

## 主論文

Evaluation of aldehyde dehydrogenase 1 and transcription factors in both primary breast cancer and axillary lymph node metastases as a prognostic factor

(乳癌原発巣と腋窩リンパ節転移巣での ALDH1 と転写因子の発現は予後予測因子となり得るか)

### [緒言]

乳癌において腋窩リンパ節転移の有無は最も重要な予後因子の一つで、腋窩リンパ節転移の個数は術後治療の方針決定において重要な指標となる。術後補助療法はその他に腫瘍のサブタイプと Ki67 値を指標として決定されるが、これらの指標がどれだけ有効か、また指標として十分かという点についてはまだ議論の余地がある。

腫瘍における癌幹細胞の存在は予後不良因子となり得ると言われており、乳癌では 2007 年に癌幹細胞マーカーとして ALDH1 の発現が予後不良因子であると報告された。乳癌の転移はまず腋窩リンパ節に起こることが多く、また乳癌原発巣と転移巣ではしばしばバイオマーカーの発現において乖離が見られることから、我々は 1-3 個の腋窩リンパ節転移を伴う乳癌患者を対象に ALDH1 の発現と予後について検討を行い、腋窩リンパ節転移巣で ALDH1 が発現している症例では有意に DFS が短いと報告した。

乳癌の進行過程では上皮間葉形質転換(EMT)によって細胞間接着が失われ、細胞は遊走能と浸潤能を獲得する。この働きを促進するのが Snail、Slug、Twist といった転写因子でいわゆる EMT マーカーと呼ばれている。これらの EMT マーカーの発現と予後との相関については未だ見解の一致を見ていながら、その報告のほとんどが原発巣での評価である。また、EMT が癌幹細胞の形成に寄与していることは報告されているが ALDH1 の発現と EMT マーカーの発現について言及した報告は未だない。

そこで我々は乳癌原発巣と腋窩リンパ節転移巣における ALDH1 と各 EMT マーカーの発現には相関があるのか、また ALDH1 と EMT マーカーの共発現は予後に影響するのか否かについて検討した。

### [材料と方法]

#### 患者と組織検体

2002 年から 2008 年までの間に当院にて手術を施行した腋窩リンパ節転移陽性乳癌患者、47 症例を対象とした。遠隔転移を伴う症例と術前化学療法施行症例は除外した。

複数のリンパ節転移巣を有する症例では最も大きなリンパ節を評価の対象とした。原発巣での臨床病理学的特徴と ER、PgR、HER2 の発現と、原発巣とリンパ節転移巣双方での ALDH1、Ki67、EMT マーカーとして Snail、Slug、Twist の発現を評価した。

### ER、PgR、HER2 の評価

ER、PgR、HER の評価は IHC で行い、ER、PgR は少なくとも 1% の腫瘍細胞が陽性となつた場合に陽性と判定し、HER2 は 2+ もしくは 3+ のスコアで陽性と判定した。

### ALDH1、Snail、Slug、Twist、Ki67 の染色法と評価

ALDH1、Snail、Slug、Twist、Ki67 の評価は IHC で行った。抗体の希釈と染色温度・時間は ALDH1 は 1:1000 希釈で室温 60 分、Snail は 1:500 希釈で室温 15 分、Slug は 1:500 希釈、Twist は 1:50 希釈、Ki67 は抗 MIB1 抗体を 1:300 希釈で使用し、これらは 4°C で一晩置いた。

IHC 後の評価は 2 人で行い、ALDH1 については細胞質の染色を、Snail、Slug、Twist、Ki67 については核の染色のみを評価した。ALDH1 と 3 つの EMT マーカーは 5% 以上の細胞が染まった場合に陽性と判定した。Ki67 については 2013 年のザンクトガレンコンセンサスに基づいて、14% 以上の細胞が染まった場合に陽性と判定した。

### 統計学的解析

各マーカーと臨床病理学的特徴の相関は  $\chi^2$  テストで、生存曲線はログランクテストで、单変量解析と多変量解析は Cox ハザードモデルで行った。 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### [結果]

#### 患者の特徴

47 患者の年齢中央値は 54 歳で、32 人(68%)の患者が 50 歳以上であった。全患者が浸潤性乳管癌の診断を得ていた。腋窩リンパ節転移の平均個数は 8 個であった。追跡期間中央値は 61 か月で 20 人が再発しており、そのうち 15 人が乳癌死していた。

#### 乳癌原発巣と腋窩リンパ節転移巣での ALDH1、Snail、Slug、Twist の発現

47 症例中、原発巣での ALDH1、Snail、Slug、Twist の発現率はそれぞれ 19、49、40、26%、腋窩リンパ節転移巣での発現率はそれぞれ 21、32、13、23% であった。各々のマーカーの原発とリンパ節での発現の有無の一一致率は、それぞれ 77、57、60、64% であった。

原発巣では、Twist 発現のみが ALDH1 の発現と相関を示した。Snail と Slug、Snail と Twist、Slug と Twist といった各々の EMT マーカーの発現には正の相関が見られた。腋窩リンパ節転移巣ではいずれの EMT マーカーの発現も ALDH1 の発現と相関を示さず、また、各々の EMT マーカーの発現にも相関は認めなかった。

#### 各パラメーターの原発巣での発現と臨床病理学的特徴

ALDH1 の発現は ER 陰性と有意に相関しており、またトリプルネガティブタイプで有意

に発現が多かった。4個以上のリンパ節転移を有する症例では有意に各EMTマーカーの発現が高い傾向があった。Twistの発現のみが患者の年齢と相関を示したが、それ以外はいずれのEMTマーカーも臨床病理学的特徴とは相関を示さなかった。

### ALDH1、EMTマーカーの発現と予後の関係

ALDH1、EMTマーカーのいずれのパラメーターも、原発巣、リンパ節のどちらにおいても単独での発現は予後との相関を示さなかった。単変量解析では腋窩リンパ節転移4個以上、Ki67陽性、PgR陰性症例で有意にDFSが短かった。多変量解析ではKi67陽性と原発巣でのSlug陽性症例でDFSが短かった。生存曲線では原発巣でのALDH1とSlugの共発現群で有意にDFSが短かったが、その他の因子の共発現はいずれも予後との相関を示さなかった。

### [考察]

過去のいくつかの報告と同様に、原発巣でのALDH1発現はER陰性と相関を示した。原発巣でもリンパ節転移巣でも、ALDH1単独での発現は予後と相関を示さなかった。ALDH1発現と予後との相関については様々な報告がなされており、原発巣とリンパ節転移巣の双方で、ALDH1発現群はDFS、OSが短いとする報告がある一方、原発巣でのALDH1発現が予後に影響するのは65歳以下の患者のみとする報告もある。

Snail、Slug、TwistはいずれもDNAに結合する転写因子であるため、本研究ではこれらの因子の発現を核での染色のみで評価した。正常細胞が偶発的に染色される場合があるとの報告もあるが、我々はHE染色のスライドと比較することで正常細胞の染色がカウントされる可能性を除外した。各々のEMTマーカーの発現は原発巣では相関関係を示したがリンパ節転移巣では相関が見られず、転移が起こる段階で各転写因子が協働している可能性がある。腫瘍細胞は転移巣に到達後、間葉上皮形質転換(MET)の過程を通して安定した転移巣を形成するという報告もあり、各EMTマーカーが原発巣でのみ相関して発現し、リンパ節では相関を示さなかったのはこの現象によるもの可能性もある。3つのEMTマーカーはいずれも腋窩リンパ節4個以上の症例において原発巣での発現が高く、これらのマーカーがリンパ節転移に寄与するという報告を支持する結果となった。

ALDH1とEMTマーカーの発現と予後との相関についてはまだ議論の余地があり、見解の一致を見ていない。今回我々は各パラメーターの陽性カットオフ値を5%に設定したが、予後への影響を考える上で適切なカットオフ値はいずれのパラメーターでもまだ明確になっておらず、検討の余地がある。

原発巣でのALDH1とSlugの共発現群は有意に短いDFSを示した。今回の研究では、ALDH1と各EMTマーカー単独の発現では予後への影響は大きくないが、これらのマーカーの共発現群はより予後に影響を及ぼす可能性を示した。つまり、癌幹細胞単独の存在や転写因子の単独での働きは予後にそう影響しないが、これらが共存することで、より転移が起

こりやすくなるのではないかと考えられた。EMTは幹細胞特性の獲得だけでなくその特性の維持にも関与していると言われており、組織学的な特徴にも影響しているのかもしれない。癌幹細胞をターゲットとした有効な薬剤ができたとしてもEMTによって癌幹細胞を新生したり、より悪性度の高い性質を獲得したりする可能性がある。EMTを起こすシグナル経路を阻害し癌幹細胞の新生を起こさせないようにする治療戦略が必要である。EMTは薬剤抵抗性にも関与していると言われており、使用薬剤とバイオマーカーの発現、患者の予後との関係を検討することで新たな治療ターゲットが見つかるかもしれない。

#### [結論]

腋窩リンパ節転移陽性乳癌における ALDH1 と転写因子の共発現は、予後予測因子となり得る可能性がある。