

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

氏名 馬場 基

学位論文題名

細胞質の NF- κ B/p65 強発現はトリプルネガティブ乳癌において予後良好な因子である
(Strong cytoplasmic expression of NF- κ B/p65 correlates with good prognosis in triple negative breast cancer)

【背景と目的】

トリプルネガティブ乳癌は、ホルモン受容体の欠如とヒト EGFR 関連物質 2 (以下, HER2) 増幅のいずれも認めない不均一な集団が集まったサブグループである。そのため治療は、依然化学療法のみが標準であり、術後数年で約半数症例が再発を帰し予後不良となっている。トリプルネガティブ早期乳がん患者では、術前化学療法は標準的な治療として確立されており、最近では術前化学療法により病理学的完全奏効が得られた症例では無再発生存率が高いことから、予後の代理指標として用いられるようになった。

NF- κ B は、デビットボルティモアらによって発見された転写因子で 5 つのサブユニットからなり、細胞の増殖、アポトーシス、浸潤、血管新生、化学療法耐性化、炎症などに深くかかわっている。また細胞アポトーシスの調整する Bcl2 タンパクの転写を制御している。NF- κ B は、ヘテロな 2 量体を形成し定常時細胞質内に存在し、様々な刺激を受けると核内へ移行し転写活性化する。

NF- κ B/p65 核染色性と化学療法への感受性/耐性化の有無や予後との関連性について様々な報告がなされているが、NF- κ B/p65 細胞質染色性の強度について論文報告を認めず、また一定の見解も得られていない。

本研究では、1) トリプルネガティブ乳癌細胞株において基礎的確認実験を行い、2) 術前化学療法を行ったトリプルネガティブ乳癌症例検体を用いて NF- κ B/p65 を含めた免疫染色を施行し、化学療法感受性ならびに予後との関連性について癌細胞染色結果から新たな知見・関連性が得られるか検討した。

【対象と方法】

1. 基礎的実験による乳癌細胞株を用いた検討

ホルモン受容体陰性・HER2 陰性の MDA-MB-231 細胞を用い、刺激薬剤として human TNF α 、NF- κ B 阻害剤として (-)DHMEQ を使用した。評価方法として蛍光染色とウェスタンブロット解析にて評価した。

2. 臨床症例検体を用いた検討

北海道がんセンター院内臨床研究として 2002 年～2012 年に術前化学療法と手術施行したトリプルネガティブ乳癌症例 34 症例を対象とした。組織検体は、初診時針生検ならびに手術時検体を使用し、HE 染色、ER、PgR、HER2 染色 (HER2:2+ の場合 FISH 法による遺伝子に非増幅を確認) に、NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 追加染色評価を行った。NF- κ B/p65 染色では、核染色ならびに細胞質染色された細胞をカウントする他に、細胞質染色強度の評価も併せて行った。

統計学検定方法は、生物学的因子比較に t 検定 (対応あり) を、臨床病理学的因子と生物学的因子との比較にスピアマンの順位相関係数、無再発生存期間ならびに全生存期間への予後予測因子を調べるため COX ハザードモデルを用いた単変量解析ならびに多変量解析を行い、生存解析に Kaplan-Meier 法を用いてログランク検定を施行した。

【結果】

1. 基礎実験では、ウェスタンブロット解析ならびに蛍光染色結果では、トリプルネガティブ乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞では、定常状態において NF- κ B/p65 は細胞質に多く存在し、human TNF α の強い刺激を受けると核染色される MDA-MB-231 細胞が確認され、NF- κ B 阻害剤 (-)DHMEQ 添加により核染色細胞の減少を認めた。

2. 臨床検体を用いた検討では、術前化学療法前 7 症例、術前化学療法後 6 例で核染色を認めた。個々の染色率も低くいずれも 10%未満であった。また臨床病理学的因子ならびに NF- κ B/p65, Bcl2, Ki67 の生物学的因子はいずれも pCR の予測効果因子と示唆されるものは認めなかった。

各生物学的因子と無病生存率・全生存率との相関性について COX ハザードモデルを用い単変量解析・多変量解析を行ったが、無再発生存との単変量解析において、リンパ節 (p=0.02)、核グレード (p=0.04)、Ki67 が有意に関連性を認め、多変量解析にてリンパ節 (p=0.03) が有意に独立した予後因子だった。全生存期間との単変量解析では、リンパ節 (p=0.04)、臨床病期 (p=0.03)、核グレード (p=0.02)、Ki67 (p=0.01) の 4 つの因子で有意に関連性を認め、多変量解析ではこのうち核グレードで有意に強い関連性を認めた。

Kaplan-Meier 法を用いた検討では、Ki67 が cutoff 値 70% を境に有意に生存曲線の差を認めた。一方 NF- κ B/p65 核染色は有意な結果は得られなかった。しかし、NF- κ B/p65 細胞質染色では、染色強度 3+ 症例 6 名が全例無再発生存であり、cutoff 値 3 による Kaplan-Meier 法にて検討した結果、無再発生存も全生存もどちらも統計学的有意な差を認めないが、生存に差がある傾向が示唆された。

【考察】

本研究では、NF- κ B/p65 核染色症例はわずかで、その染色率も非常に低かった。そのため pCR との関連性ならびに予後との関連性は見いだせなかった。NF- κ B/p65 核染色と化学療法抵抗の関連についても同様に、染色率が低い為 pCR や予後との相関性を認められなかった。NF- κ B/p65 細胞質染色強度については 34 症例中 6 症例で組織に認め、全例無再発生存中である。NF- κ B/p65 細胞質染色強度が強いことと化学療法感受性や高い無再発生存率・全生存率との関連性について議論した論文は認められず、新たな生物学的特性を得られるための重要な現象と考えられた。Bcl2 においては染色率が低く新しい関連性・知見を見出すには至らなかった。Ki67 では、当乳癌外科吉岡や Jones らが述べていた 1. 治療前組織での高い Ki67 染色を認めた症例ではアンスラサイクリン・タキサン系抗がん剤の感受性が高い、2. 術前化学療法後組織において高い Ki67 染色が維持された症例では、予後が悪い、の 2 点においては、本研究トリプルネガティブ乳癌 34 症例では認められなかった。過去の論文・報告では、複数同様の報告がなされていたが、今回の症例で認められなかった原因については、検討症例数によるバイアス等が考えられるが不明であり更なる検討が必要と思われる。

【結論】

NF- κ B/p65 核内染色は、本研究において、pCR ならびに予後との相関性は認められなかった。しかし NF- κ B/p65 細胞質強染色は、術前化学療法といった薬物療法の影響にかかわらず、良い予後との相関性が認められた。NF- κ B/p65 細胞質染色 (強度) は、トリプルネガティブ乳癌において予後予測因子となりうることが示唆された。NF- κ B/p65 細胞質内における機構の更なる研究が、トリプルネガティブ乳癌の生物学的特性追及の新たな足掛かりとなると考える。