

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15108

研究課題名(和文) 乳癌における膜型ERの蛍光ナノ粒子による高精度定量化及び臨床検体におけるその応用

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of estrogen receptor and the validation for breast cancer by nano particle-based immunohistochemistry

研究代表者

吉田 紀子 (Yoshida, Noriko)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70749788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：5種類の乳癌細胞株において、ER、PgRを標的に蛍光ナノ粒子を標識した1次抗体を用いた免疫染色を施行し、各乳癌細胞株の異なるER、PgR発現状況に応じたER、PgR-蛍光粒子シグナルを検出することに成功した。また核内でのシグナルの局在についても明らかにした。FACSにてER、PgRの抗原量を測定し蛍光ナノ粒子のスコアを対比したところ、ER、PgRそれぞれにおいて強い正の相関を認めた(R:0.94-0.98)。本検討から、ER、PgRに関して核内・膜型を問わず高精度に定量化することに成功し、従来のDAB法と比較して精密のその多寡を評価することが可能であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We have developed highly quantitative method to evaluate expression of ER and PgR in vitro. The expressing diverse level of ER and PgR in breast cancer specimens are stained by nano particle-based IHC. ER positive breast cancer cell lines (MCF7, T47D, BT474), ER negative breast cancer cell lines (ZR-75-1, MDA-MB-231) are processed into paraffin-embedded cell blocks. Then samples are separately stained by IHC with DAB (DAB-IHC) and nano particles (nano-IHC). Results of flow cytometry showed correlation to that of nano-IHC. The results of nano-IHC score showed that fluorescence of ER positive cells was increased in an expression level dependent manner which was difficultly distinguished by DAB-IHC. This study indicated that in breast cancer specimens, nano-IHC is generate sensitively quantitative than DAB-IHC. Thus nano-IHC might be provide highly quantitative method to evaluate the expression of ER and PgR, which were proposed in the new IHC-based surrogate biomarker for breast cancer.

研究分野：ナノ医科学

キーワード：乳癌 ER 蛍光ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

わが国の乳癌罹患率、死亡率の増加は著しく、その発生・増殖に関与する主な因子にエストロゲン受容体(ER)があげられる。ER陽性乳癌は乳癌全体の70-80%を占め内分泌療法が有効であり比較的予後良好だが、内分泌療法に耐性を示し予後不良な症例も散見される。その理由の一つに、アロマターゼ阻害剤(AI)投与に伴うエストロゲン枯渇によって誘導される膜型ER増殖の関与が報告されている。エストロゲンは核内転写調節因子であるERと結合し二量体を形成し転写因子を誘導する。このgenomic action(ゲノム対象シグナル伝達経路)は、AI投与でエストロゲン合成が阻害されることによって抑制される。一方で近年、エストロゲンが枯渇しgenomic actionが抑制されると膜型ERが発現することが報告された。膜型ERはエストロゲン膜貫通受容体であり微量なエストロゲンのシグナルをヒト上皮増殖因子受容体であるHER(human epidermal growth factor receptor)-familyなどの膜型増殖因子に伝え、MAPKやPI3K/Akt経路のリン酸化を引き起こしリガンド非依存性にERの転写活性を引き起こす。このNon-genomic actionは急速に腫瘍増殖を促し予後に関与するとされる。しかし、現在までにヒト乳癌組織(臨床検体)において膜型ERの発現量・発現部位を明確に示したものは無く、膜型ER発現量が下流のシグナルや薬物治療効果・予後に与える影響は明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的として以下の3点を挙げる。

(1) 独自の蛍光ナノ粒子を用いた高精度蛋白定量法を用いて膜型ER発現量の定量化法を確立する。

(2) 行程で定量化した膜型ER発現量と、下流のPI3K/Akt経路やMAPK経路各因子の遺伝子発現解析結果を対比し、膜型ERが

Non-genomic actionに与える影響をヒト乳癌組織で明らかにする。

(3) 膜型ER発現量とER陽性乳癌の内分泌療法の効果・予後を検討し、さらにはmTOR阻害剤投与症例で膜型ER発現量・下流各因子遺伝子発現量と同薬剤の治療効果を検討する。

本研究の学術的な意義としては、過去にヒト乳癌組織を用いて膜型ER発現量を定量化した研究はない。膜型ER低発現例は予後良好で内分泌療法によって治療可能であり、膜型ER高発現例は内分泌療法の効果が低く予後不良と予想される。さらに膜型ER高発現例でも、下流シグナル亢進例は下流因子の標的治療が併せて必要であり、下流シグナル低下例では膜型ERを標的とした内分泌療法が中心になると予想される。このようなER陽性乳癌に対する個別化治療の実践を可能にするのは、蛍光ナノ粒子を用いて膜型ER発現量を高精度に定量化することが重要と考えられる。

3. 研究の方法

「概要」まず始めに蛍光ナノ粒子を用いたER、PgRの免疫染色の手法を確立した。その後、他の蛋白定量法との比較によって整合性を確認した。これらはIn vitroにて開始し、手法が確立されたのちに、ヒト乳癌組織に応用した。ヒト乳癌組織においてER、PgRの定量化を確立した後に、癌細胞内でのER、PgRの局在性を明らかにした。

「具体的な方法」In vitro(cell line:T47D、BT474、MCF7、ZR-751、MDA-MB231)で蛍光ナノ粒子とER、PRの結合性を確認し、その定量性を検証した。抗ER、PgR一次抗体、ビオチン結合二次抗体、アビジン結合蛍光ナノ粒子を用いて、それぞれER・PgRの発現量が異なる乳癌細胞株のパラフィン包埋切片に順に反応させ、研究室で構築した蛍光顕微鏡で観察・計測を行い、解析ソフトを用いて定

量化した。同時に、乳癌細胞株の ER、PgR 蛋白質発現量をフローサイトメトリーで解析した。その結果と蛍光ナノ粒子を用いた定量結果とフローサイトメトリーによる定量結果の相関性を検証した。

次に蛍光ナノ粒子を用いて、ER+/HER2-乳癌の初発乳癌手術検体で ER、PgR の発現量を定量する実験を行った。臨床検体でも ER、PgR の高発現量と低発現量を正確に判別可能にすべく条件の詳細な検討を行った。また、従来の IHC 法に比べ、陽性細胞割合だけではなく、各細胞内での ER、PgR 分布の不均一性も表現することが可能となるような染色条件の検討を行った。本研究は一貫して蛍光ナノ粒子を用いて病理組織を染色し、蛍光顕微鏡で撮影された組織画像はデジタル化され、画像アルゴリズムにより「細胞核解析モジュール」と「輝点解析モジュール」で解析した。細胞核解析モジュールでは細胞の数や面積を測定、輝点解析モジュールでは輝点（発光している点）をカウントして蛍光ナノ粒子の数に変換する。この粒子解析によって得られた情報をスコア化し、臨床検体においてより客観的で定量的な蛋白発現量の情報を取得することを行った。

4．研究成果

現在、乳癌の治療はそのサブタイプに応じて治療を選択することが必要であり、そのなかで Luminal A と Luminal B の区別が最も重要でありかつ難しくなっている。多遺伝子解析に行うことは出来るが、高価であるがゆえに実臨床で用いるのが難しい。一方で現行の DAB 法では真に ER、PgR 発現量を精度よく判定できているかは疑問の残るところである。よって我々は独自の蛍光ナノ粒子を用いた高精度蛋白定量法を用いて核内 ER、膜型 ER、さらには PgR についてもその発現量を定量化し、より精度よく ER、PgR 発現を見ることで予後に与える影響を明らかにすることを目

的とした。

まず始めに、5 種類の乳癌細胞株（BT474, MCF7, T47D, ZR-75-1, MDA-MB-231）において、核内 ER、PgR を標的に蛍光ナノ粒子で標識した 1 次抗体を用いた免疫染色を施行した。その結果、各乳癌細胞株の ER、PgR 発現状況に応じた ER-蛍光粒子シグナル、PgR-蛍光粒子シグナルが検出された。また、通常の DAB 免疫染色では検出されない ER、PgR 蛋白が、ER、PgR 低発現細胞において検出可能であった。以上の染色条件を確立した後に、in vitro で同様の乳癌細胞株（MCF-7, BT474, ZR-75-1, MDA-MB231）で通常の DAB 染色と蛍光ナノ粒子を用いた IHC を施行し対比したところ、DAB 染色に染色性と、蛍光ナノ粒子のスコアは相関関係にあった。続いて、FACS にて ER の抗原量を測定し蛍光ナノ粒子のスコアを対比したところ、強い正の相関を認めた（ $R: 0.98$ ）。同様の検討を PgR に関して行ったところ、こちらも強い正の相関を認めた（ $R: 0.94$ ）。また、ER、PgR のシグナルに関しては、癌細胞内での局在を明らかにすることに成功した。

本検討から、ER、PgR に関して核内・膜型を問わず高精度に定量化することに成功し、従来の DAB 法と比較して精密のその多寡を評価することが可能であることを証明した。

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. Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging. Gonda K, Miyashita M, Higuchi H, Tada H, Watanabe TM, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. *Scientific Report*. 2015 Sep 22;5:14322. doi:

- 10.1038/srep14322. 査読あり
- Highly Sensitive Imaging of Cancer with Functional Nanoparticles. Gonda K, Hamada Y, Kitamura N, Tada H, Miyashita M, Kamei T, Ishida T, Ohuchi N. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 2015 28:701-706. 査読あり
 - Clinical significance of subtype classification in metastatic lymph nodes of breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Nemoto N (Yoshida 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. *Int J Biol Markers*. 2015 May 26;30(2):e174-83. doi: 10.5301/ijbm.5000128. 査読あり

[学会発表](計4件)

- Zhaorong Guo, 多田寛, 北村成史 他(3人省略). Quantitative evaluation methods of hormone receptors in vitro and breast cancer patient specimens by new fluorescence nanoparticle-based IHC. A3 symposium. 2017年1月16日. 韓国、ソウル.
- Zhaorong Guo, 多田寛, 北村成史 他(3人省略). Highly quantitative evaluation methods of breast cancer biomarker using novel fluorescence nano particles. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月7日. パシフィコ横浜、横浜市.
- Zhaorong Guo, 多田寛, 北村成史 他(3人省略). Highly quantitative evaluation methods of progesterone receptor of breast cancer subtype classification by

- immunohistochemistry using fluorescence nano-particles. ナノ学会 第14回大会. 2016年6月16日. 北九州国際会議場、北九州市.
- 宮下穰. New diagnostic method of HER2 in breast cancer using single fluorescence nanoparticle imaging. 第104回日本病理学会総会. 2015年5月1日. 名古屋国際会議場、名古屋市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 紀子 (Yoshida Noriko)
 東北大学・医学系研究科・非常勤講師
 研究者番号: 70749788

(2)研究分担者

石田 孝宣 (Ishida Takanori)
 東北大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号: 00292318

多田 寛 (Tada Hiroshi)
 東北大学・大学病院・講師
 研究者番号: 50436127

宮下 穰 (Miyashita Minoru)
 東北大学・大学病院・助教
 研究者番号: 60710788

渡部 剛 (Watanabe Gou)
 東北大学・医学系研究科・助教
 研究者番号: 70451573

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