

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430144

研究課題名(和文)薬物療法により病状進行となる高悪性度乳癌の予測に役立つ分子マーカーの検討

研究課題名(英文) Investigation of molecular markers for prediction of the highly aggressive breast cancers that show clinically progressive disease during neoadjuvant chemotherapy

研究代表者

津田 均 (TSUDA, HITOSHI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病態病理学・教授)

研究者番号：70217321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：術前化学療法中に病状進行(cPD)となったホルモン受容体陰性HER2陰性乳癌(TNBC)の指標を明らかにする目的で、cPD群22名と、対照群80名を比較した。組織所見では化生癌成分と高増殖性が、免疫組織化学的所見ではケラチン5/6、上皮間葉移行(EMT)分子陽性、アンドロゲン受容体(AR)陰性がcPD群で有意に高頻度であった。階層クラスター解析において、11分子の発現様式によりTNBCは7つの亜クラスターに分けられ、各々は組織型、内因性サブタイプ、cPD、予後との関連を示した。細胞増殖、basal-like, EMT, ARの組合せによりcPDとなったTNBCの特徴づけが可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using surgically resected tumor specimens from 22 TNBCs that showed cPD during NAC (cPD group) and 80 TNBCs that did not receive NAC (control group), we performed histopathologic and immunohistochemical (IHC) analyses of 11 molecules relevant to epithelial-mesenchymal transition (EMT), basal-like, molecular apocrine or other features. Metaplastic features and high proliferation on histology and positive cytokeratin 5/6, ZEB1, TWISTNB, vimentin, and HMGB1 and negative androgen receptor (AR) by IHC were more frequent in the cPD than in the control. By an unsupervised hierarchical cluster analysis incorporating these 11 molecules, the 102 TNBCs were divided into two major clusters and seven subclusters that appeared to correspond to intrinsic subtype, cPD status, histological type, and clinical outcome. The combinations of high proliferation, metaplastic features, and statuses of some EMT and basal-like markers and AR appeared to characterize the TNBCs that showed cPD after NAC.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：乳癌 化学療法抵抗性 上皮間葉移行 トリプルネガティブ乳癌 術前化学療法 臨床的病状進行

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳癌は、ホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR) の発現および HER2 の過剰発現 / 遺伝子増幅を伴わない癌で、乳癌全体の 15% 程度を占める。内分泌療法や抗 HER2 療法の適応とならないため、術前術後の全身療法としては化学療法のみが適応となる。TNBC を有する患者の約 30% は化学療法が奏効するが、3~5% の患者が術前化学療法中に臨床的病状進行 (clinically progressive disease, cPD) となることも知られている。

研究代表者らは、2010 年~2012 年の間、基盤研究 (C) にて高悪性度乳癌における腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocytes) の解析と治療反応性、予後予測因子としての意義 (22501039) について研究を行い、TIL 高度の TNBC は病理学的完全奏効 (pathological complete response, pCR) 率が高いことを示した。一方で、TNBC の中で化学療法抵抗性の指標として、化生癌の形態、細胞増殖性、basal-like マーカー、EMT マーカーの発現などが報告されてきた。しかしながら、実際に cPD となった腫瘍を対象に解析した検討は少ない。

2. 研究の目的

術前化学療法中に cPD となった TNBC の組織学的、免疫組織化学的指標を明らかにする。対照群は、術前化学療法を行うことなく、外科手術療法で切除された TNBC を選択する。cPD 群と対照群の間で、組織学的指標と細胞増殖、basal-like マーカー、上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) マーカー、分子アポクリン指標、などの発現状態を比較する。差がある指標が見いだせたら、化学療法前の生検標本と cPD となった後の切除標本との間でこれらの指標に差があるかを検討する。また今回用いた免疫染色によるプロファイルで化学療法抵抗性や予後と相関する TNBC 分類が可能かどうかを検討し、既に世に報告されている内因性サブタイプ分類や Lehmann の分類¹⁾ と対比させる。

3. 研究の方法

1999 年~2011 年の間に、国立がん研究センター中央病院 (NCCH) で TNBC と術前に診断され、術前化学療法施行中に、RECIST による基準で cPD と評価され外科手術療法を受けた患者は 22 名にて、外科切除された治療後の腫瘍組織と、そのうち 12 名から術前化学療法前に生検で切除された腫瘍組織を対象とした 1994 年~1998 年の間に NCCH で術前治療を受けることなく外科療法を受け、当時の術後病理検査で TNBC が疑われた 110 名を対照群とし、外科切除された腫瘍組織を対象とした。これらの腫瘍組織はホルマリン固定パラフィン包埋され、病理診断に供された後の残余検体である。

これらの検体については、免疫組織化学的に ER, PgR, HER2 の発現を最新の標準化された検査法によって再検し、cPD 群 22 腫瘍と対照群 80 腫瘍が TNBC であることを確認した。術前化学療法は、22 名全員アンスラサイクリンを基準としたレジメン (AC か CEF) と引き続くタキサン (パクリタキセルかドセタキセル) からなるレジメンであった。対照群では 39 名のリンパ節転移陽性患者全員と 41 名中 8 名のリンパ節転移陰性患者が術後薬物療法を受けていた。

合計 102 腫瘍につき、腫瘍当たり 2 か所から 2mm 径の組織マイクロアレイを作製した。組織学的指標は、組織型、核分裂像の数、非定型髄様癌、広範な壊死、中央部無細胞領域、TIL を評価した。免疫組織化学的指標は、増殖マーカーとして Ki-67、Basal-like マーカーとして EGFR, サイトケラチン 5/6 (CK5/6) の 2 分子、EMT マーカーとして、ビメンチン、ZEB1, TWIST NB, Snail-2, E カドヘリンの 5 分子、分子アポクリンマーカーとしてアンドロゲン受容体 (AR) その他、HMGB1, BRCA1、合わせて 11 分子を検討した。統計学的には群間の予後を Kaplan-Meier 曲線間の log-rank 検定で比較した。unsupervised 階層クラスター解析には Ward 法を用いた。今回の検討は国立がん研究センター倫理委員会の承認を受けて実施した。

4. 研究成果

病理学的指標に関しては、化生癌の成分を含む腫瘍の頻度と高増殖性 (高倍 10 視野あたり 50 個以上の核分裂像もしくは Ki-67 陽性細胞率 50% 以上) の頻度が cPD 群で 41%、86% であったのに対し、対照群では 3%、50% であり、有意に cPD 群で高頻度であった ($P < 0.001$, $P = 0.0049$)。また、広範な壊死 (cPD 群 81%、対照群 9%、 $P < 0.001$)、非定型髄様癌 (cPD 群 45%、対照群 25%、 $P = 0.068$)、中心部無細胞領域 (cPD 群 23%、対照群 9%、 $P = 0.075$) と有意差、あるいは有意差はないものの cPD 群でより高頻度である傾向を示した TIL 高度腫瘍の頻度は両群間で有意差は見られなかった。

Basal-like マーカーサイトケラチン 5/6 (CK5/6)、EMT マーカー-ZEB1、TWIST NB、ビメンチンの陽性率が、cPD 群で 41%、32%、27%、77% であったのに対し、対照群では 5%、13%、3%、54% といずれも有意に cPD 群で高頻度であった ($P < 0.001$, $P = 0.031$, $P = 0.0011$, $P = 0.047$)。また HMGB1 陽性率、アンドロゲン受容体 (AR) 陰性率も同様に cPD 群で 86%、91% であったのに対し、対照群では 51%、71% と有意に cPD 群で高頻度であった ($P = 0.0023$, $P = 0.046$)。これらに対し、EGFR、BRCA1、E カドヘリン、Snail-2 の陽性率は cPD 群、対照群の間で有意差は見られなかった。Unsupervised の階層クラスター解析において、細胞増殖指標を含むこれら 11 分子の発現パターンにより TNBC は 2 つの主クラスターと、さらに 7 つの亜クラスターに分けるこ

とが可能であった。主クラスターは細胞増殖指標の高低とピメンチン発現の有無を基本に分類された。主クラスターのうち低細胞増殖、ピメンチン陰性の群(クラスターA)は、Eカドヘリン陰性、AR陽性、EGFR陽性などにより更に3サブクラスター(a, b, c)にわけられた。クラスターAはcPD率と再発率が有意に低く、組織型ではアポクリン癌、多形型浸潤性小葉癌がしばしば見られた。一方、高細胞増殖、ピメンチン陽性の群(クラスターB)は、ZEB1, CK5/6, EGFR, HMGB1, Snail-2発現などから更に4サブクラスター(d, e, f, g)に分けられた。クラスターBはcPD率と再発率が有意に高く、特にd, f, g群にcPDの割合が高く、d, f群に化生癌の割合が高かった。このように今回の比較によって抽出されたクラスター、サブクラスターは内因性サブタイプ、化学療法効果、組織型、患者予後との関連性を示した。

化生癌成分は治療前の生検標本では14%に見られたのみであったが、治療後切除標本では41%の高頻度で認められた。

細胞増殖指標、化生癌成分の有無、免疫組織化学的なEMT, basal-likeおよびARの状態の組み合わせにより術前化学療法後にcPDとなったTNBCの特徴づけることが可能と考えられた。

<引用文献>

Lehmann BD, et al. J. Clin. Invest. 2011; 121: 2750-67.

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)

Yuko Tanabe, Hitoshi Tsuda, Masayuki Yoshida, Harukaze Yamamoto, Makoto Kodaira, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Chikako Shimizu, Seiichiro Yamamoto, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara, Kenji Tamura. Histopathological and immunohistochemical characteristics of triple-negative breast cancers that showed clinically progressive disease during neoadjuvant chemotherapy. 査読有、Cancer Science, in press doi: 10.1111/cas.13274. PMID: 28474753

Atsuko Kitano, Makiko Ono, Masayuki Yoshida, Emi Noguchi, Akihiko Shimomura, Tatsunori Shimoi, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Chikako Shimizu, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara, Hitoshi Tsuda, Kenji Tamura. Prognostic and predictive values of PD-1 and PD-L1 expression among patients who received neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer. 査読有、ESMO Open, 2巻2号、2017、

e000150.

Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Masayuki Yoshida, Chikako Shimizu, Takayuki Kinoshita, Kenji Tamura. Prognostic significance of progesterone receptor expression in estrogen-receptor positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancer with a low Ki-67 labeling index. 査読有、Clinical Breast Cancer, 17巻1号、2017、41-47. Sho Shiino, Takayuki Kinoshita, Masayuki Yoshida, Kenjiro Jimbo, Sota Asaga, Shin Takayama, Hitoshi Tsuda. Prognostic impact of discordance in hormone receptor status between primary and recurrent sites in the patients with recurrent breast cancer. 査読有、Clinical Breast Cancer, 16巻4号、2016、e133-e140.

Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Takayuki Kobayashi, Fumitaka Takeshita, Ryou-u Takahashi, Kenji Tamura, Sadako Akashi-Tanaka, Tomoyuki Moriya, Tamio Yamasaki, Takayuki Kinoshita, Junji Yamamoto, Yasuhiro Fujiwara, Takahiro Ochiya, Expression of ribophorin II (RPN2) in human breast cancer. 査読有、Pathology International, 65巻6号、2015、pp. 301-308.

Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Chikako Shimizu, Masashi Ando, Kenji Tamura, Takayuki Kinoshita, and Yasuhiro Fujiwara. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with three different cut-off values and histological and nuclear grades in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. 査読有、Breast Cancer, 22巻3号、2015、141-152.

Takayuki Kobayashi, Kenkichi Masutomi, Kenji Tamura, Tomoyuki Moriya, Tamio Yamasaki, Yasuhiro Fujiwara, Shuji Takahashi, Junji Yamamoto, Osamu Matsubara, Hitoshi Tsuda. Nucleostemin expression in invasive breast cancer. 査読有、BMC Cancer, 14巻1号、2014、215.

[学会発表](計10件)

津田 均、田辺裕子、木下貴之、田村研治・臓器別シンポジウム：乳がん治療のゲノム個別化を促進する。乳癌の微小免疫環境と治療感受性について。第53回日本癌治療学会、2015年10月29~31日、京都。田辺裕子、津田 均、吉田正行、木下貴之、公平 誠、温泉川真由、山本春風、米盛 勸、清水千佳子、藤原康弘、田村研治。術前化学療法抵抗性トリプルネガティブ

乳癌における HMGB1 発現の検討 . 第 23 回日本乳癌学会学術集会、2015 年 7 月 2 日～4 日、東京 .

田辺裕子、津田 均、吉田正行、木下貴之、橋本 淳、公平 誠、温泉川真由、米盛勸、山本春風、清水千佳子、藤原康弘、田村研治 . 術前化学療法中に病状進行を認めるトリプルネガティブ乳癌の臨床病理所見の検討 . 第 73 回日本癌学会総会、2014 年 9 月 25～27 日、横浜

田辺裕子、津田 均、吉田正行、山本春風、公平 誠、温泉川真由、米盛勸、清水千佳子、田村研治、木下貴之、藤原康弘 . Histopathologic and immunohistochemical findings in triple-negative breast cancers showing clinical progressive disease during neoadjuvant chemotherapy. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2014 年 7 月 17 日～19 日、福岡 .

田辺裕子、津田 均、山本春風、公平 誠、温泉川真由、米盛勸、清水千佳子、田村研治、木下貴之、藤原康弘 . Clinicopathological findings for epithelial-to-mesenchymal transition in TNBC. 第 22 回日本乳癌学会総会、2014 年 7 月 10～12 日、大阪 .

Yuko Tanabe, Hitoshi Tsuda, Masayuki Yoshida, Makoto Kodaira, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Harukaze Yamamoto, Chikako Shimizu, Yasuhiro Fujiwara, Kenji Tamura. Histopathologic and immunohistochemical findings in triple-negative breast cancers showing clinical progressive disease during neoadjuvant chemotherapy. The 50th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. May 30-June 3, 2014, Chicago, IL, U.S.A. Yuko Tanabe, Hitoshi Tsuda, Chikako Shimizu, Harukaze Yamamoto, Makoto Kodaira, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Kenji Tamura, Takayuki Kinoshita, Yasuhiro Fujiwara. Histopathological and immunohistochemical findings for epithelial-to-mesenchymal transition were associated with clinical progressive disease of triple-negative breast cancers during neoadjuvant chemotherapy. The 36th San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec. 10-14, 2013, San Antonio, TX, U.S.A.

津田 均、田辺裕子、小野麻紀子、吉田正行、田村研治 . 臓器別シンポジウム 06 乳がん治療の最前線：進行・再発乳がんの治療戦略 . Bench to Home (トリプルネガティブ乳癌を基礎から考える) . 第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24～26 日、京都 .

田辺裕子、津田 均、山本春風、公平 誠、

温泉川真由、米盛 勸、清水千佳子、田村研治、木下貴之、藤原康弘 . 術前化学療法中に病状進行を認めたトリプルネガティブ乳癌 23 例の臨床病理学的検討 . 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2013 年 8 月 29～31 日、仙台 .

津田 均 . シンポジウム 8 乳腺腫瘍の新 WHO 分類 . 化生癌とくに low grade adenosquamous carcinoma と fibromatous-like metaplastic carcinoma など . 第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6～8 日、札幌 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

津田 均 (Tsuda Hitoshi)

国立がん研究センター中央病院・病理科・臨床検査科・科長 (2013 年 3 月まで)

防衛医科大学校・病態病理学講座・教授 (2013 年 4 月以降)

研究者番号：70217321

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉田正行 (Masayuki Yoshida)

国立がん研究センター中央病院・病理科・臨床検査科

木下貴之 (Takayuki Kinoshita)

国立がん研究センター中央病院・乳腺外科・科長

田村研治 (Kenji Tamura)

国立がん研究センター中央病院・乳腺・腫瘍内科・科長

小野麻紀子 (Makiko Ono)

国立がん研究センター中央病院・乳腺・腫瘍内科

田辺裕子 (Yuko Tanabe)

国立がん研究センター中央病院・乳腺・腫瘍内科