

主 論 文

Differences in expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 among estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer cases with early, late, and no recurrence
(ER 陽性 HER2 陰性乳癌・早期再発群, 晩期再発群, 無再発群における癌幹細胞マーカー ALDH1 発現率の差異)

【緒言】

ER 陽性 HER2 陰性乳癌に対する治療は、手術療法、放射線療法、化学療法、内分泌療法を集学的に組み合わせて行われる。しかし、根治後も全体の 10%程度は再発する。また、乳癌治療は臨床病理学的なサブタイプ分類を行うが、ER 陽性 HER2 陰性乳癌は他のサブタイプと比較して、晩期再発（治療から 5 年経過後に認められた再発）を多く認め、問題となっている。そこで、晩期再発を含めた再発予測因子の研究は、今後の予後改善をめざすために重要である。

われわれは再発予測因子を探索するにあたって、乳癌幹細胞マーカーである ALDH1 に注目した。これまでの検討から、ALDH1 は癌細胞の分化や化学療法抵抗性と重要な関連があるとされてきたが、その詳細は明らかでない。また、ALDH1 の発現が予後不良因子であるとする報告がある一方で、ないとした報告も多く存在し、見解は一致しない。また、乳癌のサブタイプ間で ALDH1 の予後的意義は異なり、ER 陽性 HER2 陰性乳癌にのみ予後との相関を認めたとした報告もある。そこで、ER 陽性 HER2 陰性乳癌における ALDH1 の発現意義をより詳細に検討するためにも、本研究を実施した。

【材料と方法】

対象症例

本研究は日本乳癌学会・山下班研究の分担研究の一つとして行った。全国 9 施設で 2001 年 1 月から 2004 年 12 月までに治療を開始した、ER 陽性 HER2 陰性乳癌症例を対象とした。早期再発症例を治療開始から 5 年以内での遠隔再発、晩期再発を治療開始から 5 年以降および 10 年以内での遠隔再発、無再発を治療開始から 10 年間遠隔再発および局所再発なしと定義した。各施設で該当する早期再発症例および晩期再発症例を可能な限り抽出した。次に、各施設で抽出した晩期再発症例数の 2 倍の数を無再発症例として、各施設で年齢を層別化後に無作為に抽出した。また、ER、PgR、HER2、Ki67 の免疫染色を行い、中央判定を行った。ER 陽性 HER2 陰性の定義を満たさない症例やパラフィンブロック片を利用できない症例は除外した。最終的に、早期再発乳癌 184 例、晩期再発乳癌 134 例、無再発乳癌 321 例を本研究の解析対象とした。

ER、PgR、HER2、Ki67 の免疫染色と評価方法

全症例の ER、PgR、HER2、Ki67 は免疫組織化学染色法を用いて評価した。免疫組織化学染色はパラフィンブロック片を用いて行った。ER および PgR は腫瘍細胞の 1%以上の細胞核が染色された症例を陽性と判定した。HER2 は Hercep test を用いて評価し、Score3+は HER2 陽性と判定し、Score2+は FISH 法を追加し、過剰発現例を HER2 陽性と判定した。Ki67 は 1000 個以上の腫瘍細胞をカウントし、そのなかで細胞核が明瞭に染色された細胞を陽性細胞と判定した。

ALDH1 の免疫染色と評価方法

ALDH1 は免疫組織化学法を用いて評価した。ポジティブコントロールとして肝臓組織標本を用いて抗体濃度や反応時間を調整した。濃染される腫瘍細胞を陽性細胞と判定し、ストローマ細胞、リンパ球、組織球と区別するために HE 染色標本を併用し、腫瘍細胞のみで陽性率を評価した。

統計学的分析

多群間での比較はカイ 2 乗検定、2 群間の比較は、ロジスティック回帰モデルにもとづき評価した。再発後の生存期間の評価は Kaplan-Meier 法、生存率の 2 群間比較はログランク検定で評価した。再発後の生存期間に影響を与える因子の評価はコックス回帰モデルにて行った。多変量解析は、単変量解析において p 値が 0.2 以下の項を調整因子とした。全ての統計学的解析は JMP(version 11.0.0)を使用した。

[結果]

ALDH1 陽性細胞の評価と分布

大部分の症例で ALDH1 陽性の腫瘍細胞を全く認めなかった。また、標本によっては陽性細胞によるホットスポットを形成していたが、ホットスポットでの評価においても斑状に染色され、すべての腫瘍細胞が染色される例は稀であった。腫瘍細胞の中でも癌幹細胞は一般的にマイナーな集団と考えられ、ALDH1 陽性細胞の比率をホットスポットで評価した。

ALDH1 陽性細胞を 5%以上の腫瘍細胞で認めた症例は早期再発群で 7.0%、晚期再発群で 2.9%、無再発群で 4.6%であった。1-5%の腫瘍細胞で認めた症例は早期再発群で 11.4%、晚期再発群で 10.4%、無再発群で 3.7%であった。1%以下の腫瘍細胞で認めた症例や全く認めなかった症例は早期再発群で 81.5%、晚期再発群で 86.6%、無再発群で 91.6%であった。20%以上の腫瘍細胞で認めた症例は 11 例のみ（早期再発群：0.6%、晚期再発群：0.3%、無再発群：0.7%）であった。1%をカットオフとして検討したところ、カイ 2 乗検定にて 3 群間に有意差を認めた ($p=0.004$)。マイナーな癌幹細胞の集団を拾うために、低いカットオフ値 1%を採用した。

早期再発群と無再発群での ALDH1 の比較

ALDH1 陽性症例を無再発群と比較して早期再発群で有意に高率に認めた ($p=0.001$)。また、両側乳癌の有無、年齢、腫瘍径、リンパ節転移、グレード、Ki67 を交絡因子として調整した多変量解析において、早期再発群で ALDH1 陽性症例を独立して有意に高率に認めた ($p=0.016$)。

晚期再発群と無再発群での ALDH1 の比較

ALDH1 陽性症例の比率を晚期再発群と無再発群で群間比較を行ったが有意差を認めなかった ($p=0.110$)。

早期再発群と晚期再発群での ALDH1 の比較

ALDH1 陽性症例の比率を早期再発群と晚期再発群で群間比較を行ったが有意差を認めなかった ($p=0.225$)。

補助化学療法と内分泌療法施行例における早期再発群と無再発群での ALDH1 の比較

術後補助療法として化学療法および内分泌療法を行った 203 症例（早期再発群：99 例、無再発群：104 例）を対象とし、ALDH1 陽性症例の比率を早期再発群と晚期再発群で群間比較を行った。早期再発群で有意に ALDH1 陽性症例を高率に認めた ($p<0.001$)。また、年齢、腫瘍径、リンパ節転移、グレード、Ki67 を交絡因子として調整を行ったが、ALDH1 は独立して有意な再発予測因子であった ($p<0.001$)。

補助内分泌療法単独施行例における早期再発群と無再発群での ALDH1 の比較

術後補助療法として内分泌療法単独で行った 233 症例（早期再発群：53 例、無再発群：180 例）を対象とし、ALDH1 陽性症例の比率を早期再発群と晩期再発群で群間比較を行ったが有意差を認めなかった（ $p=0.224$ ）。

再発後の生存期間の比較

再発症例 318 症例（早期再発群：184 例、晩期再発群：134 例）を対象に検討を行った。ALDH1 陽性群と陰性群の 2 群間で生存率（再発発見時から乳癌死亡までの期間）を比較検討した。再発症例全例を対象とすると、カプランマイヤー法による累積生存率に有意差を認め、ALDH1 陽性例で予後が悪い経過であった（ $p=0.019$ ）。一方で、早期再発群を対象とした解析（ $p=0.082$ ）、晩期再発群を対象とした解析（ $p=0.270$ ）では ALDH1 有意な予後因子ではなかった。再発症例全例を対象として多変量解析を行った。リンパ節転移、PgR、グレード、Ki67 を交絡因子として調整すると、ALDH1 は独立した有意な予後因子ではなかった（ $p=0.059$ ）。

【考察】

本研究は癌幹細胞マーカーである ALDH1 の再発予測因子としての意義を検討した。これまでに、ALDH1 と予後との相関性を検討した論文は数多く報告されてきたが、報告者により結果の乖離が多く、予後予測因子としては poor なマーカーかもしれない。本研究は ER 陽性 HER2 陰性乳癌のみを対象とした 639 症例で検討した。これまでの報告と比較してもサンプル数が多く、5 年以降の晩期再発にも注目して検討を加えた。一方で、後方視的・探索的検討であり、多くのバイアスが入る可能性があるという限界もあった。

ALDH1 陽性率は ER 陽性 HER2 陰性乳癌での陽性率は低いことが知られていたが、本研究でも同様に低い結果であった。そこで、低いカットオフ値（ホットスポットで 1%以上の陽性率）を採用し比較検討したところ、再発との関連性を認めた。これは、腫瘍内にわずかに存在する癌幹細胞の集団を陽性例として拾い上げることが、臨床的な意義を評価する上で重要であった可能性が示唆された。

また、早期再発群と無再発群との比較において、ALDH1 は独立した有意な再発予測因子であった。一方で、補助化学療法および内分泌療法施行群でのサブグループ解析では有意な再発予測因子であったが、内分泌療法単独施行群では有意な因子ではなかった。ALDH1 は化学療法抵抗性に関与するとの報告もあるが、本検討結果から ALDH1 の予後的な意義は化学療法施行例に限定的である可能性が示唆された。また、ALDH1 と既存の化学療法抵抗性との関連を今後も検討する必要があると思われる。

【結論】

本検討結果から、ALDH1 陽性乳癌症例は無再発群と比較して早期再発群で高率に認められ、再発後の経過は ALDH1 陽性例で悪い傾向にあった。癌幹細胞マーカー ALDH1 の治療抵抗性に対する意義を、より詳細に検討する必要があると思われる。