

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461943

研究課題名(和文) 血管外血小板凝集による乳癌細胞の転移形質獲得の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of metastatic mechanism of breast cancer cells by the extravascular platelet aggregation and new therapeutic development

研究代表者

井口 雅史 (INOKUCHI, MASAFUMI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90401918

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)：本研究では、血小板が癌の浸潤や転移を促進する癌微小環境の一因であることに着目し、乳癌における血小板の存在、上皮間葉転換(EMT)や化学療法の効果との関連を検討した。術前化学療法を行った原発性乳癌の生検標本を用いて免疫組織化学検査にて、検討した結果、血小板(CD42b発現)は59%に認め、腫瘍浸潤先進部や血管周辺の腫瘍細胞周囲に多く観察され、EMT様形態変化を認めた。またCD42b陽性例は、病理学的完全奏功(pCR)との間にも有意な相関を認めた。

以上より、乳癌における癌細胞周囲の血管外血小板の存在とEMTとの関連性が明らかとなり、癌治療のターゲットとして臨床応用が期待される研究となった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the presence of platelets around breast cancer primary tumor cells, and the associations among platelets, tumor cells, chemoresistance, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). We retrospectively analyzed data from patients with breast cancer who underwent neo-adjuvant chemotherapy. The presence of platelets(CD42b) was observed in 59% breast cancer biopsy specimens. Platelet positive tumor cells showed EMT-like morphological changes and EMT marker expression. Primary tumor cells associated with platelets were less responsive to neo-adjuvant chemotherapy. Platelets were an independent predictor of the response to chemotherapy upon multivariable analysis. In conclusion, platelets surrounding primary tumor cells were significantly associated with the chemotherapeutic response in breast cancer, and it may represent novel predictors of chemotherapeutic responses.

研究分野：乳癌外科

キーワード：血小板 乳癌 化学療法抵抗性 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性のもっとも罹患率の高い癌であるが、近年の乳癌サブタイプ分類に基づいた薬物療法の進歩により治療成績の向上は著しい。しかし、内分泌療法、化学療法、分子標的治療を用いた集学的治療を用いても、完全に癌の転移・再発を制御することは未だ難しく、死亡率の低下に結びついていないのが現状である。乳癌の治療抵抗性に関与する因子として注目されているものに(1)免疫寛容、(2)上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)がある。これらの免疫逃避機構や EMT が、化学療法抵抗性と関与している可能性があり、最近の癌研究で注目されている腫瘍微小環境に、これらが誘導される原因が隠れている可能性がある。

近年、血管内血小板が癌細胞の浸潤や転移を促進する癌微小環境の一因子であることが認識されつつある。これまで、血管内に侵入した癌細胞が血小板に取り囲まれる現象(クローク形成)により、直接的に shear stress から保護されるとともに血小板表面に発現する major histocompatibility complex (MHC) class II により免疫監視機構から逃避すること、さらに TGF- β をはじめとした血小板から放出される液性因子により上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)が誘導されることが報告されている。しかし、血管外の癌原発巣における血小板の存在、およびその意義に関しては明らかになっていない。これは血小板が核を有さず通常のヘマトキシリンエオジン染色では同定が困難であることが要因の一つと考えられる。そこで今回、乳癌を対象に血小板の免疫抑制性微小環境、EMT への関与に注目した研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌原発巣において血管外血

小板の存在を免疫組織化学検査にて評価し、血管外血小板と EMT との関連性、さらに化学療法の治療効果や予後との関連性を検討した。

3. 研究の方法

対象は 2006 年～2013 年に当院で術前化学療法(ドセタキセル 75mg/m² × 4 サイクル、フルオウラシル 500mg/m²、エピルピシン 100mg/m²、シクロフォスファミド 500mg/m² × 4 サイクル)を施行した Stage I ~ C の Human epidermal growth factor receptor 2(HER2)陰性原発性乳癌 74 例で、治療前の生検標本を用いた。血小板の存在診断として血小板膜糖タンパク GP IIb/IIIa に対する抗 CD42b 抗体を用い、また EMT マーカーとして E-cadherin、Vimentin、 β -catenin の発現をそれぞれの抗体を用いて、免疫組織学的検査にて連続切片で観察した。CD42b 発現に関しては、400 倍、5 視野の平均値で陽性腫瘍細胞 10%以上を陽性とした。評価項目としては、(1)CD42b 発現率、(2)CD42b 発現陽性細胞の局在と形態的变化、(3)CD42b 発現陽性細胞の EMT マーカー発現、(4)臨床病理学的因子(臨床病期、核異形度、エストロゲン受容体(ER)発現、CD42b 発現)と術前化学療法による病理学的完全奏功(pathological complete response: pCR)との関連性、(5)CD42b 発現による無再発生存率(RFS)、全生存率(OS)を評価し、統計学的に解析した。

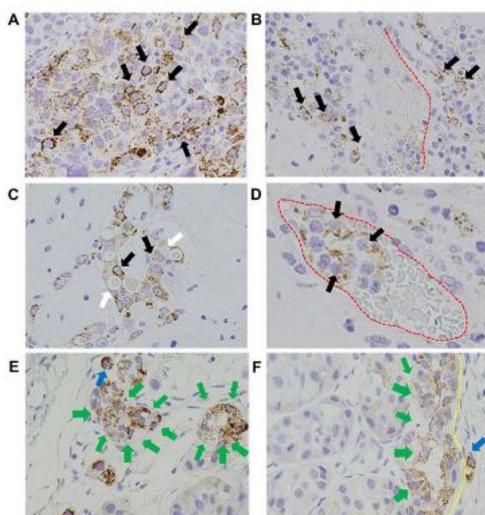
4. 研究成果

(1)生検標本において CD42b 発現陽性例は 74 例中 44 例(59%)に認められた。(表 1)

Clinicopathological parameters	CD42b expression		t or χ^2 test (p-value)
	Positive ($\geq 10\%$) n (%)	Negative ($< 10\%$) n (%)	
Patients	44 (59)	30 (41)	
Stage			0.2280
I	11 (25)	11 (36)	
II	18 (41)	14 (46)	
III	15 (34)	5 (18)	
Nuclear grade			0.1539
G1	6 (14)	8 (26)	
G2	6 (14)	5 (18)	
G3	25 (56)	10 (33)	
Unknown	7 (16)	7 (23)	
Histology			0.4172
Scirrhous carcinoma	33 (75)	22 (73)	
Papillotubular carcinoma	3 (7)	5 (16)	
Solid-tubular carcinoma	6 (13)	3 (11)	
Unknown	2 (5)	0 (0)	
ER status			0.6115
Positive	29 (66)	22 (73)	
Negative	15 (34)	8 (27)	
Chemotherapy response			0.0001
pCR	4 (9)	15 (50)	
Non-pCR	40 (91)	15 (50)	

(表 1) CD42b 発現と乳癌の臨床病理学的因子の関連性

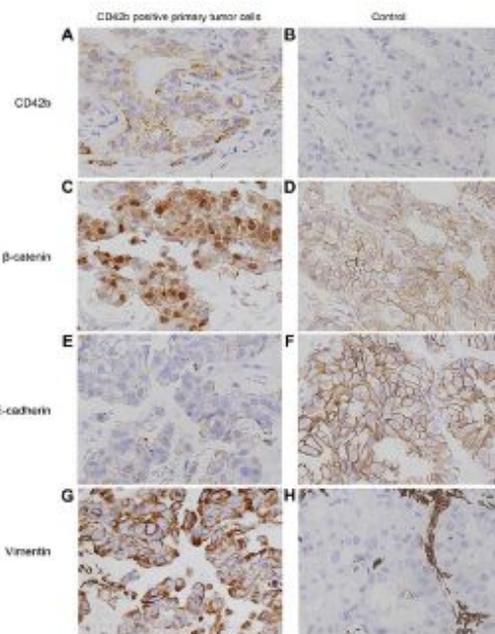
(2) 局在は腫瘍浸潤先進部 (84%) や血管周囲の腫瘍細胞 (68%) に多く観察された。CD42b 陽性腫瘍細胞では極性の喪失など EMT 様の形態変化が認められた。(図 1)



(図 1) 原発性乳癌患者の針生検検体における CD42 発現の免疫組織染色

(A) 腫瘍細胞周囲の CD42b (黒矢印), (B) 血管周囲組織 (赤点線は血管壁), (C) 毛細血管周囲 (白矢印), (D) 血管内, (E) EMT 様の形態変化を示した CD42b 陽性腫瘍細胞 (極性の消失 (緑矢印), 遊走 (青矢印)), (F) 腫瘍先進部 (黄点線) に認める。倍率 400x

(3) CD42b 陽性腫瘍細胞では β -catenin の核内移行、E-cadherin 発現の消失、Vimentin の発現が確認された。(図 2)



(図 2) 連続切片における CD42b 陽性腫瘍細胞の EMT マーカーの発現

(A) CD42b 陽性、(C) カテニン核内陽性 (E) E カドヘリン陰性、(G) ビメンチン細胞膜陽性

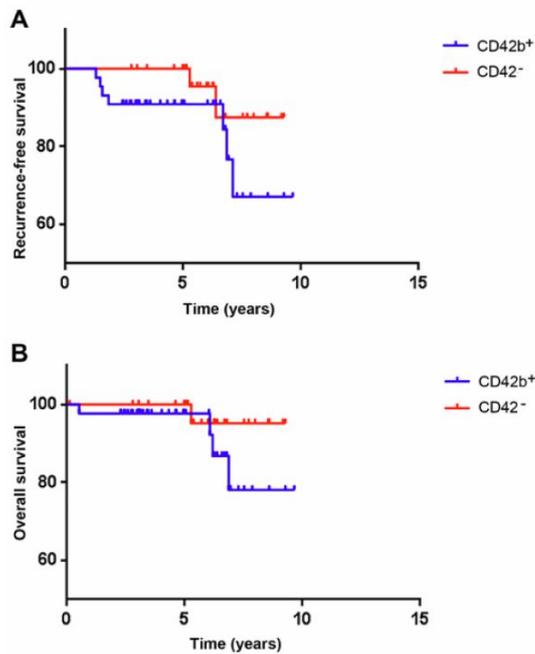
コントロール (CD42b 発現陰性腫瘍細胞): (B) CD42b 発現陰性、(D) カテニン細胞膜陽性、(F) E カドヘリン陽性、(H) ビメンチン陰性、倍率 400x

(4) 臨床病理学的因子と pCR との関連では、CD42b 陽性 (OR 0.03, $p < 0.0001$)、ER 発現 (OR 0.21, $p = 0.03$)、核異形度 (OR 5.31, $p = 0.02$) において有意であった。(表 2)

Clinicopathological parameters	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
CD42b expression (≥ 10 vs. $< 10\%$)	0.1	0.02-0.34	< 0.0001	0.03	0.003-0.15	< 0.0001
ER status (positive vs. negative)	0.49	0.17-1.44	NS	0.21	0.04-0.9	0.03
Clinical stage (III vs. I-II)	0.45	0.11-1.78	NS	1.08	0.18-5.76	NS
Nuclear grade (G3 vs. G1-2)	1.77	0.61-5.1	NS	5.31	1.27-29.4	0.02

(表 2) pCR 予測における CD42b 発現を含む臨床病理学因子の単変量・多変量解析

(5) 予後に関しては CD42b 発現の有無により RFS、OS とともに有意差を認めなかった。(図 3)



(図 3) CD42b 発現の有無と (A) 無再発生存率、(B) 全生存率

CD42b 発現は術前化学療法の予後因子として認識されている病理組織学的因子 (ER 発現や核異形度) に匹敵する化学療法効果予測因子であった。

以上により本研究では、乳癌原発巣におけるがん細胞周囲の血管外血小板の存在、および血管外血小板と EMT との関連を示した。さらに血管外血小板の存在が化学療法の効果予測因子となり得ることを明らかにした。本事象は化学療法の効果予測のみならず、がん浸潤や転移の促進を抑制する治療のターゲットとなる可能性が期待できる。

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)

- 1 Ishikawa S, Miyashita T, Inokuchi M, Hayashi H, Oyama K, Tajima H, Takamura H, Ninomiya I, Ahmed AK, Harman JW, Fushida S, Ohta T.
Platelets surrounding primary tumor cells are related to chemoresistance.

Oncol Rep. 2016 Aug; 36(2):787-94.
doi: 10.3892/or.2016.4898. Epub 2016 Jun 22. PubMed PMID: 27349611. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1 石川聡子、井口雅史、宮下知治、田島秀造、高村博之、二宮 致、伏田幸夫、藤村 隆、太田哲生

乳癌原発巣における血小板の役割：EMT 誘導と化学療法抵抗性

第 37 回日本癌局所療法研究会、2015 年 7 月 10 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市)

- 2 Ishikawa S, Inokuchi M, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Ohta T.

Platelet predominant breast cancer is a new predictor for pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy.

San antonio breast cancer symposium 2014, 2014 年 12 月 9~13 日, Henry B. Gonzalez Convention Center (San Antonio, Texas, USA)

- 3 石川聡子、井口雅史、宮下知治、田島秀造、高村博之、二宮 致、伏田幸夫、藤村 隆、太田哲生

Tumor cells surrounded by platelets showed EMT and chemoresistance in primary breast cancer.

第 23 回日本がん転移学会学術集会、2014 年 7 月 10~11 日、金沢市文化ホール (石川県・金沢市)

- 4 石川聡子、井口雅史、宮下知治、田島秀造、高村博之、二宮 致、伏田幸夫、藤村 隆、太田哲生

血小板が EMT を誘導し乳癌原発巣の化学

療法抵抗性と関連する。

第 22 回日本乳癌学会学術集会、2014 年 7 月 10 ~ 12 日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井口 雅史 (INOKUCHI Masafumi)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号： 90401918

(2)研究分担者

田島 秀浩 (TAJIMA Hidehiro)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号： 00436825

宮下 知治 (MIYASHITA Tomoharu)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号： 30397210