

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06988

研究課題名(和文) アポクリン癌を含むアポクリン病変診断の分子病理学的再構築

研究課題名(英文) Molecular pathology reconstruction of the diagnosis of apocrine lesions, including pocrine carcinoma.

研究代表者

小塚 祐司 (Kozuka, Yuji)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50378311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アポクリン変化は乳腺の形質転換の一つあるが、浸潤性アポクリン癌あるいはアポクリン型非浸潤性乳管癌に明白な良性病変、境界的な病変が共存することが明らかになり、境界病変と癌に境界が不明瞭で連続性を有する症例も見いだされた。アポクリン病変の筋上皮細胞数的・抗原性変化は、種々の構築・腫瘍周囲環境によって異なっていた。p53 と MIB-1 陽性細胞率もヘテロな陽性分布を示した。局所腫瘍微小環境の検討では、腫瘍免疫応答に乏しいグループに属することが示唆された。大部分の癌細胞は一次線毛を発現していなかったが、一部症例にびまん性の発現を認め、CK5/6が陽性であり、新規の組織型には該当する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳腺アポクリン病変は、診断者が各自の判断に基づいて診断を行っている現状があり、病変の全体像を観察しても良悪性の判断が分かれる症例も存在する。個々の症例に対して最適な治療を行うためには、診断基準の確立が必要であった。

今回の研究で、良性病変と境界的な病変が共存すること、境界病変と癌に連続性を有する症例が存在し、筋上皮細胞数的・抗原性変化は、構築・腫瘍周囲環境によって異なり、p53 と MIB-1 陽性細胞はヘテロに分布し、腫瘍免疫応答に乏しいグループに属することが示唆された。線毛発現を伴うアポクリン様分化癌も見いだしたが、既報組織型には該当しない症例と考えられた。今後さらに検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Apocrine changes, a transformation are seen in the mammary gland. The research revealed the coexistence of invasive apocrine carcinoma or apocrine-type ductal carcinoma in situ of the mammary gland with apparent benign and borderline lesions, with some cases of borderline lesions and carcinomas having indistinct and continuous borders. Myoepithelial cellular and antigenic changes in apocrine lesions differed according to various structures and peritumoral environments. p53 and MIB-1 positive cell rates also showed a heterogeneous positive distribution. Examination of the local tumor microenvironment suggested that the cells belonged to a group with poor tumor immune response. Most cancer cells did not express primary cilia, but diffuse expression was observed in some cases. In those cases, CK5/6 was positive, which may apply to the new histology.

研究分野：病理診断学

キーワード：乳腺病理 アポクリン CK5/6

1. 研究開始当初の背景

乳腺病理診断におけるアポクリン病変には、明白な「良性病変」と「悪性病変」の間に、診断コンセンサス形成に至っていない「境界領域」が存在する。乳腺におけるアポクリン病変は、通常型の浸潤性乳管癌や特殊型である浸潤性小葉癌、粘液癌、化生癌などと異なり、診断者が各自の判断に基づいて診断を行っている現状がある。同一の病態と思われるアポクリン乳頭状病変に関しては、“癌”とする報告と“良性”とする報告が行われており、推奨する治療法も異なっている。生検で見いだされたアポクリン病変に悪性の指標となりうる異型の一部を認めた場合、腫瘍摘出等により全体像を把握して判断する必要があり、かつ病変の全体像を観察しても良悪性の判断が分かれる症例も存在する。悪性病変であるアポクリン癌に関しても、判断基準が診断者によって異なるため、乳癌全体の0.3%~4%と報告により頻度に差がある(WHO分類)。また近年提唱されている遺伝子プロファイリングに基づくサブタイプ分類によるmolecular apocrine subtypeとHE染色に基づく形態学的診断であるアポクリン癌は完全には一致しない。Molecular apocrine subtypeに占める従来の組織学的アポクリン癌の比率は、6.8%~60.7%と報告により大きな差があり、その診断とそれに基づく治療に混乱をきたしている。アポクリン病変での付加的遺伝子変異が、腫瘍の進展に関与している可能性が高いものと推定されるが、1症例の中で良性アポクリン病変と境界病変、アポクリン癌を対比して解析した報告はなく、実際に遺伝子変異が「付加」されたのかについての詳細な検討はなされていない。境界病変とアポクリン癌の個々の症例に対して最適な治療を行うためには、アポクリン病変の明確な診断基準の確立が必要である。

2. 研究の目的

良性アポクリン病変とアポクリン癌において、各病変の種々の免疫組織学検討では有意差が存在することは報告されているが、その比較報告は少なく、共存病変での比較検討や臨床病理学的因子との詳細な検討は行われていない。組織学的にアポクリン形態を示し、エストロゲン受容体(ER)とプロゲステロン受容体(PgR)が陰性、アンドロゲン受容体(AR)陽性の癌をPure apocrine carcinoma、組織学的にアポクリン形態を示し上記のホルモン受容体発現パターンではない癌をApocrine-like carcinomaと分けて分類する診断も提唱されているが、両者の起源が同一のものか別個に発生するものなのかの検討はなされていない。今回の研究で、共存病変との比較検討により新たな相関因子と各々の前癌病態、未知の病変を見いだせる可能性がある。

3. 研究の方法

- (1) 症例の収集：問題となるアポクリン病変が含まれる以下の問題症例を選別する
浸潤性乳管癌+アポクリン型上皮の良性/境界/DCIS 隣接共存症例
浸潤性アポクリン癌+アポクリン型上皮の良性/境界/DCIS 隣接共存症例
浸潤性乳管癌とは空間的無関係である嚢胞や乳管内乳頭腫内等のアポクリン型上皮の良性/境界/DCIS 隣接共存症例
- (2) 免疫組織化学の実施：種々の染色を実施する

病理組織学的な再検討を行い、検討対象とする病巣部を特定する。正常乳腺の評価は同一標本内の健常部を用いる。染色は以下を試み、形態と染色結果で Pure apocrine や Apocrine -like を基本とし、より細分化したサブグループに分類する。

- ・サイトケラチン (CK) サブタイプ : CK5, CK6, CK7, CK8, CK14, CK17, CK18
- ・筋上皮マーカー : alpha-SMA, p63, CD10, Calponin
- ・癌関連マーカー : MIB-1, p53, C-KIT, COX2, CD24, CD44s, Cyclin D1, HER2, Cilia, BD2
- ・ホルモン受容体 : ER, PgR, AR

(3) 免疫組織化学結果の評価・解析

(4) 代表的な共存症例に対する解析

(5) 付加的な変化が見いだされた症例に関する追加検討

4 . 研究成果

乳腺病理診断におけるアポクリン病変には、明白な「良性病変」と「悪性病変」の間に、診断コンセンサス形成に至っていない「境界領域」が存在する。病変の全体像を観察しても良悪性の判断が分かれる症例が存在し、悪性病変であるアポクリン癌に関しても判断基準が診断者によって異なっているが、過去症例の検討で、浸潤性アポクリン癌あるいはアポクリン型非浸潤性乳管癌に明白な良性アポクリン病変、境界的な病変が共存、併存することが明らかになり、境界病変と癌にフロントが不明瞭で連続性を有する様な症例も見いだされた。異型度も様々で、各病変の位置関係と関連性の評価の客観性が問題となるものの、アポクリン病変が浸潤癌に至るプロセスは、“Low grade-like” molecular pathway と “high grade-like” molecular pathway のいずれにも該当しないものが含まれ、その進展は限られた針生検検体では予測不能で、現状のアポクリン病変の診断基準は不十分であることが示唆された。アポクリン病変の細胞診報告の検討では、その病変の分布様式からか、「悪性」の診断には至らず、「悪性の疑い」あるいは「鑑別困難」とされているものが多数をしめた。アポクリン病変では良悪性に関わらず筋上皮細胞が減少・消失することがこれまでに論文報告されてきていたが、免疫組織化学での検討では、乳頭状病変と拡張乳管内病変では p63 陽性細胞の減少・消失は観察されたが、SMA、Calponin、CK5/6、CK14 等の抗原性は概ね保持されていた。硬化性腺症を含む硬化性病変内のアポクリン病変では、p63 陽性細胞の減少の程度は軽度にとどまった。アポクリン病変に付随する筋上皮細胞の変化に関しては、乳頭状構築病変、硬化性病変、拡張乳管内病変等の構築・腫瘍周囲環境によって異なることが示唆された。また、P53 と MIB-1 陽性細胞の率は、良性と悪性病変で異なるとされていたが、連続性を有するアポクリン病変では、各々の良性・悪性領域内においても、ヘテロな陽性細胞分布を示すことが明らかになり、良悪性、悪性 Grade に関わらず、MIB-1 index は低値にとどまっていた。

乳癌においてはサブタイプにかかわらず腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocyte / TIL) を伴うことがあるが、そのレベルと腫瘍細胞および浸潤免疫細胞の PD L 1 状態は様々であることが報告されている。背景に存在する免疫細胞がアポクリン病変診断・治療選択の補助指標になりうるか、アポクリン病変を含む TMA 検体を用いて、腫瘍進行を促進する腫瘍関連マクロファージを含む局所腫瘍微小環境の検討を行った。TIL の程度を HE 染色スライド (10%カットオフ) で評価し、PD L 1 レベル(抗体 SP 142 で 1%カットオフ)と免疫サブセット(CD3、CD8、FOXP3、CD20、CD68 および CD 204 陽性細胞)の存在の程度に関して免疫組織化学を用いて評価した。症例の 22%は TIL 陽性/PD L 1 陰性に分類され、その 69%は ER、PgR、HER2 陰性である Triple

Negative 型が占めた。症例の 66% は TIL 陰性/PD L1 陰性に分類され、その 77%はホルモン受容体陽性/HER2 陰性であった。CD204 陽性 M2 型マクロファージは、組織学的高グレードと MIB-1 index 高値と有意に関連していた。その中で定型的アポクリン病変に関しては、Triple Negative 型、HER2 陽性型であっても腫瘍免疫応答に乏しいグループに属することが示唆された。Triple Negative 乳癌細胞株で発現が高く、特に乳癌幹細胞の性質を有する腫瘍での高発現が報告されている GD2 は、アポクリン癌は陰性であった。

アポクリン病変以外の ER、PgR 陰性かつ HER2 陽性あるいは陰性症例との比較対照のため、乳癌 TMA 検体を用いて筋上皮細胞の変化と細胞周期関連蛋白に関して検証した。細胞周期と関連することが報告されている一次線毛の発現は、ほとんどの乳癌細胞では発現がみられないが、*In situ* 病変の CK5/6 陽性筋上皮細胞と周囲間質の線維芽細胞には発現が概ね認められた。癌細胞で一次線毛発現の亢進を認めたものは、CK5/6 陽性を示し、IHC で規定されるいわゆる Basal cell type 乳癌であった。HE 染色所見でアポクリン癌と思われる一部症例にもびまん性の発現を認めた。その症例は本来陰性である CK5/6 が非定型的に陽性で、核は核溝や核内封入体が散見される甲状腺乳頭癌に相似する細胞所見であったが、Altered Nuclear Polarity は不明瞭であった。複数の IDH2 免疫染色ではいずれも陰性であった。他方で、断頭分泌を伴う好酸性細胞質と Reversed Nuclear Polarity を伴う、形態上はアポクリン DCIS に分類可能な病変が、Luminal A 型を示し、IDH2 陽性となった。

乳腺病理診断におけるアポクリン癌は良悪性の鑑別に加え、類似の細胞形態を示す Triple Negative 乳癌や扁平上皮分化を伴う化生癌との鑑別が問題となるが、線毛発現を伴うアポクリン様分化癌は既報組織型には該当しない症例と考えられた。今後さらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ueo H, Minoura I, Ueo H, Gamachi A, Kai Y, Kubota Y, Doi T, Yamaguchi M, Yamashita T, Tsuda H, Moriya T, Yamaguchi R, Kozuka Y, Sasaki T, Masuda T, Urano Y, Mori M, Mimori K.	4. 巻 20;12(1)
2. 論文標題 Development of an intraoperative breast cancer margin assessment method using quantitative fluorescence measurements.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12614-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noro A, Ishitobi M, Hanamura N, Kashikura Y, Yamashita M, Kozuka Y, Saito K, Mizuno T, Ogawa T	4. 巻 23
2. 論文標題 A Case of Metaplastic Squamous Cell Carcinoma of the Breast that Showed a Pathological Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy with Weekly Paclitaxel.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Case Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bjs/znab265.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagano M, Saito K, Kozuka Y, Ichishi M, Yuasa H, Noro A, Imai N, Shibusawa M, Kimoto M, Ishitobi M, Tono Y, Oda H, Ishihara M, Mizuno T, Ogawa T, Katayama N.	4. 巻 21(1):36
2. 論文標題 CD204-positive macrophages accumulate in breast cancer tumors with high levels of infiltrating lymphocytes and programmed death ligand-1 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12297.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ueo H, Ueo H, Minoura I, Gamachi A, Doi T, Yamaguchi M, Yamashita T, Tsuda H, Moriya T, Yamaguchi R, Kozuka Y, Sasaki T, Masuda T, Kai Y, Kubota Y, Urano Y, Mori M, Mimori K.	4. 巻 23;108(10)
2. 論文標題 Clinical usefulness of a novel fluorescence technique for the intraoperative diagnosis of surgical margins in patients with breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Surg .	6. 最初と最後の頁 e340-e342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bjs/znab265.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugie T, Sato E, Miyashita M, Yamaguchi R, Sakatani T, Kozuka Y, Moritani S, Suzuki E, Kakimi K, Mikami Y, Moriya T.	4. 巻 27(4)
2. 論文標題 Multispectral quantitative immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in relation to programmed death-ligand 1 expression in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer.	6. 最初と最後の頁 519-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-020-01110-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katoh D, Kozuka Y, Noro A, Ogawa T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T.	4. 巻 190(10)
2. 論文標題 Tenascin-C Induces Phenotypic Changes in Fibroblasts to Myofibroblasts with High Contractility through the Integrin α 1/Transforming Growth Factor β /SMAD Signaling Axis in Human Breast Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2123-2135.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今野 和治, 小塚 祐司 他
2. 発表標題 低異型度病変(Rosen triad)を合併した乳腺管状癌の1例
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森谷 卓也, 小塚 祐司 他
2. 発表標題 乳腺報告様式IAC Yokohama Systemの導入 展望と課題
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北山 美佳, 小塚 祐司 他
2. 発表標題 乳腺腫瘍の組織分類改訂と細胞像 特殊型乳癌の細胞像
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 佳菜子, 小塚 祐司 他
2. 発表標題 カングリオシドGD2陽性トリプルネガティブ乳癌は予後不良である (Ganglioside GD2 expression is significantly associated with unfavorable prognosis in triple negative breast cancer)
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 佳菜子, 小塚 祐司 他
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるGD2発現と予後の検討
3. 学会等名 日本乳癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 超音波診断に推定組織型は必要か? 乳癌取扱い規約第18版における組織型分類-病理診断医の立場から-
3. 学会等名 乳腺甲状腺超音波医学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上尾 裕紀、小塚祐司、森 正樹他
2. 発表標題 乳癌可視化・蛍光プローベの臨床応用を目指した診断法改良と多施設臨床性能試験
3. 学会等名 日本乳癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 乳腺細胞診「鑑別困難」に迫る-悪性病変と誤診されやすい良性病変を如何にして見分けるか- 乳管内乳頭状病変とその類縁病変組織の観点から[鑑別困難]とする所見
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小塚祐司、今野和治
2. 発表標題 乳腺疾患鑑別の要点:免疫組織化学を含めて
3. 学会等名 2020年 国際病理アカデミー日本支部 病理学教育セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野 真由子, 齋藤 佳菜子, 小塚 祐司, 野呂 綾, 今井 奈央, 澁澤 麻衣, 木本 真緒, 小川 朋子
2. 発表標題 乳癌における腫瘍浸潤リンパ球(TILs)と臨床病理学的特性、免疫学的微小環境との関係
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小塚祐司, 今野和治
2. 発表標題 浸潤性乳癌における良悪性の鑑別とピットフォール 乳腺二相性腫瘍の良悪性の鑑別(病理診断)
3. 学会等名 日本臨床細胞学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 佳菜子, 長野 真由子, 小塚 祐司, 石原 幹也, 水野 聡朗, 木本 真緒, 澁澤 麻衣, 今井 奈央, 野呂 綾, 小川 朋子
2. 発表標題 原発性乳癌におけるProgrammed death-ligand 1(PD-L1)発現と免疫細胞の解析
3. 学会等名 日本乳癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 アポクリン病変を含む乳管内上皮増殖巣の診断
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野 真由子, 齋藤 佳菜子, 小塚 祐司, 木本 真緒, 澁澤 麻衣, 今井 奈央, 野呂 綾, 稲上 馨子, 石原 幹也, 水野 聡朗, 小川 朋子
2. 発表標題 原発性乳癌の性質および進行度と腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の関係の検討
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大井 恭代, 前田 一郎, 小塚 祐司, 山口 倫, 皆倉 愛美, 永尾 聡子, 前田 ゆかり, 安毛 直美, 土屋 眞一
2. 発表標題 病理診断の現在の課題と展望 液状化細胞診(LBC)による乳腺細胞診標準化の試み
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 乳癌病理診断におけるマッピング
3. 学会等名 乳腺甲状腺超音波医学総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 乳がん早期診断における細胞診の役割 低悪性度病変の考え方
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小塚祐司
2. 発表標題 乳がん広がり診断における造影超音波 乳癌病理診断におけるマッピング
3. 学会等名 第45回超音波医学総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 小塚祐司（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 288
3. 書名 腫瘍病理鑑別診断アトラス 乳癌第3版	

1. 著者名 小塚祐司（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 204
3. 書名 治療戦略に役立つ臨床医・病理医のための乳腺病理の見かた・考え方	

1. 著者名 小塚祐司（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 520
3. 書名 乳腺腫瘍学 第4版	

1. 著者名 小塚祐司（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 370
3. 書名 細胞診アトラス	

1. 著者名 日本乳癌学会（分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 456
3. 書名 乳腺腫瘍学 第3版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小川 朋子 (Ogawa Tomoko) (90362334)	三重大学・医学部附属病院・名誉教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------