

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06934

研究課題名(和文) 癌微小環境からみたトリプルネガティブ乳癌の発癌メカニズムに関する病理学的解析

研究課題名(英文) Pathological Analysis of Carcinogenesis Mechanism of Triple Negative Breast Cancer from the Viewpoint of Cancer Microenvironment

研究代表者

森谷 卓也 (Moriya, Takuya)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌を取り巻く環境が癌の発育進展過程に与える影響を明らかにする目的で解析した。浸潤性乳癌では、コラーゲン代謝に関係するP4H特にP4HA2は悪性度と相関し、腫瘍部の虚血との関連性も示唆された。P4H2発現は、早期癌である非浸潤性乳管癌(DCIS)においても同様であった。治療抵抗性・予後不良のトリプルネガティブ乳癌において、アンドロゲン受容体AR陽性群は免疫活性が低く陰性群で高いこと、後者はさらにB7-H4とID01の発現状況が異なる2群に分かれることを示した。PD-L1や虚血マーカーの発現は、浸潤癌に比してDCISで低く間質浸潤がなく周囲環境との相互作用が乏しいためと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲン代謝に関係する物質のP4H、特にP4HA2は悪性度の高い乳癌で高発現することから、乳癌における新たなバイオマーカーになる可能性がある。このことは、早期の癌である非浸潤性乳管癌の段階から確認することができることも示した。

トリプルネガティブ乳癌は、AR、ID01、B7-H4の3つによって、腫瘍を取り巻く3つの群に分かれることを証明した。これら3者に対する新しい治療薬がそれぞれ開発中であり、患者の選択や治療効果の推定をする上で参考になりえる基礎データを提供した。

研究成果の概要(英文)： Pathological analysis was performed with the aim of clarifying the influence of the environment surrounding breast cancer on the process of cancer development and progression.

In invasive breast cancer, P4H, especially P4HA2, which is related to collagen metabolism, correlated with cancer grade and was also associated with ischemia at the tumor site. P4H2 expression was similar in early-stage cancer, noninvasive ductal carcinoma in situ (DCIS) period. In triple negative breast cancer with treatment-resistant and poor prognosis, immune activity was low in the androgen receptor (AR) positive group and high in the negative group, and the latter was further divided into two groups with different B7-H4 and ID01 expression status. expression of PD-L1 and ischemic markers was lower in DCIS compared to invasive carcinoma, presumably due to the lack of stromal invasion and poor interaction with the surrounding environment.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 病理 非浸潤性乳管癌 免疫組織化学 早期癌 非浸潤癌 B7-H4 P4HA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦女性の乳癌患者数は著しく増加しており、女性の9人に1人程度が生涯のうちに乳癌を発症するといわれている。しかし、乳癌は病理学的、分子生物学的に多彩である。現在では遺伝子プロファイルに基づく内因性サブタイプ分類が受け入れられ、実臨床では免疫組織化学(エストロゲン受容体 ER、プロゲステロン受容体 PgR、および HER2) が代替マーカーとして利用されている。なかでも3者いずれも陰性のトリプルネガティブ(TN)乳癌は治療抵抗性、予後不良の一群と認識されており、ホルモン依存性乳癌とは異なる発癌や進展のメカニズムを解明し、診断や治療に役立てることが重要と思われる。また、TNは乳癌の10-15%を占めるが、非浸潤性乳管癌(DCIS)のうちTN型は5%程度にとどまっていることから、他の乳癌に比して早期に浸潤能を獲得し進行する可能性が示唆される。さらにホルモン受容体陽性乳癌(Luminal型乳癌)における異型乳管過形成などの前駆病変については全く明らかにされていない。

一般に、癌の発育進展には、腫瘍細胞自体の形質転換が重要だが、同時に癌細胞を取り巻く局所環境(微小環境)の変化も大きく関わっている。この中には、癌を取り巻く基質(間質)の変化、腫瘍血管(新生血管)の発達、癌に対する宿主(免疫)反応などが含まれる。TN乳癌においても、ホルモン受容体陽性乳癌(Luminal型乳癌)などとは局所環境が異なるものと思われ、研究が進められているが、TN乳癌細胞の多彩性(癌細胞の形質)による、さらなる亜分類)にまで着目した検討が少ないことと、ある程度進行したTN乳癌に対する研究成果を、その初期像や前駆病変にまで遡って発癌メカニズムを探索した研究が乏しいことが、大きな課題と考えられる。

そこで、本研究ではTN乳癌を取り巻く局所環境について、免疫組織学的手法を中心に検討を行う。その結果をふまえ、TN型DCISにおける局所環境の特性や、TN乳癌症例における非癌部の組織学的特徴を探索することにより、TN形質を有する乳癌の発育進展における、宿主側の局所反応の特性について解明を進める。研究成果は、TN乳癌発生のメカニズム解明に寄与するとともに、病理組織像の特徴を含めた早期診断や、TN乳癌の新たな亜分類として、適切な治療法(薬物療法)を選択するための重要な手掛かりを提供できるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

TN乳癌は予後不良乳癌の一群で、その特性を解明し、適切な診断や治療に役立てるための研究が進められている。しかし、TN乳癌の発癌過程に関する解析は十分とはいえず、早期発見の手掛かりは得られていない。また、TNの癌細胞の性質も一様でないことが指摘されており、そのことが治療選択にも大きな影響をきたす可能性が危惧される。本研究では、癌細胞を取り巻く局所環境(微小環境)に着目し、乳癌におけるTN型の特徴を病理組織学的に解析する。さらに、得られた結果を早期TN乳癌(非浸潤性TN癌)における検討、ならびにTN乳癌の背景乳腺実質における初期変化についても探索する。最終的に、宿主の側から見たTN乳癌の特徴を明らかにするとともに、癌細胞自体の特徴以外の観点から見たTN乳癌の多彩性について明らかにする。TN乳癌を早期に発見するための新たな手掛かりを得ることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

乳癌手術例の病理標本を抽出し、年齢、術式、病理組織型、浸潤径、グレード、脈管侵襲、ホルモン受容体発現(ER, PgR), HER2発現、増殖能、TNM分類、ステージ、予後に関する臨床病理学的なデータベースを作成した。

癌を取り巻く基質の特徴に関する検討として、(1) コラーゲン代謝の主要な翻訳後修飾を担

う prolyl-4-hydroxylase subunit(P4HA)1 および P4HA2 の発現について免疫組織学的に検討した。その結果を低酸素ストレス関連マーカー(HIF-1・HIF-2)、上皮間葉転換マーカーの発現とも比較した。まずは浸潤性乳癌における検討を行い、その結果を踏まえて非浸潤性乳管癌についても同様の検討を行った。浸潤癌の研究においては、染色の妥当性を確認する目的でウエスタンブロット法による蛋白発現の確認、並びに TN 形質を有する乳癌培養細胞における発現についても検討を加えた。(2)免疫寛容に関連するキヌレニン経路の律速酵素であるインドールアミン酸素添加酵素 indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)-1、PD-L1、およびそれと同じ B7 ファミリーに属する B7-H4 の発現について、腫瘍浸潤免疫細胞の状況と合わせて検討を行った。最初に TN の浸潤性乳癌における検討を行った後に、DCIS でも検討・比較した。

#### 4. 研究成果

(1)浸潤径 10mm 以上の浸潤性乳癌 182 例(Luminal A-like 型 51 例・HER2 型 48 例・TN 型 83 例)における検討では、正常乳管上皮に比べて腫瘍細胞では、P4HA1・P4HA2 はいずれも発現が増加していた。P4H 高発現群と低発現群と比較すると、P4HA1 低発現群では高発現群に比してリンパ管侵襲やリンパ節転移が少なかった。一方、P4HA2 では、高発現群は低発現群に比べて、特殊な組織型が多く、組織学的悪性度・核異型度が高く、Ki67 が高値を示し、p53 が陽性で、内因性サブタイプは HER2 型・TN 型を示した。このことから、特に P4HA2 は癌の悪性度と強い関連がみられることが示唆された。また、興味深いことに P4HA2 発現は HIF-2 と弱い負の相関を示すことが明らかとなった。全生存期間(OS)については、P4HA1 および P4HA2 の発現量に関わらず予後に明らかな有意差は認められなかった。一方、無再発生存期間(RFS)については、P4HA1・P4HA2 のいずれも低発現群に比べて高発現群で RFS が短い傾向にあった。多変量解析では、OS では浸潤径のみが独立した関連因子であることが示され、RFS については、コメド壊死と浸潤径が独立した関連因子であることが示された。乳癌培養細胞では、低酸素環境下で培養すると、P4HA1・P4HA2・HIF-1 の免疫組織学的発現が種々の程度に増加するとともに、時間依存性に蛋白量が増加することが示された。特に MDA-MB-231 細胞株(非基底細胞型の TN 乳癌株)においてこの変化は顕著であった。乳管上皮細胞が癌化すると、P4H 発現はいずれも上昇するが、特に P4HA2 発現の増加は悪性化の指標として有用で、再発リスクの予測因子となり得ることが示された。P4H と EMT 転写誘導因子の発現の関連については、本研究では明らかな関連を指摘するに至らなかった。P4H と HIF の発現については、乳癌組織と培養細胞では相関関係に差異がみられたが、低酸素環境に曝露された程度によって、P4H と HIF 代謝酵素である PHD の競合関係が変化するためこのような違いが生じたのではないかと考えられた。P4H 発現のみならず、腫瘍周囲間質内のコラーゲンの特徴についても併せて検討する必要性が示唆された。

(2)核異型中等度以上の非浸潤性乳管癌 101 例を対象とし、P4HA1、P4HA2、HIF-1 に対する免疫染色を行った。核異型高度例は中等度例に比して有意に P4HA1、P4HA2 ともに有意に高スコアを示した。P4HA2 は、HER2 陽性例が陰性例より、ER 陰性例が陽性例よりそれぞれ有意に高スコアであった。内因性サブタイプ別には、P4HA1 および P4HA2 ともに HER2 型が luminal A 型より有意に高スコアを示した。P4HA2 はトリプルネガティブ型も luminal A 型より有意に高スコアであった。さらに Spearman の順位相関係数では P4HA1、P4HA2、HIF1- は互いにやや弱い正の相関を示した。浸潤性乳癌と同様 P4HA は悪性度の高い DCIS で高発現しており、低酸素環境マーカーとの関連も示唆された。

(3)TN の浸潤性乳管癌 119 例について、B7-H4、PD-L1、IDO1 に対する免疫染色を行った。B7-H4 発現は、年齢が比較的若年で、組織学的グレードが高く(p=0.023)、増殖マーカーが高い群で高

発現していた。また、PD-L1（クローン 28-8）の Combined positive score が 5 以上の症例、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）パターンが inflamed、三次リンパ様構造の数が多い場合に有意に高発現であった。腫瘍周囲の CD8, FOXP3 陽性細胞数とも正の相関を示した。IDO1 は間質 TIL が多い症例 inflamed、および excluded の TIL パターンを示す腫瘍で有意に高発現していた。TNBC サブタイプとの関連では、B7-H4 発現は CK5/6 陽性の基底細胞型で高かった。アンドロゲン受容体（AR）と B7-H4 の H スコアは逆相関関係にあり、AR 低発現群では B7-H4 と IDO1 の発現量は逆相関していた。AR 発現はさらに desert の TIL パターンを示す症例、三次リンパ様構造が乏しい群で有意に高く、腫瘍周囲の CD8 陽性 T 細胞および FOXP3 陽性 T 細胞の数と逆相関していた。以上から、B7-H4, IDO1, PD-L1 は免疫的に Hot な症例で発現する傾向にあった。AR を発現するサブタイプでは各免疫チェックポイント分子の発現が低いものと関連し、免疫的に cold な傾向があった。AR 陽性群の免疫環境が他の群とは異なることに加えて、非 AR 陽性群では B7-H4 と IDO1 の発現が排他的な傾向があることも示された。B7-H4, IDO1, AR を標的とした治療薬が現在開発段階・治験中であり、これらの発現の差異は、将来的に個別治療の選択において役立つ可能性があるものと考えられた。

(4)DCIS 101 例においては、HIF-2 は 19 例（18.9%）、PD-L1（28-8）は 38 例（37.6%）に発現しており、浸潤癌における発現（HIF-2 : 39.3%、TNBC の PD-L1 : 40.6%）に比して低率であった。DCIS の中では、内因性サブタイプによる差がみられたが、統計的有意差は得られなかった。今回の解析結果からは、間質浸潤による周囲組織への影響が乏しい DCIS においては、乳腺の微小環境への虚血や免疫環境の影響が乏しいと思われる結果が得られたが、その詳細なメカニズムの解析にはさらなるマーカーの追加が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Mikami Y, Nishimura H, Isoda R, Mikami T, Yamamoto Y, Kurebayashi J, Moriya T	4. 巻 48
2. 論文標題 Role of the expression of collagen prolyl-4-hydroxylase subunits 1 and 2 in the development and prognosis of breast cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kawasaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 87-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11482/KMJ-E202248087	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 -

1. 著者名 Sanuki Fumiaki, Mikami Yuka, Nishimura Hirotake, Fujita Yoshinori, Monobe Yasumasa, Nomura Tsunehisa, Taira Naruto, Moriya Takuya	4. 巻 30
2. 論文標題 Immunohistological analysis of B7-H4, IDO1, and PD-L1 expression and tumor immune microenvironment based on triple-negative breast cancer subtypes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-023-01498-7	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森谷卓也、三上友香、佐貫史明、西村広健、小池良和、山本裕、紅林淳一、平成人
2. 発表標題 非浸潤性乳管癌におけるprolyl-4-hydroxylase 1および2の発現意義に関する病理学的検討
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐貫史明、三上友香、西村広健、物部泰昌、野村長久、森谷卓也
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるPD-L1, B7-H7, IDO1発現と腫瘍免疫微小環境に関する免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三上友香、西村広健、三上剛司、紅林淳一、森谷卓也
2. 発表標題 乳癌におけるprolyl-4-hydroxylase(P4H)発現の意義に関する検討
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐貫史明、三上友香、西村広健、物部泰昌、野村長久、紅林淳一、森谷卓也
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌における免疫チェックポイント分子の発現と免疫微小環境に関する解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森谷 卓也, 三上 友香, 佐貫 史明, 西村 広健, 秋山 隆, 紅林 淳一
2. 発表標題 低異型度乳管内病変の診断と臨床の対応 乳腺異型上皮内病変の病理と臨床
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学ホームページ 教室紹介 病理学  
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=433>  
 川崎医科大学病理学教室ホームページ  
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/pathology/>

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	紅林 淳一  (Kurebayashi Junichi)  (10248255)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授    (35309)	
研究分担者	西村 広健  (Nishimura Hirotake)  (70368661)	川崎医科大学・医学部・講師    (35303)	

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