

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860282

研究課題名(和文) 脂質代謝とオートファジーに着目した乳腺アポクリン癌の代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Lipid Metabolism and Autophagic Status in the Breast Apocrine Cancer

研究代表者

淵之上 史 (FUCHINOUE, Fumi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10409021

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)：癌細胞増殖や細胞の癌化に代謝関連因子が関わるということが明らかになってきている。乳腺特殊型であるアポクリン癌における脂質代謝とオートファジーの状況、さらに細胞増殖へのかかわりについて検索した。アポクリン癌と非アポクリン癌におけるPGC1 $\alpha$ とp62との発現比較検討より、アポクリン癌では脂質代謝亢進、オートファジー不全が存在する可能性が示された。また、免疫組織染色によるp62蛋白発現検索が、アポクリン癌とアポクリン化生上皮との鑑別に有用である可能性が示された。乳腺アポクリン癌培養細胞において、p62のノックダウンが細胞増殖を抑制したことより、p62はアポクリン癌細胞の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the recent years, metabolism-related factors have been elucidated as a cause in the increase of the cancer cells and cancerization of normal cells. In this study, three new findings have been established through investigations of lipid metabolic and autophagic status in apocrine carcinoma, which is categorized as a special type of breast carcinoma, and whether or not they relate to cell proliferation. Firstly, stimulation of lipid metabolism and impairment of autophagy are speculated in apocrine carcinomas by contrasting PGC1 $\alpha$  and p62 expression within apocrine and non-apocrine carcinomas. Secondly, immunohistochemical analysis of p62 is useful for differential diagnosis of apocrine carcinoma and apocrine metaplasia of the breast. Finally, knockdown of p62 resulted in a reduction of cell proliferative activity in breast cancer cell lines of the apocrine type, indicating that p62 could be a therapeutic target in apocrine carcinoma.

研究分野：病理学

キーワード：乳癌 アポクリン癌 オートファジー 脂質代謝 p62 PGC1 $\alpha$

1. 研究開始当初の背景

乳癌は形態学的分類による診断と同時に、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 発現による分類が行われ、これにより全身療法 (内分泌療法、分子標的療法、化学療法) が選択される。ER が陽性であれば内分泌療法、HER2 が陽性であれば分子標的療法 (抗 HER2 療法) を施行するが、いずれも陰性の場合には、生物学的特徴を欠くため化学療法が唯一の手段となっている。

乳腺アポクリン癌は、好酸性細胞質にミトコンドリアや脂肪滴を豊富に含むという形態学的特徴から特殊型に分類されている。ほとんどの症例は ER 陰性、androgen receptor (AR) 陽性を示すことより、新たな治療対象群として着目されている。

近年、DNA マイクロアレイ法をもちいた遺伝子発現のクラスター解析により、アポクリン癌では、脂質代謝など代謝関連分子遺伝子が高発現していることが解明された。また、アポクリン癌の細胞質にはミトコンドリアや脂肪滴を豊富に含むことと、肝細胞癌などに見られる、オートファジー不全状態を反映する細胞質内封入体に類似した構造を有することより、アポクリン癌では通常の癌とは異なった代謝機構、すなわち、1) ミトコンドリア、脂質の産生増加、2) オートファジー不全、が生じていることが推察されるが、詳細な検討報告はない。

さらに、病理診断においては、アポクリン化生細胞 (良性) とアポクリン癌との鑑別が、形態学的観察のみでは困難となる場合がしばしばある。しかし、この鑑別に有用な分子マーカーは発見されておらず、適切な治療を行うために、鑑別に有用な分子を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

乳腺アポクリン癌におけるミトコンドリア新生、脂質代謝関連因子である PGC1、およびオートファジー、細胞増殖関連因子である p62 発現の特徴を明らかにし、従来鑑別困難であった病変の病理診断法の確立、および個別化治療のための新たな標的分子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳腺手術組織をもちいた観察的研究

対象と材料:

2000 年～2012 年までに日本大学医学部附属板橋病院において乳房切除手術された、初発未治療女性群 1,895 例より、アポクリン癌 47 例 (全例)、非アポクリン癌 62 例 (無作為抽出) を対象として検討を行った。また非癌病変で切除手術された乳腺症例 8 例 (無作為抽出) も対象とした。材料にはホルマリン固定パラフィン包埋切片をもちいた。

PGC1、p62 の蛋白および遺伝子発現量測定:

ティシューマイクロアレイ (TMA) 検体を作成し、薄切してパラフィン包埋切片を作成した。これをもちいて免疫組織化学染色法 (IHC 法) による PGC1、p62 発現検索をおこなった。また癌組織に関しては、laser assisted microdissection 法 (LMD 法) で癌成分のみを切削回収し、サンプルから total RNA を抽出後、cDNA の合成を行い、qRT-PCR 法 (nested PCR 法) をもちいて PGC1、p62 それぞれの mRNA の発現量を定量した (図 1)。PCR 法にもちいた first primer は Primer 3 ソフトウェアをもちいて設計した (表 1)。second primer は Taq Man primer/probe をもちいた (PGC1: Hs01016730\_g1, p62: Hs00177654\_m1, -actin: Hs01060665\_g1, Life Technologies)

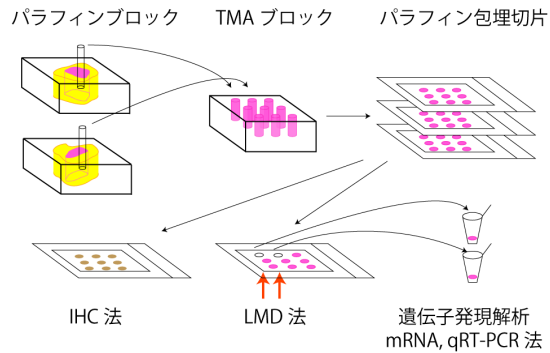


図 1 乳腺手術組織をもちいた観察的研究方法概要

Target	forward primer	reverse primer
PGC1 α	5' -ccgaattctcccttgatgtg-3'	5' -tgcgatattcttccctcttcag-3'
p62	5' -acgttggggagagtggtg-3'	5' -ggtcaggcggctcttttt-3'
β-Actin	5' -cgtttccctccatcg-3'	5' -gatggggtacttccagggtga-3'

表 1 nested PCR の first primer 配列

(2) 乳癌培養細胞をもちいた実験的研究

対象と材料:

乳腺アポクリン癌培養細胞 2 種類 (MDA-MB-453、MFM223) をもちいた。p62 のノックダウンおよび細胞増殖能測定:

アポクリン癌培養細胞を、p62 に対する siRNA (siGENOME SMART pool, M-010230-00-0005, Life Technologies) で処理し、ノックダウンを行った。ノックダウンは、qRT-PCR 法と western blotting 法で確認した。p62 ノックダウンによる

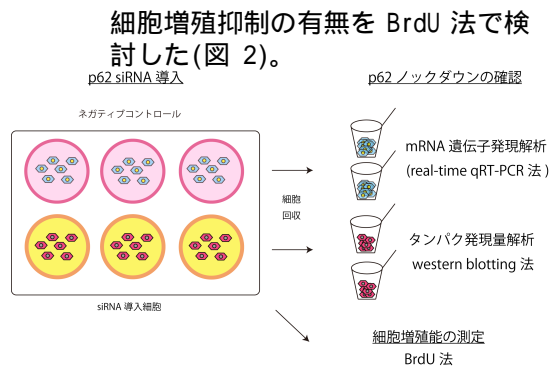


図 2 乳癌培養細胞をもちいた実験的研究概要

#### 4. 研究成果

(1) アポクリン癌と非アポクリン癌における PGC1 と p62 との蛋白発現および遺伝子発現比較検討

アポクリン癌は非アポクリン癌に対し、PGC1 陽性率(IHC 法)、および mRNA 発現量がともに有意に高かった結果より、乳腺アポクリン癌におけるミトコンドリアや脂肪滴の貯留には、PGC1 発現が関与する可能性が示された(IHC:  $p < 0.01$ , mRNA:  $p < 0.01$ )。

アポクリン癌は非アポクリン癌に対し、p62 陽性率(IHC 法)が有意に高かった一方、p62 mRNA 発現量には差が見られなかった結果より、アポクリン癌における p62 蛋白貯留が考えられ、アポクリン癌ではオートファジー不全が存在する可能性が示された(IHC:  $p < 0.05$ , mRNA:  $p = 0.63$ )。

以上、アポクリン癌では脂質代謝亢進、オートファジー不全が存在する可能性が示された(図 3)。今後アポクリン癌での、オートファジー不全を証明するための詳細な検討を行う。

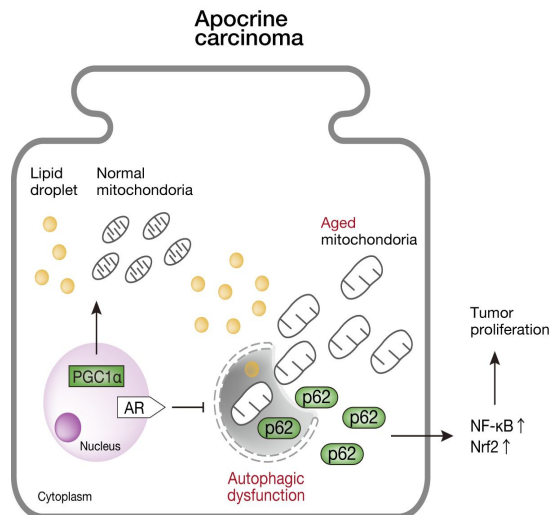


図 3 本研究により導き出された、乳腺アポクリン癌における仮説

(2) p62 IHC 法による、アポクリン化生細胞(良性)とアポクリン癌との病理組織学的鑑別法の検討

IHC 法による p62 細胞質陽性強度を 0(陰性)、1+(弱陽性)、2+(中等度陽性)、3+(強陽性)に分類した場合、染色強度別内訳は、アポクリン癌 0/1+/2+/3+ : 1/13/27/6、アポクリン化生上皮 0/1+/2+/3+ : 1/7/0/0 であり、アポクリン癌はアポクリン化生上皮に比べ、p62 陽性強度が有意に高かった( $p < 0.001$ )。さらに、細胞質の染色性陰性~弱陽性を陰性、中等度陽性~強陽性を陽性とした場合、アポクリン癌はアポクリン化生上皮や正常乳腺上皮に比べ、p62 陽性率が有意に高く(33/47 v.s 0/8,  $p < 0.001$ ) (図 4, 図 5)、p62 のアポクリン癌に対する感度は 70.2%、特異度は 100%、陽性的中率は 100%、また AUC は 0.859 であった。

以上より、IHC 法による p62 の検索はアポクリン化生上皮とアポクリン癌との鑑別に有用である可能性が示された。今後は、異型アポクリン化生について、p62 IHC 法による検討を行い、アポクリン癌との鑑別法の確立を目指す。

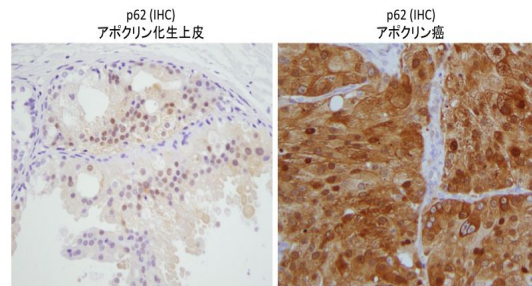


図 4 p62 発現 IHC 法

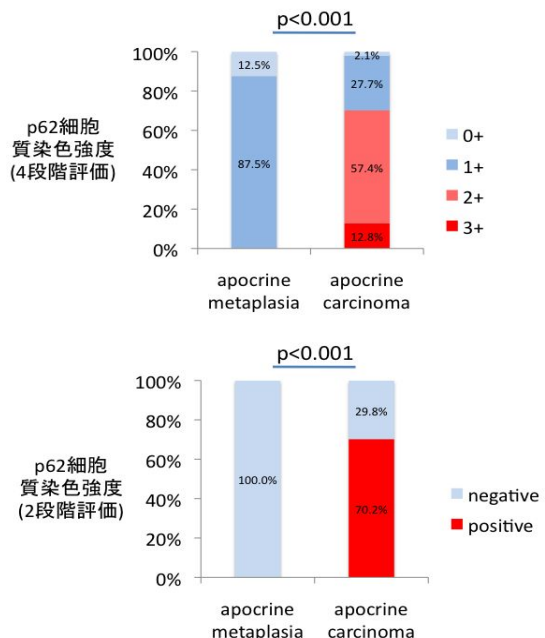


図 5 アポクリン化生上皮とアポクリン癌における、p62 陽性率

(3) 乳腺アポクリン癌モデル培養細胞における p62 遺伝子のノックダウンによる細胞増殖能変化

2 種類の乳腺アポクリン癌培養細胞である、MDA-MB-453 と MFM223 をもちい、p62 ノックダウンによる細胞増殖抑制の有無を検討した結果、p62 のノックダウンによる腫瘍増生抑制効果が認められた (MDA-MB-453 :  $p < 0.01$ 、MFM223 :  $p = 0.018$ )。

以上より、p62 はアポクリン癌細胞の治療標的となる可能性が示された。

## 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 1 件)

Fuchinoue F, Hirotani Y, Nakanishi Y, Yamaguchi H, Nishimaki H, Noda H, Tang XY, Iizuka M, Amano S, Sugitani M, Nemoto N, Masuda S. Overexpression of PGC1 and accumulation of p62 in apocrine carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 査読有 65:19-26, 2015. DOI: 10.1111/pin.12235.

[学会発表](計 3 件)

淵之上 史、molecular apocrine 乳癌培養細胞は、p62 ノックダウンにより細胞増殖が抑制される、第 23 回日本乳癌学会学術総会、2015 年 7 月 2 日～2015 年 7 月 4 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

淵之上 史、p62 免疫組織染色をもちいた、乳腺アポクリン化生上皮とアポクリン癌との鑑別法の検討、第 104 回病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～2015 年 5 月 2 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

淵之上 史、乳腺アポクリン癌における PGC1 , p62 の発現検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日～2014 年 4 月 26 日、ANA クラウンホテル広島(広島県・広島市)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

淵之上 史 (FUCHINOUE, Fumi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10409021