

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16287

研究課題名（和文）非浸潤性乳癌の浸潤のしくみの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of invasion in ductal carcinoma in situ

研究代表者

堀本 義哉（Horimoto, Yoshiya）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非浸潤癌細胞株を用いた実験でEMT阻害剤により細胞遊走能や浸潤能が抑制されること、in vivoでは無治療群と比較して肺転移が抑制されることを明らかにした。手術標本を用いた検討ではEMTマーカーの発現が高い腫瘍ほど微小浸潤の存在や術後局所再発率が高いか否かを検証した。さらにエストロゲン受容体陽性非浸潤性乳癌の多くが、遺伝子増幅なしにHER2蛋白を過剰に発現していることを見出した。将来的に本研究の成果によって見出したEMT阻害剤による浸潤形成抑制作用によって、非浸潤癌を手術せずに治療するという全く新しい治療法の開発につなげたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン受容体陽性HER2陽性非浸潤癌症例の多くがHER2/neu遺伝子増幅なしにHER2蛋白を過剰に発現していることを明らかにした。またin vivoの実験において、EMT阻害剤により肺転移が抑制されることを明らかにした。本研究の成果によりEMT阻害剤により浸潤癌への進行を食い止め、非浸潤癌を手術せずに治療するという全く新しい治療法を提案し、臨床試験立案のための重要なデータを構築したいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Using non-invasive breast cancer cell line, we found that EMT inhibitors suppressed cell migration and invasion. In vivo, suppression of the lung metastasis was confirmed. Employing surgical specimens, whether tumours with high expression of EMT markers more frequently had microinvasion and postoperative local recurrence rates were examined. In addition, we found that many estrogen receptor-positive non-invasive breast cancers overexpressed HER2 protein without gene amplification. In the future, we hope that the inhibitory effect of EMT inhibitors will lead to a completely new treatment strategy for patients with non-invasive breast cancer without surgery.

研究分野：乳癌

キーワード：非浸潤性乳癌 浸潤 上皮間葉移行 転移

1. 研究開始当初の背景

非浸潤性乳癌について

乳癌は進行度により非浸潤癌と浸潤癌に分けることができる。非浸潤癌は乳管内にとどまっているため他の臓器へ転移を起こさず、手術によって完治が期待できる真の早期乳癌と言える。

検診で発見されるような非浸潤癌の中には、浸潤癌への進展に何十年も要するような超低悪性度の病変が存在することが報告されている。すなわち生涯浸潤癌に進展せず治療が不要な非浸潤癌が存在するが、現時点でその生物学的特徴には不明点が多く、同定方法も存在しない。

そこで浸潤癌への進展のしくみを明らかにし、超低悪性度の非浸潤癌を同定したりあるいは浸潤しやすい病変の浸潤を食い止める治療が開発したりすることができれば、“手術をしない”という今までは考えられなかった選択肢を患者へ提示できることになる。

浸潤を促進する因子

非浸潤癌が乳管の壁（基底膜）を破り間質組織へ浸潤するためにどのような因子が重要か様々な研究が行われ、ケモカイン等の浸潤促進因子が報告されてきた。一方、申請者らはこれまでに上皮成長因子受容体の HER2 蛋白を過剰発現する乳癌で浸潤を伴いやすいことを明らかにしたが(*J Surg Res* 167: e205-210, 2011)、非浸潤性乳癌が浸潤する明確なしくみは未だに判明していない。

一般に浸潤癌は上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition、以下 EMT) を起こし間葉系細胞の性格を獲得しながら浸潤・転移能を高めていくことが知られている。すなわち細胞同士が密に接着した状態から細長く形を変えバラバラとなり、移動性を高めていく。しかしながら、非浸潤癌が浸潤する仕組みは不明なままである。そこで申請者は、非浸潤癌が基底膜を破り乳管外へ浸潤する際にも同様にこの EMT という事象が関与するという仮説を立てた。この仮説が正しければ、EMT を制御することで浸潤を食い止められる可能性があることを意味する。

これまでの準備状況

- ・上皮間葉移行が遊走能を促進することを証明

非浸潤癌細胞株に TGF を添加し EMT を誘導すると、細胞遊走能や蛋白質分解酵素の発現が上昇することを明らかにした。

- ・マウス腫瘍片における乳管構造形成を確認

非浸潤癌細胞株が *in vivo* で腫瘍片を形成した際に明瞭な乳管構造を形成することを、作成した腫瘍片に対する筋上皮マーカー p63 染色により確認した。さらに時間経過とともに筋上皮の層を破り浸潤が進行していくことを確認した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非浸潤性乳癌がどのようにして基底膜を破り乳管外へ浸潤するかを明らかにすることである。そのために EMT が寄与するという仮説を実証し、EMT を抑制することが知られている EMT 阻害剤による浸潤癌への進展の抑制効果を検証することで、将来の大目的である「非浸潤性乳癌の浸潤を抑制する新規治療法を開発し、手術をしない」という選択を患者に提示ための基礎データを築く。

本研究の予想される結果と学術的意義

本研究は申請者のこれまでの予備実験による、非浸潤癌の浸潤形成への EMT の関与に関する知見により立案した仮説に基づくものであり、高い独自性を有している。さらに非浸潤癌を手術せずに、浸潤癌への進行を食い止めるという全く新しい治療法の開発を目指すものであり、独創的である。

学術的な波及効果としては、EMT が浸潤形成に寄与し EMT 阻害剤により浸潤癌への進行が抑制できることを明らかにすることができれば、浸潤形成をテーマとした研究にとって重要な学術的知見が得られ、他癌にも通じた研究の発展に貢献できる。また臨床的にも非浸潤癌の全く新しい治療法を提案し、臨床試験立案のための重要なデータを構築することができる。

3. 研究の方法

(1) EMT が浸潤能を高めることの実証

非浸潤癌細胞株に TGF β を添加し EMT を誘導することで浸潤能が高まることを、sphere assay における形状の変化や EMT マーカーの免疫染色によって明らかにする。

(2) 臨床サンプルを用いた免疫染色による、EMT が浸潤形成へ寄与することの検証

手術標本（非浸潤癌及び微小浸潤症例）のパラフィンブロックを用い、ビメンチンや E カドヘリンといった EMT マーカーの免疫染色を行う。EMT マーカーの発現が高い腫瘍ほど、微小浸潤の存在や術後局所再発率が高いか否かを調べることで、EMT 亢進が浸潤形成に寄与していることを検証する。

(3) EMT 阻害剤の浸潤抑制効果の検証とその機序の解明

臨床にて他疾患に用いられている薬剤の中には、EMT を抑制することが知られているものが存在する。そこでまず *in vitro* の実験で、顕微鏡下での細胞の形状や Western blot を用いて EMT マーカーの発現を調べ、EMT 阻害剤による EMT の抑制効果を検証する。また healing assay により細胞遊走能を、sphere assay により浸潤能の抑制効果を検証する。

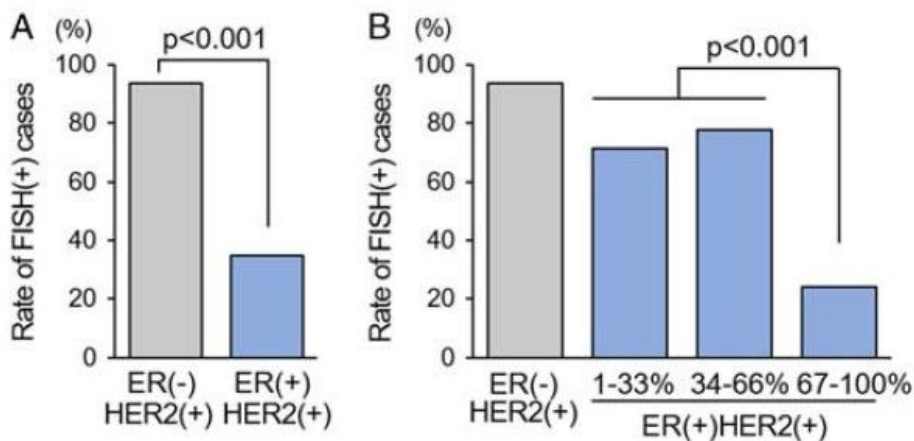
次に、免疫不全マウスに非浸潤癌細胞株を皮下移植し、腫瘍を形成させる。その後 EMT 阻害剤を 2 週間腹腔内投与し腫瘍片を切除し、病理診断及び免疫組織化学により、EMT 阻害剤が EMT 抑制を通して浸潤形成の制御効果を詳細に調べる。さらに 8 週後に安楽死処置を行い肺・肝転移の有無を評価する。

さらに EMT 阻害剤の抑制作用に注目し、下流シグナルのどこに作用するのかその機序を明らかにする。具体的には Rho A など細胞遊走・浸潤関連因子の発現・活性を Western blot や活性キットにより解析する。

4 . 研究成果

これまでにまず非浸潤癌細胞株に TGF を添加し EMT を誘導することで浸潤能が高まることを、sphere assay における形状の変化や EMT マーカーの免疫染色により明らかにした。また *in vitro* による実験では EMT 阻害剤により細胞遊走能や浸潤能が抑制されること、*in vivo* の実験では、EMT 阻害剤により肺転移がコントロール群と比較して抑制されることを明らかにした。現在は下流シグナルの詳細な変化について解析を継続中である。

手術標本を用いた検討では EMT マーカーの免疫染色を行い、EMT マーカーの発現が高い腫瘍ほど、微小浸潤の存在や術後局所再発率が高いか否かを検証した(データ解析中)。さらに、手術標本を用いて非浸潤性乳癌における HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 蛋白や低酸素マーカーの発現の関連を調べ、非浸潤性乳癌の多くが遺伝子増幅なしに HER2 蛋白を過剰に発現していることを見出した。具体的には 71 例のエストロゲン受容体陽性 HER2 陽性非浸潤癌症例の *HER2/neu* 遺伝子増幅を FISH 法により解析し、エストロゲン陰性症例(94%)と比較して遺伝子増幅の頻度が有意に低い(35%)こと(下図)、すなわちエストロゲン受容体陽性 HER2 陽性非浸潤癌では遺伝子増幅なしに HER2 蛋白が過剰に発現していることを明らかにし、論文にて発表した(Estrogen receptor-positive ductal carcinoma *in situ* frequently overexpresses HER2 protein without gene amplification. *Am J Surg Pathol* 43:1221-8, 2019)。さらにそのような症例では HER2 蛋白を過剰に発現しない症例と比較して、低酸素マーカーである HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1)を有意に高発現していることがわかった。



これらの結果は今後 *in vitro* 及び *in vivo* の解析を進めていく中で得られるデータの解釈の際に有用な情報になりうると考えている。

最終的に、本研究の成果によって見出した EMT 阻害剤により浸潤癌への進行を食い止め、非浸潤癌を手術せずに治療するという全く新しい治療法を提案し、臨床試験立案のための重要なデータを構築したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horimoto Y, Terao T, Tsutsumi Y, Tanabe M, Mogushi K, Thinzar Hlaing M, Sasaki R, Saeki H, Okazaki M, Sonoue H, Arakawa A, Saito M.	4. 巻 43
2. 論文標題 Estrogen Receptor-positive Ductal Carcinoma In Situ Frequently Overexpresses HER2 Protein Without Gene Amplification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Surg Pathol	6. 最初と最後の頁 1221-1228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PAS.0000000000001300.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Horimoto Y, Terao T, Thutsumi Y, Tanabe M, Mogushi K, Arakawa A, Sonoue H, Saito M.
2. 発表標題 Elucidation of frequent HER2 overexpression in ductal carcinoma in situ.
3. 学会等名 第107回日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horimoto Y, Terao T, Thutsumi Y, Tanabe M, Mogushi K, Arakawa A, Sonoue H, Saito M.
2. 発表標題 Elucidation of frequent HER2 overexpression in ductal carcinoma in situ.
3. 学会等名 The 11th European Breast Cancer Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------