

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

癌間質・脈管内組織の生物学的特性に基づく癌悪性度評価

研究代表者 長谷部 孝裕 (国際医療センター 病理診断科)

研究分担者 杉山 迪子*, 島田 浩子*

緒 言

近年腫瘍間質の性状が癌の悪性度を規定し、腫瘍間質における腫瘍遺伝子発現が重要な役割を担うことが報告された (Patocs A, et al. *New Engl J Med* 2007; 20: 2543-51. Lim KP, et al. *J Pathol* 2011; 223: 459-69. Torres S, et al. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6006-19. Augsten M, et al. *Cancer Res* 2014; 74: 2999-3010.).

以前より、我々は腫瘍間質の生物学的性状が癌の増殖・伸展に深く係わることを乳癌、大腸癌、膵癌等で報告してきた (Hasebe T, et al. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 385-94. Hasebe T, et al. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 195-208. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2001; 32: 401-9. Watanabe I, Hasebe T, et al. *Pancreas* 2003; 26: 326-33.). 殊に浸潤性乳管癌 (以下 invasive ductal carcinoma, IDC) における Fibrotic focus (FF) は、乳管癌患者転帰及び腫瘍内血管新生亢進と有意に相関することを報告した (Hasebe T, et al. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 195-208. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2002; 15: 502-16. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2008; 39: 681-93. Jitsuiki Y, Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 1999; 12: 492-8.). その後、FFの予後因子としての有用性及び血管新生亢進との相関は、欧米施設においても確証された (Colpaert C, et al. *Histopathology* 2001; 39: 416-25. Colpaert C, et al. *J Pathol* 2001; 193: 442-9. Colpaert C, et al. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81: 137-47. Baak JPA, et al. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2093-101. Van den Eynden GG, et al. *Br J Cancer* 2005; 93: 1128-36. Maiorano E, et al. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 211-8.). さらにcDNAマイクロアレイ解析により、FFの存在は低酸素・リンパ管・血管新生関連遺伝子、予後不良規定遺伝子等の発現と有意に相関することも明らかとなった (Van den Eynden GG, et al. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2944-52.). 我々も原発腫瘍組織だけでなく、リンパ節転移腫瘍組織間質性状も予後の有意な指標となることを、術前薬物療法陽性例を含む異なるIDC母集団において確証した (Tamura N, Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2009; 100: 2101-8. Hasebe T, et al. *Hum*

Pathol 2011; 42: 998-1006.). また、p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞、殊にFF内p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞の存在が極めて重要であることを報告した (Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2009; 100: 2101-8. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2010; 41: 262-70. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2010; 23: 662-72.). さらに、p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞の中には、奇怪な核を有する異型腫瘍間質線維芽細胞 (atypical tumor stromal fibroblast, ATSF) が有意に多く、その存在は、術前薬物療法の有無に係わりなくIDC例の重要な病理組織学的予後因子となることを報告した (Hasebe T, et al. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 325-36. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2011; 42: 998-1006.).

次に、我々はリンパ管腫瘍塞栓異型度 (Ly-Grade) が、極めて有用な乳管癌の組織学的予後因子となることを術前薬物療法施行例も含む異なる3群のIDC母集団で証明した (Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2008; 39: 427-36. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2010; 41: 706-15. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2010; 23: 581-92.).

以上の腫瘍間質、Ly-Grade関連の研究成果を基に、我々はIDCにおける重要な病理組織学的予後因子を総括し報告し (Hasebe T, et al. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1484-97.), Ly-Grade, ATSFの存在は、IDCの局所再発と密接に関係することを解明した (Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2013; 104: 1252-61.).

以上の研究は、主に国立がん研究センター中央・東病院で手術されたIDC症例を対象に行った研究であった。今後の研究は、埼玉医科大学国際医療センターで手術切除されたIDC症例を対象とするものであり、我々が提唱してきた組織学的悪性度評価の普遍性を示すと共に、組織形態像に基づく癌悪性度評価に科学的根拠を与え、癌の生物学的特性も踏まえた、新たな病理組織学的悪性度評価法を確立することを目標とする。今回は、1) 静脈内腫瘍塞栓、2) FFと腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) の浸潤に焦点をあてた研究を行い、IDCの増殖・伸展における静脈内腫瘍組織および原発腫瘍間質の重要性を解明する。

* 国際医療センター 乳腺腫瘍科

材料および方法

1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

263例のIDCを対象とした。症例は術前薬物療法陰性症例であり、2007年2月から2009年12月の期間において、国際医療センターで手術・切除された症例である。263例中248例は術後薬物療法が施行され、すべての症例はUICC pTNM分類により病期分類された。

BV-gradeは、静脈内腫瘍塞栓を形成する腫瘍細胞の核分裂像およびアポトーシス像により分類される(表1)。

加えて、Ki-67およびcaspase 3による免疫染色により、静脈内腫瘍塞栓形成腫瘍細胞の増殖能およびアポトーシス率も計測した。

静脈腫瘍塞栓の核分裂像とMIB-1腫瘍細胞増殖能標識率およびアポトーシス像とcaspase 3発現率間の相関は、ANOVAにより検討した。患者転帰との関係については、単変量・多変量解析共に、Cox proportional hazard

regression modelにより行い、静脈腫瘍塞栓異型度と既知臨床病理学的因子の中から、腫瘍再発に有意に相関する因子を求めた。

2) FFとTAMに関する研究

258例のIDCを対象とした。症例は術前薬物療法陰性症例であり、2007年2月から2009年12月の期間において、国際医療センターで手術・切除された症例である。258例中244例は術後薬物療法が施行され、すべての症例はUICC pTNM分類により病期分類された。

免疫染色により、TAMの細胞表面マーカー (CD68, CD163, CD204) を染色し、腫瘍内に浸潤する3種のTAMの細胞数の計測を試みた。細胞数は弱-中拡大で、TAMが最も多く浸潤している領域を同定し、強拡大(x40)1視野における、CD68陽性TAM数、CD163陽性TAM数、CD204陽性TAM数を計測した。

FFおよび既知臨床病理学的因子とTAM浸潤の相関は、ANOVA (単変量) および重回帰分析 (多変量) により解析した。TAM, FF, および既知臨床病理学的因子と患者転帰との相関 (単変量・多変量) は、Cox proportional hazard regression modelにより行った。

表 1.

静脈腫瘍塞栓異型度		
異型度 0	静脈侵襲像陰性	
異型度 1, 2	静脈侵襲像陽性	
	静脈腫瘍塞栓	
	核分裂数	アポトーシス数
異型度 1	低細胞周期型	
1a	0	いかなる数
1b	1	0, 1, 2
異型度 2	高細胞周期型	
2a	1	3個以上
2b	2個以上	1個以上

結 果

1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

静脈腫瘍塞栓核分裂数と静脈腫瘍塞栓MIB-1標識率との間には有意な相関を認めた ($p<0.001$)。静脈腫瘍塞栓アポトーシス数とcaspase 3陽性細胞数との間にも有意な相関を認めた ($p=0.001$)。BV-Gradeと静脈内腫瘍塞栓MIB-1標識率およびcaspase 3陽性細胞数の間にも有意な相関を認めた(図1)。

多変量解析による予後検討の結果、BV-Grade 2症例は、全症例、リンパ節転移陰性・陽性症例、病期I/II症例、病期III症例、ホルモン受容体陽性症例、HER2陰性症例に

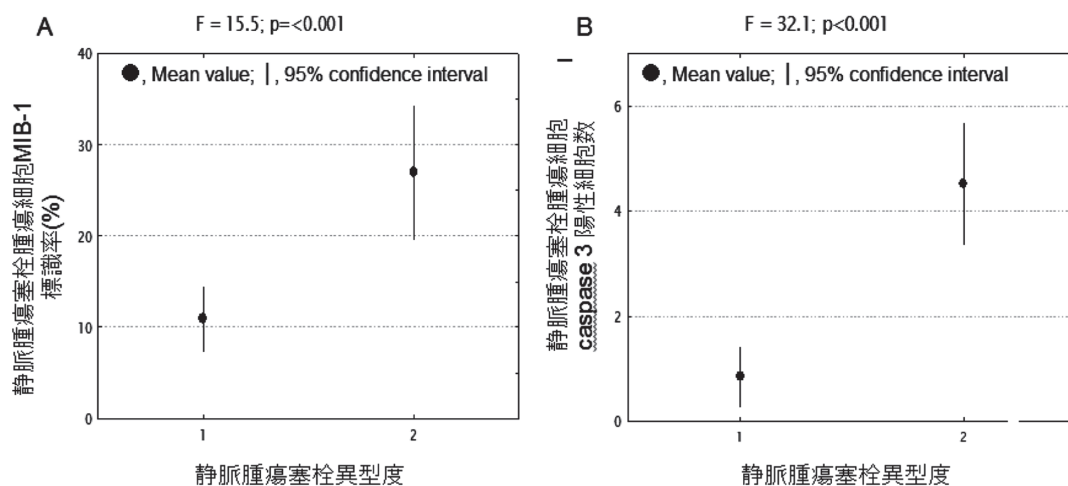


図 1.

において、有意な腫瘍再発の予後因子となることが明らかとなった。また、BV-Grade 1症例は、BV-Grade 0症例（静脈侵襲陰性例）とほぼ同様の腫瘍再発・死亡率を示し、BV-Grade 1症例とBV-Grade 0症例との間には、有意な差を認めないことが明らかとなった。

2) FFとTAMに関する研究

3種TAM浸潤と有意な相関を示した因子は、FFのみであり、FF陽性症例において、3種TAM浸潤が有意に多く、かつ、FF径が大きくなるに従い、TAM浸潤数も高値となることが判明した(表2)。

表 2.

TAM 浸潤					
CD68-陽性 TAM		CD163-陽性 TAM		CD204-陽性 TAM	
β	p-value	β	p-value	β	p-value
SE		SE		SE	
Fibrotic focus (mm) : absent, ≤ 8 , >8					
0.245	<0.001	0.147	0.019	0.254	<0.001
0.060		0.062		0.059	

単変量解析による予後検討では、3種のTAMでは、CD204陽性TAM数が腫瘍再発と密接に関係していることが明らかとなった。CD204陽性TAM数、FFを含む既知臨床病理学的因子との多変量解析では、FFは全例、病期I/II例、病期III例、リンパ節転移陽性例において腫瘍再発と有意な相関を示し、CD204陽性TAM数は全例、リンパ節転移陽性例、MIB-1増殖能高値例において、腫瘍再発と有意な相関を示した。

FFとCD204陽性TAMとを組み合わせた分類を作成し、検討した結果、FF/CD204陽性TAM分類は、全例、病期I/II例、病期III例、リンパ節転移陰性例、リンパ節転移陽性例、HER2陰性例、MIB-1増殖能高値例、すべてのsubgroupにおいて、腫瘍再発と有意に相関することが判明した。

考 察

1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

BV-Gradeで評価することにより、静脈侵襲陽性症例の中から、予後良好群(BV-Grade 1)と予後不良群(BV-Grade 2)を選別可能であり、静脈侵襲の有無、静脈侵襲数での評価に比べ、より詳細な予後検討ができることが明らかとなった。BV-Gradeは、腫瘍塞栓腫瘍細胞の核分裂像、アポトーシス像により評価しており、腫瘍塞栓腫瘍細胞の細胞周期を調節する因子の遺伝子および蛋白発現の重要性が示唆される。また、腫瘍塞栓内における腫瘍間質成分の存在および役割、腫瘍細胞—腫瘍間質細胞

相互作用、上皮—間葉移行などの腫瘍塞栓内微小環境及び高細胞周期を示す腫瘍塞栓細胞が産生・分泌する因子の解明が標的治療等を考慮する上で、今後必要になると考えられる。

2) FFとTAMに関する研究

IDCの組織像を検討するにあたり、FFの存在はTAM浸潤の多寡を正確に推測する上で、極めて重要な組織学的指標となりえることが明らかとなった。また、FFの存在およびCD204陽性TAM浸潤の程度は、それぞれ単独でも、IDC患者の転帰を推測する上で有用な因子であったが、両因子を組み合わせて評価する、FF/CD204分類は、より正確にIDC患者の転帰を評価できることを解明した。TAMは腫瘍内において、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、増殖因子受容体などを産生し、IDCの増殖・浸潤に密接に係わることが明らかとなっている。よって、IDCにおけるFFの存在は、TAM浸潤を標的とした治療を行う上で、症例選択に有用であり、TAM標的治療を行うことにより、FF陽性IDC症例の予後改善に寄与できるものと示唆される。今後は、FF陽性IDC内に浸潤するTAMsが、どのような種類のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、増殖因子受容体因子等を産生しているのか解明することが肝要と考えられる。

研究成果リスト

論文

- 1) Sugiyama M, Hasebe T, Shimada H, Takeuchi H, Shimizu K, Shimizu M, Yasuda M, Ueda S, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T. Grading system for blood vessel tumor emboli of invasive ductal carcinoma of the breast. Hum Pathol 2015;46:906-16.
- 2) Shimada H, Hasebe T, Sugiyama M, Shibasaki S, Ueda S, Sugitani I, Shimizu K, Gotoh Y, Yasuda M, Arai E, Takeuchi H, Osaki A, Saeki T. Fibrotic focus and tumor-associated macrophage in invasive ductal carcinoma of the breast. (投稿中)

学会発表

- 1) 杉山迪子, 長谷部孝裕, 島田浩子, 清水京子, 清水道生, 安田政実, 大崎昭彦, 佐伯俊昭. 静脈腫瘍塞栓異型度—浸潤性乳管癌の有用な予後因子, 第104回日本病理学会総会, 平成27年4月, 名古屋
- 2) 島田浩子, 長谷部孝裕, 杉山迪子, 清水京子, 安田政実, 新井栄一, 大崎昭彦, 佐伯俊昭. Fibrotic focus—腫瘍関連マクロファージ浸潤と最も有意な相関を示す乳癌組織形態因子, 第105回日本病理学会総会, 平成28年5月, 仙台(発表予定)