発現することを確認している(これは下記の細胞実験において陽性コントロールとなる。抗体は Santa Cruz 社の Rat mAb を用いる)。さらに我々の所有する乳癌細胞株に対し、FACS により細胞表面の MECA-79 発現の有無を検討する。

(2) 乳癌手術摘出標本の免疫組織学的検討 (免疫染色)

当研究室で保有している乳癌約100例のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)切片を用いる。これらはすべて10年以上経過しており、匿名化された臨床データが付属しており、十分に予後の解析が可能である。MECA-79 モノクローナル抗体による免疫染色を行い(文献)、腫瘍部に対し MECA-79 染色陽性および陰性を判定する。癌近傍の非腫瘍組織が利用可能な場合これについても染色性を評価する。なお癌組織内リンパ濾胞部を中心に存在すると思われる、MECA-79 に染色される脈管(HEV:位置的・構造的に鑑別は容易である)が陽性コントロールとなる。

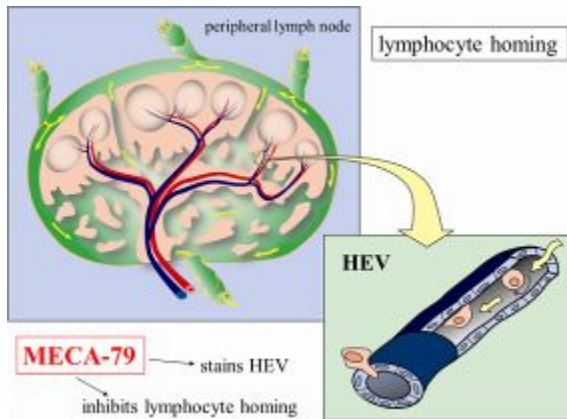
(3) 上記をベースとした生物学的意義、臨床的意義の検討

4. 研究成果

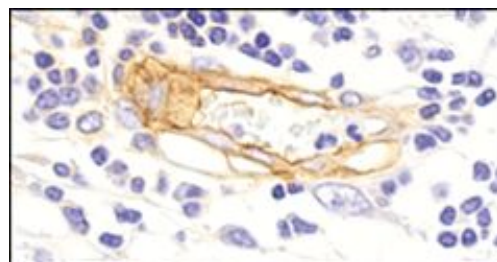
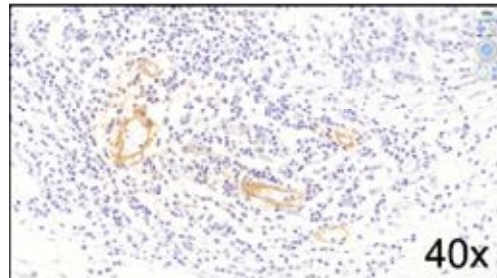
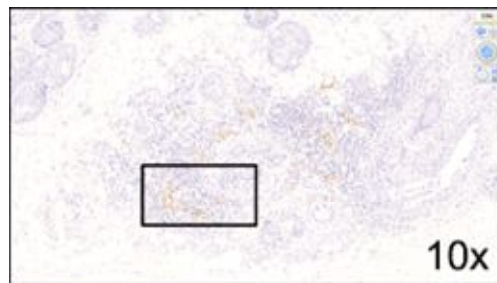
(1) 乳癌組織および胃癌・大腸癌組織検体を用いた MECA-79 免疫組織学的検討

胃癌組織（文献 ）および大腸癌組織（未発表）において MECA-79 の免疫組織学的検討をそれぞれ、120 症例超に対して施行している。後述のようにそれぞれにおいて MECA-79 陽性は 22%、38% 程度である。

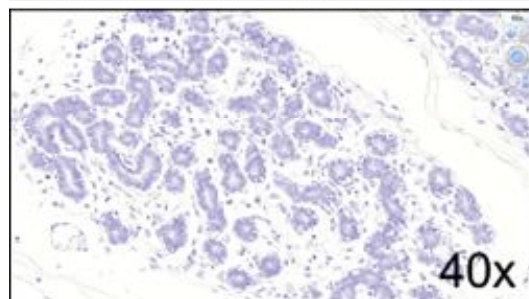
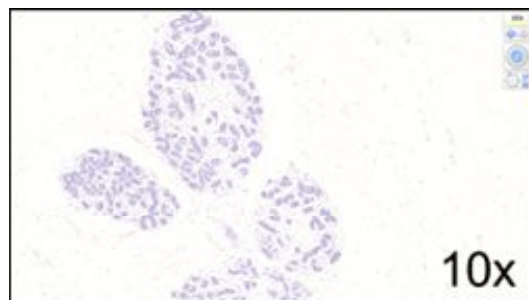
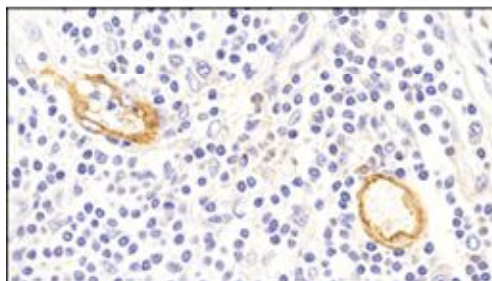
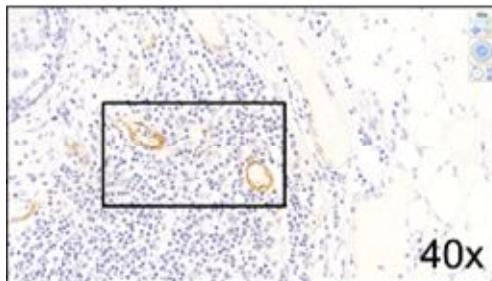
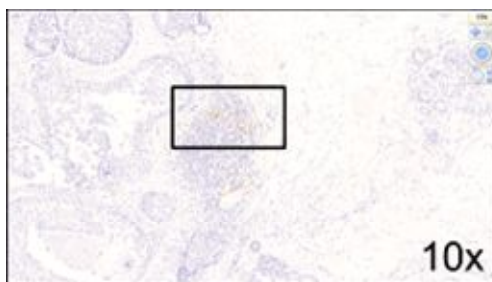
本研究では手術により切除された乳癌組織検体 122 例を使用した。当施設における倫理委員会に承認されたものである。



上図のように、MECA-79 はリンパ組織の特殊な血管内皮（高内皮細静脈：High endothelial venules: HEV）に発現し、血液中リンパ球上の L-セレクチンとの接着（リンパ球ホーミングと呼ばれる免疫機構）に関連している。したがって、扁桃やリンパ節などに限らず、各組織の 3 次リンパ濾胞内の HEV に MECA-79 発現が認められる。



上図のように乳腺組織、乳癌組織内に認められるリンパ濾胞には MECA-79 により染色される HEV を散見する。一方でリンパ球やその他の間質組織は染色されない。以上は本抗体を用いた免疫染色の陽性コントロールとなっており、本手法の妥当性が示された。



次に正常（非腫瘍）乳腺組織について検討したが、上図のように乳管上皮細胞は全く染色されないことが分かった。これは胃粘膜や大腸粘膜の検討でも同様であり、MECA-79 は非腫瘍部の上皮細胞や、HEV を除く間質細胞

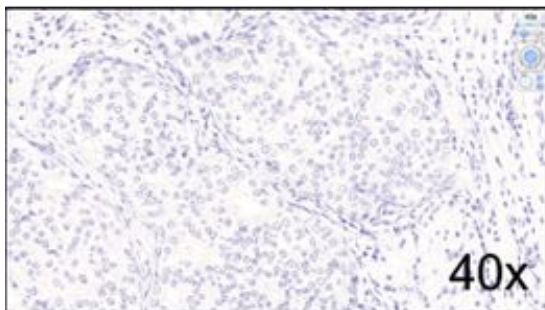
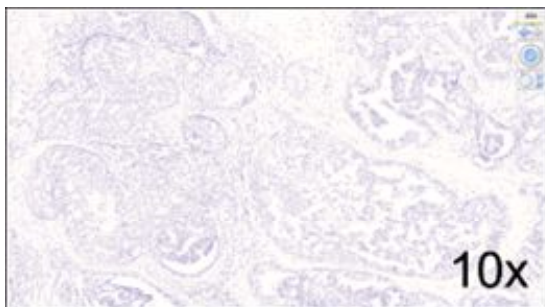
には基本的に発現しないことが示唆される。一方、少なくとも胃癌、大腸癌において、腫瘍細胞（の一部）に異所性に MECA-79 が発現することから、乳癌においても同様に腫瘍細胞における MECA-79 異所性発現をまず評価すべきと考えた。

以上から 122 例の乳癌組織において MECA-79 免疫染色を行い発現の評価を行った。

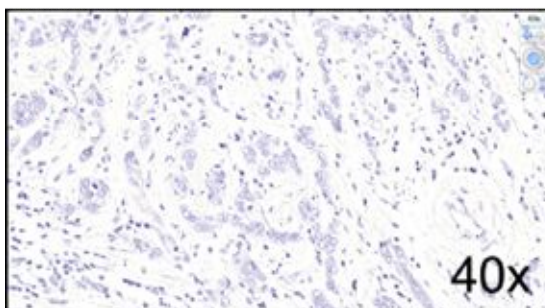
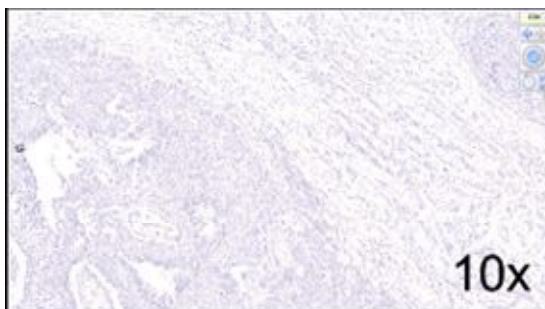
一部の乳癌細胞において、MECA-79 はやはり異所性に発現しており、細胞膜、細胞質に染色がみられた。しかし、後述するように胃癌や大腸癌に比べ、MECA-79 陽性症例は少なく、7 例(5.7%)を MECA-79 陽性と判定した。

下に MECA-79 陰性および陽性症例を提示する。

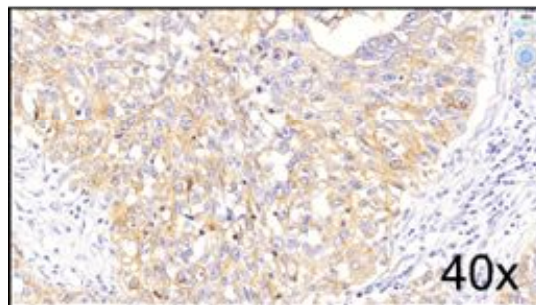
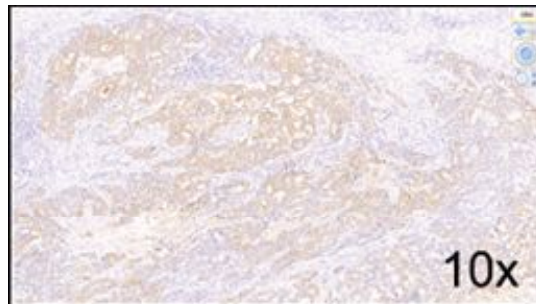
症例 1 (MECA-79 陰性)



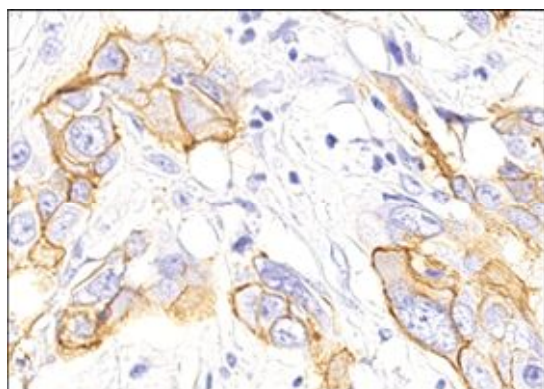
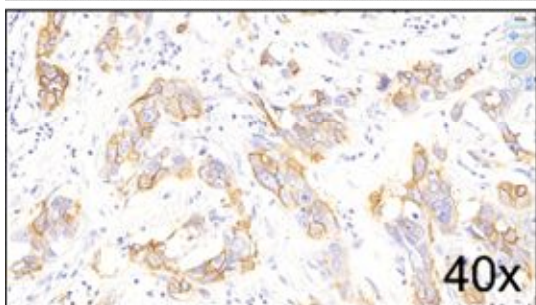
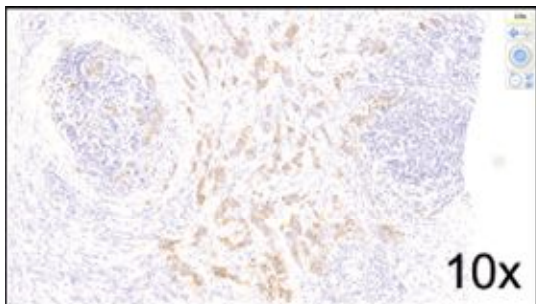
症例 2 (MECA-79 陰性)



症例 3 (MECA-79 陽性)

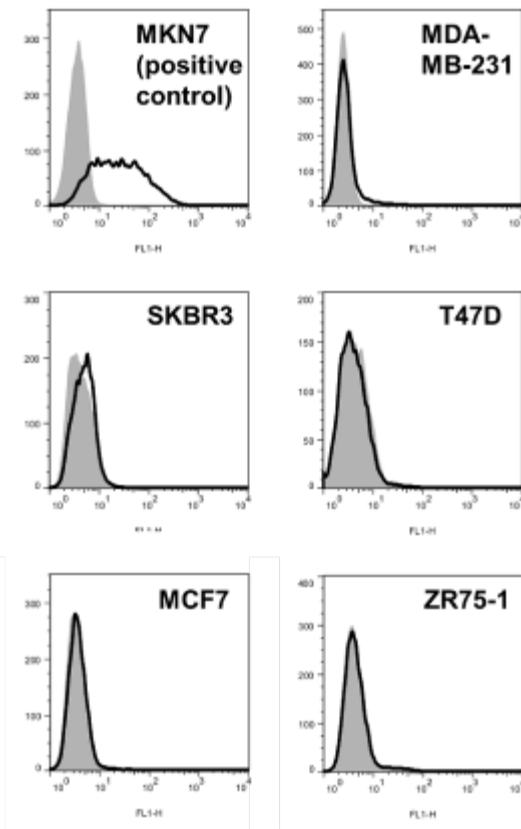


症例 4 (MECA-79 陽性)



MECA-79 発現と臨床病理学的因子や再発部位、予後との検討を試みたが、特定の因子との統計学的に有意な関連は認めなかった。陽性症例が 5%程度と極めて少ないことが、本検討において大きな limitation となった。したがって、乳癌における MECA-79 の臨床的意義は現時点では不明と言わざるを得ない。

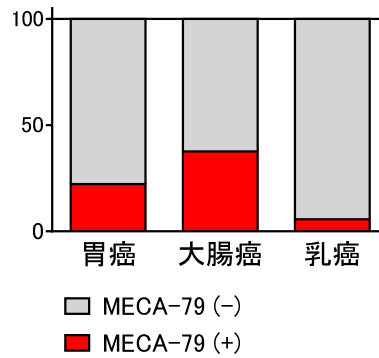
また培養細胞株を用いて採苗表面における MECA-79 発現の検討を行った。フローサイトメトリーにより、胃癌 (11 株、既報)、大腸癌細胞株 (12 株) と合わせ、乳癌細胞株 5 株を使用した。胃癌細胞株 MKN7 が MECA-79 を発現することが分かっており、ポジティブコントロールとして使用した。乳癌細胞株は MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、T47D、ZR75-1 を使用した。



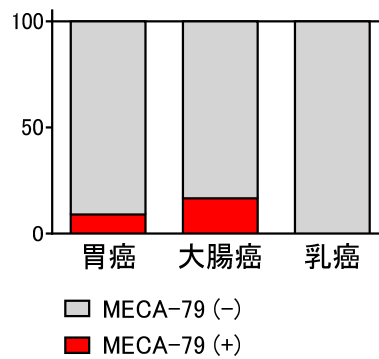
しかし上図のように胃癌 MKN7 では MECA-79 発現が認められるが、乳癌細胞 5 株ではいずれも発現していないことが分かった。

以上の結果をまとめると次図ようになる。すなわち、胃癌・大腸癌ではヒトの癌組織において 20-30%が MECA-79 陽性であり、細胞株でも一部陽性株があるのに対し、ヒト乳癌組織では 5%程度の陽性率であり、今回検討した細胞株では陽性株を認めなかった。

癌切除標本



癌培養細胞株



以上から、乳癌の一部症例で MECA-79 陽性が確認できたものの、臨床的意義、生物学的意義については十分な結論を示すことができていない。さらなる検討を行っていく。

引用文献

Okayama H, et al. Ectopic expression of MECA-79 as a novel prognostic indicator in gastric cancer. *Cancer Sci.* 102(5):1088-94 (2011).

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 7 件)

Saito M, Goto A, Abe N, Saito K, Maeda D, Ohtake T, Murakami Y, Takenoshita S. Decreased expression of CADM1 and CADM4 are associated with advanced stage breast cancer. *Oncology letters* 15(2):2401-2406 (2018).

Aoto K, Mimura K, Okayama H, Saito M, Chida S, Noda M, Nakajima T, Saito K, Abe N, Ohki S, Ohtake T, Takenoshita S, Kono K.

Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 39(1):151-159 (2017).

Gonda K, Shibata M, Ohtake T, Matsumoto Y, Tachibana K, Abe N, Ohto H, Sakurai K, Takenoshita S. Myeloid-derived suppressor cells are increased and correlated with type 2 immune responses, malnutrition, inflammation, and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncology Letters* 14(2):1766-1774 (2017).

Abe N, Ohtake T, Saito K, Kumamoto K, Sugino T, Takenoshita S. Clinicopathological Significance of Lymphangiogenesis of Detected by Immunohistochemistry Using D2-40 Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *Fukushima Journal of Medical Science* 62(1) 57-63 (2016).

阿部宣子、大竹徹、佐治重衡。女性ホルモンと乳癌。乳癌の臨床 2016, 31 187-92

立花和之進、大竹徹、佐治重衡。シグナル伝達系に関する新規ホルモン療法の治療戦略。癌と化学療法 2016, 43(13) 2509-2512

岡野舞子、大竹徹、佐治重衡。乳癌に対する分子標的治療薬の併用療法の可能性。癌と化学療法 2016, 43(12) 2022-2025

〔学会発表〕(計 3 件)

立花和之進、岡野舞子、岡山洋和、阿部貞彦、村上祐子、野田勝、阿部宣子、吉田清香、大竹徹。トリプルネガティブ乳癌における Annexin A1 の発現と臨床病理学的因子との関連および予後の検討。第 25 回日本乳癌学会。2017

Okano M, Okayama H, Ohtake T, Kawaguchi T, Yan L, Qi Q, Liu S, Takabe K. Clinical Relevance of Annexin A1 in Triple-negative Breast Cancer Patients. 12th Annual Academic Surgical Congress. 2016.

青砥慶太、河野浩二、千田峻、野田勝、中島隆宏、岡山洋和、阿部宣子、立花和之進、岡野舞子、大木進司、大竹徹、竹之下誠一。乳癌における化学療法が惹起する Immunogenic tumor cell death の検討。第 24 回日本乳癌学会。2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 宣子 (ABE, Noriko)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：30622336

(2) 研究分担者

岡山 洋和 (OKAYAMA, Hirokazu)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20583397

大竹 徹 (OHTAKE, Tohru)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50363750