

浸潤性乳癌に対する術前化学療法後の  
転移リンパ節巣における  
バイオマーカーの評価およびサブタイプ分類の意義

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座腫瘍外科学分野

根本 紀子

# 目次

I. 要約	p.2~4
II. 研究背景	p.5~8
III. 研究目的	p.8
IV. 研究方法	p.9~14
V. 研究結果	p.15~19
VI. 考察	p.20~25
VII. 結論	p.26
VIII. 謝辞	p.26
IX. 参考文献	p.27~35
X. 図の説明	p.36~38
XI. 図	p.39~43
XII. 表	p.44~49

# I. 要約

## 【研究背景・目的】

現在の乳癌診療において、原発巣に発現する種々のバイオマーカーが治療選択の大きな役割を担っている。手術先行の乳癌患者では、リンパ節転移の有無が後療法に化学療法を追加するか否かを定める判断基準の一つとされている。一方、術前化学療法施行後に手術を受け、摘出リンパ節に転移が見られた患者に対する化学療法の追加治療に関する標準的な治療戦略が定まっておらず、患者個々の臨床的な予後に転移リンパ節がどの程度関与しているか議論される場所である。

本研究では術前化学療法後に術後腋窩リンパ節転移陽性と診断された患者の、原発巣と転移リンパ節における estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), Human epidermal growth factor 2 (HER2), Ki-67, TopoisomeraseII $\alpha$  (TOP2a) の発現について比較検討した。また、原発巣と転移リンパ節いずれのバイオマーカーが予後予測因子となり得るのかをサブタイプ分類を含めて検討した。

## 【対象と方法】

術前化学療法後に、2004～2010年に東北大学病院にて手術を行いリンパ節転移陽性と診断された49例の原発巣および転移リンパ節の切除標本を対象として免疫組織学的に解析を行った。また、術前化学療法前後の原発巣における変化を検討するために、同症例中から標本作成が可能であった35例の針生検 (CNB; Core needle biopsy) 検体に対して、同様に免疫組織学的解析を行った。

免疫組織染色は乳癌診療において一般的に染色される ER、PgR、HER2、Ki-67 を原発巣、転移リンパ節巣、CNB 標本に対して行った。また、アンストラサイクリン系薬剤の反応性や腫瘍の悪性度について議論されている TopoisomeraseII $\alpha$  (TOP2a) を原発巣及び転移リンパ節巣に対して染色した。原発巣および転移リンパ節巣における各バイオマーカーの違い、及びサブタイプ分類に基づいた臨床予後との関係について統計学的に検討を行った。

上述の49症例の中から無作為に7例抽出し、蛍光物質集積体 (PID: Phosphor in dot) を用いた免疫組織蛍光染色 (PID 染色) にて HER2 発現の定量化を行い原発巣、転移リンパ節巣の HER2 発現の違いを追加検討した。

## 【結果】

ER, PgR, HER2 の発現は、原発巣と転移リンパ節巣の間に有意な相違は見られなかった。PID 染色で HER2 蛋白を高感度定量化した結果、転移リンパ節巣で HER2 発現は高値を示す傾向が見られた。

細胞増殖能マーカーである Ki-67 Labeling index (LI) は原発巣とリンパ節転移巣の間に正の相関を認めたが、原発巣と転移リンパ節巣の Ki-67 LI の比較では原発巣と比較して転移リンパ節巣の Ki-67 LI は有意に高値であった。また、TOP2a (Histo-Score) H-Score は原発巣、転移リンパ節巣とも Ki-67 LI と正の相関を示し、原発巣、転移リンパ節巣との関係も Ki-67 LI 同様に転移リンパ節巣で有意に高値であった。以上より、転移リンパ節巣には原発巣と比較して悪性度の高い癌細胞が残存して

いることが推察された。

サブタイプ分類における予後解析では、無病生存率（disease-free survival rate: DFS）、全生存率（overall survival rate: OS）ともにリンパ節転移巣で Luminal A と診断された患者は Luminal B と診断された患者と比較して有意に予後が良好であった。原発巣におけるサブタイプ分類では、OS で Luminal A 症例が有意に予後良好であったが、DFS では Luminal A 症例と Luminal B 症例の間に有意差は見られなかった。

### 【考察】

術前化学療法後にリンパ節転移が残存した症例は予後不良であるが、従来の原発巣における TNM ステージ分類やサブタイプ分類以外の更なる層別化はなされておらず、術後の治療戦略も一貫したものがない。

本研究の結果から転移リンパ節巣には悪性度の高い癌細胞が残存し、原発巣と比較しても転移リンパ節巣におけるバイオマーカーの評価およびサブタイプ分類の方が臨床予後と相関することが判明した。

### 【結論】

術前化学療法施行後に手術を施行されリンパ節転移を有する患者において、転移リンパ節巣には悪性度のより高い癌細胞が残存しており、転移リンパ節巣でバイオマーカーを評価し、サブタイプ分類した方が、原発巣における評価と比べてより臨床像と一致していた。よって転移リンパ節巣においてバイオマーカーの評価、サブタイプ分類を行った方が有効な予後予測因子となり得る可能性があり、また患者の更な

る層別化を行うことで、術後化学療法を追加するか否かを的確に選択し、乳癌の予後向上に貢献することが期待される。

## II. 研究背景

乳癌診療において、乳癌細胞における種々のバイオマーカーが治療方針や予後予測因子として重要な役割を果たしており[1]、特に estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、Human epidermal growth factor 2 (HER2)、Ki-67 の発現は免疫組織染色を用いて日常的に評価されている。乳癌の初期治療ではマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって分類される intrinsic subtype を基盤に、実臨床ではマイクロアレイの解析は困難であることから免疫組織染色を用いて代替した4つのサブタイプ分類が行われ治療方針や再発リスクの判定に用いられている[2, 3]。特に2011年 St Gallen International Breast Cancer Conference では、サブタイプ分類に Ki-67 の発現状況が加えられ注目をあびた[4]。TopoisomeraseII $\alpha$  は TOP2a 遺伝子で code された酵素の一つで、TOP2a 遺伝子が過剰発現もしくは欠損しているとアンスラサイクリン系の薬剤が有効であることが知られている[5-8]。一方、TOP2a 蛋白過剰発現は、予後の悪さと相関するとの報告もある[9]。しかし TOP2a 遺伝子発現と、蛋白発現の関係は結論が一貫していない。

バイオマーカー、サブタイプ分類に加え、腫瘍径、リンパ節転移の有無、組織型、組織学的グレード、TNM 分類も加療を加えるうえで現在も重要な因子である[10]。腋窩リンパ節転移は患者の全生存率(Overall survival; OS)に影響を与えないと報告された[11]が、対してリンパ節転移の有無や転移個数は現在でも重要な予後予測因

子であるとの報告もある [9-12]。

術前化学療法は乳房温存手術希望患者、局所進行乳癌や炎症性乳癌を対象に行われる。術前に化学療法を施行し早期に微小転移に対する加療を行うことで生存率を改善することが期待されたが、浸潤性乳癌症例において術前化学療法と術後化学療法は同等の生存率であることが判明した [13, 14]。よって現在では主に down staging や温存手術率上昇のために行われる [15, 16]。また腫瘍存在下で加療を行うことから、術前薬物療法は *in vivo* における薬剤感受性試験とも位置づけされている。術前化学療法施行例では組織学的治療効果や病理学的リンパ節転移状況が予後と有意に相関しており、特に pathological complete response (pCR) が得られた症例では長期予後が良好であるとされてきた。[15-21]。しかし、原発巣における pCR 症例の 5 年無再発生存率 (Disease-free survival; DFS) は 85.7%、non-pCR 症例は 76.9% と統計学的に pCR 症例で有意に良好ではあるがその差は大きなものとは言い難い。一方、転移腋窩リンパ節で術前後の効果判定を行ったところ、腋窩リンパ節における pCR 症例では 5 年 DFS, 10 年 DFS がいずれも 87% であり、腋窩リンパ節転移残存症例の DFS が 5 年で 60%、10 年で 38% であった。さらに腋窩リンパ節消失症例では原発巣残存の有無にかかわらずリンパ節転移巣での pCR は予後が良好であり、リンパ節での組織学的効果判定が予後予測因子として有効であると報告された [19]。以上より、同報告の筆者らはリンパ節転移巣における化学療法効果判定が予後予測因子として有効であると示した。しかし、術前化学療法を施行する前のリンパ節に対する確定診断は標準的には行



われておらず、化学療法後にリンパ節転移を認めない症例が本当のリンパ節転移巣の pCR なのか、最初から転移が存在していなかったのかどうかは明らかではない。また加療前にリンパ節転移の存在した範囲も不明瞭であることなどから転移リンパ節巣における化学療法の効果判定を行うことは難しい。一方で、腫瘍が存在すると判断されたリンパ節に対し通常の免疫組織染色を行いバイオマーカーの発現状況を判断することはそれほど難しいことではない。

以前、手術先行症例に対する原発巣とリンパ節転移巣のサブタイプ分類の比較検討が報告されたが、そこでは原発巣と転移リンパ節巣の間に有意なバイオマーカーの違いや臨床予後に期待すべき結果は得られなかった[22]。

また現時点で、術前化学療法後の症例に対する原発巣と転移リンパ節巣に関するサブタイプ分類を踏まえたバイオマーカーの相違や臨床予後との関係は論じられていない。

### Ⅲ. 研究目的

術前化学療法後に転移リンパ節巣を有する患者において転移リンパ節巣のバイオマーカーの評価・検討は行われているが、転移リンパ節巣でのサブタイプ分類を含めた臨床予後の検討は現在報告されていない。よって、本研究では術前化学療法後である乳癌患者の原発巣と転移リンパ節巣におけるバイオマーカー発現の相違を比較検討し、更に臨床予後との関係に関してサブタイプ分類を含めて検討することを目的とした。

## IV. 研究方法

### 1. 対象

術前化学療法後に 2004～2010 年に東北大学病院にて手術を行い、リンパ節転移陽性と診断された 56 例における原発巣の切除標本および転移リンパ節巣のパラフィン包埋ブロックが入手可能であった。しかし 56 例中 7 例は、転移リンパ節巣の病変が小さく標本作成時に病変が消失し免疫組織学的に評価困難であったため検討から除外した。よって、最終的に 49 例の原発巣および転移リンパ節巣の切除標本を対象として統計学的に解析を行った。術前化学療法前後の原発巣の変化を観察するために、術前化学療法前に原発巣から採取された針生検 (CNB; Core needle biopsy) を検討に加えた。CNB 検体の ER, PgR, HER2 は 49 症例全ての臨床データを使用した。Ki-67 は臨床診断の際に染色が行われていなかったため、標本の入手が可能であった 35 例に対して免疫組織染色を行った。

年齢は 31-80 歳 (中央値 49 歳)、最大浸潤径は 2-80mm (中央値 23mm) であった。以下、臨床病理学的因子は表 1 示す。術前化学療法の内容を表 2 に示す。49 例中 46 例 (94%) はアンスラサイクリン系薬剤が投与された。タキサン系薬剤は 22 例 (45%) と約半数の症例のみの投与となり、化学療法の内容で予後に影響を与える可能性が考えられたため、タキサン系薬剤投与の有無で予後に影響が無いか検討を加えた (図 1)。結果、タキサン系薬剤投与の有無で再発率および死亡率に有意差は認められなかった。

HER2 に対するより詳細な検討するために上述の 49 例から無作為に 7 例抽出した。7 例の内訳は、免疫組織染色にて HER2 発現に原発巣、転移リンパ節巣に違いが見られなかった症例 4 例（いずれも陽性; 3 例、いずれも陰性; 1 例）、HER2 の発現に違いが見られた症例 3 例（原発巣陽性リンパ節陰性; 1 例、原発巣陰性リンパ節陽性; 2 例）。再発症例は 3 例、死亡症例は 1 例であった。

年齢は 31-72 歳（中央値 46 歳）、最大浸潤径は 5-67mm（中央値 19mm）であった。

## 2. 免疫組織染色の方法

癌の最深部を含む部位の組織検体を 10%ホルマリンにて固定したパラフィン包埋ブロックを厚さ 4 $\mu$ m に薄切し、これらの標本について Hematoxylin & Eosin 染色および免疫組織化学染色を行った。対象症例全例にストレプトアビジン・ビオチン法にて通常の免疫組織染色を、49 例から無作為抽出された 7 例に対しては蛍光粒子をストレプトアビジンで標識した蛍光物質集積体 (PID: Phosphor in dot) を用い、免疫組織蛍光染色を行った。1 次抗体の希釈倍率と免疫賦活条件を表 3 に示す。

### a. 免疫組織染色

組織切片を脱パラフィン後、3.0%過酸化水素を含むメタノールに 10 分室温で浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。免疫賦活処理を行った後、phosphate-buffered saline (PBS) で 5 分間 3 回の洗浄を行い、マウスモノクローナル抗体に関しては正常ウサギ血清に、ウサギモノクローナル抗体に関しては正常ヤギ血清に

30分室温で浸し、非特異的抗体阻止を行った(正常血清; Nichirei Biosciences Inc. Japan)。  
それぞれの1次抗体に4°Cで一晩反応させ、翌日PBSで5分間3回の洗浄を行いマウスモノクローナル抗体に関してはビオチン標識抗マウス抗体を、ウサギモノクローナル抗体に関してはビオチン標識抗ウサギ抗体(Nichirei Biosciences Inc.)を2次抗体として30分室温で反応させた。続けて同様のPBS洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Nichirei Biosciences Inc.)に30分反応させた。さらに同様のPBS洗浄後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution (0.001M DAB、0.05M Tris-HCl Buffer, pH7.6、0.006% hydrogen peroxidase)で発色し、ヘマトキシリン核染、エタノール脱水処理、キシレン透徹、封入を行った。

#### **b. 新規蛍光ナノ粒子を用いた免疫組織蛍光染色**

通常免疫染色と同工程の箇所は簡易化し示す。

組織切片を脱パラフィン後、免疫賦活処理を行った。免疫賦活処理を行った後、PBSで5分間3回の洗浄を行い、10分室温で浸し、非特異的抗体阻止を行った。続いて1次抗体を室温で40分反応させ、5分間3回の洗浄を行い、ビオチン標識抗ウサギ抗体を2次抗体として30分室温で反応させた。続けて同様のPBS洗浄の後、PID液を室温にて60分反応させた。さらに同様のPBS洗浄後、4%パラホルムアルデヒドをのせ10分間放置しPBSで洗浄後さらに蒸留水で洗浄した。ヘマトキシリン核染し最後にエオジン液染色を行った後、キシレン透徹、封入を行った。

### 3. 組織学的評価

組織学的評価は the Union for International Cancer Control の TNM classification of malignant tumors 第7版に基づいて行った。免疫組織化学は、日常の診療で一般的に使用されている方法を用いて評価した。詳細は以下の通りである。

ER、PgR は核陽性細胞に対し Allred score を用いて判定した[23]。 Allred score は、染色領域 [PS 0:0, PS1: (0~1%), PS2: (1~10%), PS3: (10~1/3), PS4: (1/3~2/3), PS5: (2/3~100%)] 及び染色強度 [IS0: 0, IS1: (弱陽性), IS2: (中等度陽性), IS3: (強陽性)] を判定し、Total score = PS + IS として Total score  $\geq 3$  を陽性とした。

HER2 は、ASCO (American Society of Clinical Oncology) / CAP(College of American Pathologists) 2007 のガイドライン[24]に則り、細胞膜陽性率が強陽性 30%以上をスコア 3+、弱~中等度陽性 10%以上をスコア 2+、陰性および弱陽性をスコア 1+とした、スコア 3+を陽性、スコア 2+を中等度陽性、スコア 1+及び0を陰性と判断し、スコア 2+に対して FISH 法による再検査を行い、遺伝子数/セントロメア比が 2.2 以上を陽性とした[25]。

Ki-67 は hotspot における腫瘍細胞 1000 個の核陽性細胞を計測し、LI (labeling index: %) を算出した[26, 27]。

TOP2a は核陽性細胞に対し Histo-score (H-Score) を用いて評価した。H-Score は染色濃度 [intensity score (IS) ; 0, 弱陽性 1, 中等度陽性 2, 強陽性 3] 及びそれぞれの染色濃度毎に染色範囲を判定した。Total Score= IS×染色割合 (range 0-300)

ER, PgR, HER2 及び Ki-67 の結果をもとに St Gallen 2011 年で推奨されたサブタイプ分類に基づいて[4] 原発巣、転移リンパ節巣それぞれ別個にサブタイプ分類を行った。サブタイプ分類は表 4 に示す。本研究では症例数が少ないため、詳細な個別化をせず、Luminal A、Luminal B、triple negative (TN)、HER2 type (HER2)の 4 つのサブタイプに分類し検討を行った。

#### 4. 免疫組織蛍光粒子の観察と画像解析

光学顕微鏡(BX51)にミラーユニットと顕微鏡デジタルカメラ(DP73, Olympus, Japan) を装備した汎用蛍光顕微鏡システムを使用した。蛍光観察用励起光フィルターは Filter Set 64 HE (Zeiss 社)を使用した。

まずは、明視野にて通常の HE 染色にて病変部を確認、励起光フィルターに切り替え×400 倍にて PID 蛍光画像を観察した。原発巣、転移リンパ節巣の明視野と PID 蛍光画像を、それぞれ×400 倍にて 5 視野ずつ画像を取り込み Image J を用いて画像解析を行った。

PID 蛍光画像から腫瘍細胞内の輝点数を、同一明視野から腫瘍細胞数をカウントし、1 細胞あたりの輝点数を計測し定量化したものを PID スコアとした。

PID スコア = 腫瘍細胞内の輝点数 / 腫瘍細胞数

## 5. 統計解析

統計解析は JMP Pro Version 10.0.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。2 群間の連続変数データの比較は相関分析、Sperman の順位相関係数および Mann-Whitney U 検定にて行った。カテゴリカルデータに関しては Pearson の  $\chi^2$  検定、Fisher の正確検定、Mc Nemar 正確検定、Mann-Whitney U 検定を適時用いた。累積生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、log-rank 検定を用いた。

無病生存期間および生存期間は、乳癌登録日から算出した。

以上の解析は  $P$  値が 0.05 未満を統計学的有意と判断した。

## 6. 倫理面への配慮と利益相反の有無

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言—ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則を遵守し、全症例において術前に文書で患者の同意を得ている。また、全ての検体の使用・研究に関しては、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得ている（受付番号：2011-596）。本研究について開示すべき利益相反事項はない。

## V. 研究結果

免疫組織化学染色による発現状況は図 2 に示す。

### 1) 臨床病理学的因子と予後との関係

再発症例は 22 例 (44.9%)、死亡症例は 10 例 (20.4%) であった。年齢、ステージ (pTNM)、腫瘍径 (pT)、転移リンパ節個数、組織学的グレード、化学療法効果判定と再発の有無、および死亡の有無に関して、累積生存率を Kaplan-Meier 法により算出し、log-rank 検定を用いて検討した。組織学的グレードで再発の有無で有意な相関がみられ ( $P=0.025$ )、pTNM では生存および死亡の有無いずれも有意差を認めた (DFS;  $P<0.0001$ 、OS;  $P=0.0008$ )。その他の因子では有意差が認められなかった (表 5)。

### 2) ER, PgR, HER2 の発現状況

#### a. 原発巣と転移リンパ節巣

ER、PgR、HER2 の原発巣、転移リンパ節巣で比較したものを表 6 に示す。

ER は 4 例 (8%) 原発巣および転移リンパ節巣において発現の相違を認めた (1 例は原発巣陽性リンパ節陰性、3 例は原発巣陰性リンパ節陽性)。同様に、PgR は 11 例 (22%) で (7 例が原発巣陽性リンパ節陰性、4 例が原発巣陰性リンパ節陽性)、HER2 では 3 例 (6%) で両者に相違が見られた (1 例が原発巣陽性リンパ節陰性、2 例が原発巣陰性リンパ節陽性)。

しかし、いずれも原発巣と転移リンパ節巣の発現に有意差は認められなかつ



た (ER;  $P=0.32$ , PgR;  $P=0.37$ , HER2;  $P=0.33$  McNemar の正確検定)。

#### **b. CNB 検体と原発巣**

ER、PgR、HER2 の発現を a.と同様に CNB 検体と原発巣で比較した (表 7)。

ER、PgR、HER2 の相違はそれぞれ 13.9%、33.4%、8.1%であり、いずれも原発巣と転移リンパ節巣に有意な違いは認められなかった (ER;  $P=0.65$ , PgR;  $P=0.37$ , HER2;  $P=0.56$  McNemar の正確検定)。

### **3) Ki-67 の発現状況**

#### **a. 原発巣と転移リンパ節巣**

原発巣と転移リンパ節巣の Ki-67 LI において、両者は正の相関関係がみられた ( $P=0.0006$ ) (図 3)。しかし、それぞれの Ki-67 LI を比較すると転移リンパ節巣において Ki-67 LI は有意に高値であった (原発巣;  $14.2\pm 2.2\%$ 、転移リンパ節巣;  $18.1\pm 2.8\%$ 、 $P=0.014$ )。

表 8 に原発巣、転移リンパ節巣の各々の予後と Ki-67 LI との関係を示す。原発巣における Ki-67 LI は死亡の有無では有意差を認めたが、再発の有無では有意差が見られなかった (死亡 ;  $P=0.0203$ 、再発  $P=0.0804$ )。一方、転移リンパ節巣ではいずれにおいても有意差が認められた (死亡 ;  $P=0.0019$ 、再発 ;  $P<0.0001$ )。

#### **b. CNB 検体と原発巣 (CNB 検体の入手可能な 35 例での検討)**

CNB 検体と原発巣における Ki-67 LI に有意な相関は認められず、CNB 検体と

原発巣それぞれの Ki-67 LI の比較でも有意差は見られなかった (CNB;  $14.2 \pm 12.6\%$ 、  
原発巣;  $13.15 \pm 14.7\%$ 、 $P=0.229$ )。また、CNB 検体における Ki-67 LI は予後との間に  
有意差を認めなかった (死亡 ;  $P=0.55$ 、再発 ;  $P=0.253$ )。

CNB 検体と原発巣における術前化学療法前後の Ki-67 LI の変化を再発の有無  
で比較したところ再発群で  $8.62 \pm 17.7\%$  の増加、非再発群では  $9.2 \pm 19.3\%$  の減少が見  
られ、統計学的にも有意差を認めた ( $P=0.023$ )。死亡の有無では有意差は認められな  
かった( $P=0.25$ )。

#### 4) TOP2a の発現状況

TOP2a は原発巣、転移リンパ節巣とも HER2 および Ki-67 LI と有意に相関し  
ていた (原発巣;  $P=0.0007$ 、転移リンパ節巣;  $P<0.0001$ )。臨床病理学的因子との相関は  
見られなかった。また、TOP2a 遺伝子異常があるとアンスラサイクリン系薬剤の薬剤  
感受性が高いことが知られているが、本研究では TOP2a 蛋白発現のみ評価しており、  
蛋白発現と化学療法効果判定の間に有意差は見られなかった (原発巣;  $P=0.15$ 、転移  
リンパ節巣;  $P=0.92$ )。

原発巣、転移リンパ節巣で TOP2a H-Score は有意に正の相関 ( $P=0.0001$ ) を  
示し (図 3)、原発巣と転移リンパ節巣における比較では転移リンパ節巣で TOP2a  
H-Score は有意に高値であった ( $P=0.023$ ) (表 8)。臨床予後との関係では転移リンパ  
節巣においては再発群および死亡群が有意に TOP2a H-Score が高値であったが (死

亡 ;  $P=0.0019$ 、再発  $P=0.0004$ )、原発巣では死亡の有無のみ有意差を認め、再発の有無では有意差が見られなかった (死亡 ;  $P=0.02$ 、再発  $P=0.1314$ )。

これらは全て Ki-67 LI と同様の結果であった (表 8)。

## 5) サブタイプ分類

原発巣、転移リンパ節巣それぞれにサブタイプ分類を行い、原発巣と転移リンパ節巣に違いがあるか検討した (表 9)。サブタイプの内訳は以下の通りである。

原発巣: Luminal A 57% (28/49)、Luminal B 37% (18/49)、HER2 2% (1/49)、TN 4% (2/49)

リンパ節: Luminal A 53% (26/49)、Luminal B 41% (20/49)、HER2 4% (2/49)、TN 2% (1/49)

原発巣と転移リンパ節にサブタイプ分類における有意な相違は認められなかった ( $P=0.9739$ )。原発巣と転移リンパ節でサブタイプが乖離した症例は 36.73% (18/49) であった。

## 6) サブタイプと予後の関係

原発巣、転移リンパ節巣いずれも Her2 type および TN は症例が少ないため除外し、Luminal type のみに限定して統計学的解析を行うこととした。Luminal A および B に症例を限定した全生存率 (overall survival rate: OS)、無病生存率 (disease-free survival rate: DFS) における生存曲線を図 4 に示す。転移リンパ節巣では DFS、OS いずれも有意に Luminal A で予後良好であった [DFS:  $P=0.045$ 、OS:  $P=0.0006$  ; 図 4. B,

D]。しかし、原発巣において OS では有意に Luminal A で予後良好であったが、DFS で有意差は認められなかった[DFS:  $P=0.0557$ 、OS:  $P=0.0162$  ; 図 4. A, C]。

原発巣と転移リンパ節巣でサブタイプが乖離した症例は 18 症例(36.7%)における生存曲線を図 5 に示した。転移リンパ節で Luminal A に分類された症例は良好な予後を示した。しかし原発巣では Luminal A 症例の方が Luminal B 症例よりも予後が悪い傾向を示し、Luminal A が予後良好であるという通説と矛盾する結果であった。

## 7) 免疫組織蛍光染色 (PID 染色)による HER2 の発現

免疫組織蛍光染色による HER2 の発現状況を図 6 に、PID Score と、免疫組織染色及び FISH による HER2 の結果を表 10 に示す。

免疫組織染色及び FISH で判定した HER2 の結果が原発巣と転移リンパ節で不一致であった症例では、PID Score は免疫染色で陽性であった病巣（原発巣もしくは転移リンパ節巣）で高値であった。原発巣と転移リンパ節巣で免疫組織染色の結果が一致していた症例では 4 例中 3 例が転移リンパ節で高値、4 例中 1 例は転移リンパ節で低値となった（図 7）。症例が少なく統計学的検討は困難であったが、転移リンパ節巣で高値を示す可能性が示唆される結果となった。

## VI. 考察

本研究は、術前化学療法後のリンパ節転移陽性症例における転移リンパ節巢のサブタイプ分類と予後を検討した初めての報告である。

乳癌患者の術後療法や全身化学療法は原発巣の ER や PgR、HER2 などのバイオマーカーをもとに選択され[10]、サブタイプ分類は原発巣で行われるのが一般的である。しかし、全身治療のターゲットは原発巣よりも微小転移を含む転移病巣にあると考え[28]、原発巣と、転移リンパ節巢のバイオマーカーの違いを検討した報告は多い。しかしいずれも ER, PgR, HER2, Ki-67 の発現に有意な違いは観察されておらず、かつサブタイプ分類を含めた検討は行われていない[28-32]。

癌の転移再発は乳癌を含む固形癌による癌死の要因であり、この転移の機序を解明するために様々な論説がある。その一つとして上皮-間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) が唱えられた[33]。EMT は乳癌の転移・浸潤のメカニズムの一つで[34-36]、上皮細胞が一過性に間葉細胞様細胞に変化し運動性や浸潤性を獲得する現象であり、固体発生や創傷治癒の過程で必須の現象である。癌における EMT の働きは、EMT によって浸潤形質を獲得した癌細胞が血管、リンパ管などを経て他の転移臓器に到着し、ある特定の微小環境と癌細胞の生着の相互作用が一致した時に転移が成立するとされる。ここで、EMT の最終段階として転移先では EMT とは逆の現象である MET (mesenchymal-epithelial transition)が誘導されることが想定されている[37]。乳癌は heterogeneous な腫瘍で様々な clone を有しており、これは原発巣

でも転移リンパ節でも同様である[38-41]。乳癌の早期からの浸潤・転移のプロセスとして EMT, MET が大きな役割を担っている可能性があると考えられている。

我々は、本研究で術前化学療法を受けた浸潤性乳癌患者の原発巣と転移リンパ節巣における生物学的特徴の違いを、各種バイオマーカーの蛋白発現をもとに検討した。ER, PgR, HER2 の発現状況は、手術先行症例で検討を行った既報告での原発巣と転移リンパ節巣との不一致率がそれぞれ 3-7%, 16%, 2-10% であり本研究の結果とほぼ一致していた[29-32]。原発巣と転移リンパ節の ER, PgR, HER2 の発現は原発巣と転移リンパ節巣でほぼ一致するが、全ての患者で完全なる一致は見られず、この結果は化学療法による原発巣と転移リンパ節巣における化学療法の反応の違いが考えられる。しかし既存の報告と一致して[42]、術前化学療法前の CNB 検体と、術前化学療法後の原発巣の比較でも ER, PgR, HER2 に関して統計学的有意差が見られないことから、術前化学療法は原発巣、転移リンパ節巣いずれの癌細胞に対しても ER, PgR, HER2 の発現へは大きな影響はないと考えられる。

しかし、HER2 蛋白発現を免疫組織蛍光染色 (PID 染色) で定量化したところ転移リンパ節で PID Score が比較的に高い傾向を示した。よって通常免疫組織染色では陰性、陽性としか判断できないが、定量化することで原発巣と転移リンパ節巣の HER2 発現の違いをさらに詳細に検討できる可能性がある。今後、この免疫組織蛍光染色を用い HER2 蛋白発現を定量化することで原発巣と転移リンパ節巣の違いをより詳細に判断し、抗 HER2 薬剤の適応症例の幅を広げることを目標に検討を続ける予定

である。

Ki-67 は G0 期を除くすべての細胞周期 (G1, S, G2 期) に発現する核タンパクであり [23, 43]、乳癌の増殖能を反映するマーカーとして広く使用されている。

本研究では、原発巣と転移リンパ節巣に相関が認められた。既存の報告でも、手術先行症例において同様の結果が得られている [30]。一方で、原発巣と転移リンパ節巣の比較では Ki-67 LI は転移リンパ節巣で有意に高値を示した。この結果から、術前化学療法後の転移リンパ節巣には原発巣と比較してより増殖能力の高い細胞が残存していることが示唆された。

Ki-67 と同様に、TOP2a H-Score においても Correlation analysis ではリンパ節巣と原発巣に正の相関関係がみられ、Mann-Whitney test ではリンパ節転移巣が有意に高値であった。TOP2a は遺伝子異常 (増幅もしくは欠損) がアンストラサイクリン感受性と関係があることは知られている。一方で、その蛋白発現は悪性度を示す因子と相関することから蛋白の過剰発現は悪性度を示すマーカーとしても知られている。しかし、TOP2a 遺伝子異常と蛋白発現の関係は多くの検討が報告されているがまだ議論の余地がある。今回の検討では TOP2a は増殖マーカーである Ki-67 と相関していた。しかし、化学療法の効果判定とは有意な相関は見られなかった。TOP2A 蛋白発現が悪性度を示すマーカーであるとするれば、転移リンパ節巣で悪性度の高い細胞が残存することへの結果を裏付ける強力な因子であると考えられる。

実際に、手術先行症例に対する報告では原発巣と転移リンパ節巣との間に Ki-67 RI の

有意差は見られなかった[22, 30, 31, 44]。術前化学療法後と手術先行症例における結果の違いは術前化学療法が癌細胞の増殖能に影響を与えたことに由来すると考えるが、さらなる研究結果が待たれるところである。

原発巣における pCR 症例は一般的に予後良好とされていたが、近年化学療法後の原発巣の pCR と予後に関する見解が矛盾している [15-21]。例えば ER 陰性の患者では原発巣の pCR は予後予測因子となるが、ER 陽性患者では pCR は予後と一致しないといった報告もなされている[18, 45]。そこで加療に対する反応性や、予後などの予測因子として Ki-67 が検討されるようになった[46-49]。しかし、術前化学療法の効果の予測因子として Ki-67 の臨床意義はいまだ議論の余地がある。術前化学療法前の Ki-67 LI は化学療法効果に対する有意な予測因子であり、化学療法に感受性を有した症例では加療後の Ki-67 LI が有意に減少し、同症例では有意に予後が良好であったとの報告がある[46, 47]。彼らは、化学療法反応群は有意に Ki-67 が減少し、化学療法抵抗群は有意に Ki-67 LI が増加したと報告した[46, 48]。一方では術前化学療法前後の Ki-67 の変化は Luminal A の患者には有意な予後予測因子とならず、術前化学療法前後の Ki-67 は予後予測因子にはならないとの報告もある[49]。

今回我々の研究では CNB 検体と術前化学療法後の原発巣の Ki-67 LI に有意差は見られなかったが、加療前後の変化では再発群では上昇、非再発群では減少し、統計学的有意差を認めた。これらの結果は前者の報告と一致している[46, 48]。



術前化学療法後の転移リンパ節巣における効果判定を基準とした予後分析を行い、原発巣の pCR の有無にかかわらず転移リンパ節巣における pCR は有意に良好な予後と相関しており予後予測因子なると報告がある[19]。しかし、実際には転移リンパ節巣での治療効果判定は転移リンパ節の術前診断の有無など様々な理由から困難を呈する。

手術先行のリンパ節転移症例において原発巣と転移リンパ節巣をそれぞれにサブタイプ分類を行い予後との関係を検討した報告があったが、そこでは原発巣と転移リンパ節巣のいずれにおいても、サブタイプと予後に有意差は見られなかった[22]。しかし、同研究で、原発巣で Luminal A、転移リンパ節巣で non-Luminal A であった症例は Luminal A で予後不良で、通常の前予後とは逆転していた。

我々の研究では、転移リンパ節巣における Luminal A 症例は有意に OS、DFS ともに高値であった。しかし、原発巣における OS では有意差が見られたが、DFS では有意差が見られなかった。さらに、転移リンパ節巣において Luminal A に分類された症例で死亡はゼロであり、興味深い結果である (図 4)。原発巣と転移リンパ節巣でサブタイプが乖離した症例では、転移リンパ節で Luminal A に分類された症例は良好な予後を示した。しかし原発巣では Luminal A 症例の方が Luminal B 症例よりも予後が悪い傾向を示した (図 5)。これは手術先行症例で評価した既存の報告と一致している[22]。Luminal A に分類された患者は一般的に予後がよいとされており、我々の結果では転移リンパ節巣で判断した方がより臨床予後と相関していた。それ故に、術前化

学療法後のリンパ節転移陽性症例では原発巣ではなく、転移リンパ節巣でバイオマーカーを評価し、サブタイプ分類を行った方が正確な予後予測因子になると考える。

乳癌の腫瘍内不均一は原発巣、転移巣いずれにおいても様々な様相を呈する。転移腫瘍には化学療法抵抗性のサブクローンが多く存在する可能性がある。手術先行症例の原発巣と転移リンパ節巣におけるサブタイプ分類を基本に予後解析が報告されたが有意な予後因子との結果はなかった[22]。一方、今回の研究では再発に関しては転移リンパ節巣でのみ有意な違いが認められた。そこから術前化学療法前のリンパ節には悪性度の高い細胞から低い細胞まで様々な形態の細胞が存在したが、加療を行うことにより悪性度の高い癌細胞だけが残存したと推察した。

術前化学療法施行後の患者における術後の標準的治療戦略は今のところはっきりしたものは無く、転移リンパ節巣のバイオマーカーとサブタイプ分類の役割はまだはっきりしていない。転移リンパ節の効果判定は難しいがバイオマーカーを免疫組織染色で評価することは比較的容易である。

我々の研究結果から、術前化学療法後の転移リンパ節巣におけるバイオマーカーは予後予測因子としてより実臨床に則しており更なる患者の層別化、治療選択の幅を広げる可能性を期待させる。

## VII. 結論

術前化学療法施行後に手術を施行されリンパ節転移を有する患者において、転移リンパ節巣には悪性度のより高い癌細胞が残存しており、転移リンパ節巣でバイオマーカーを評価し、サブタイプ分類した方が、原発巣における評価と比べてより臨床像と一致していた。よって転移リンパ節巣を用いてバイオマーカーの評価、サブタイプ分類を行った方が有効な予後予測因子となり得る可能性があり、更に患者の更なる層別化を行い、術後化学療法を追加するか否か、的確な選択が可能となることが期待される。

## VIII. 謝辞

本研究に当たり、病理診断学分野の笹野公伸教授には多大なるご指導ご助言を賜りました。蛍光粒子に関して医用物理学分野の権田幸祐教授、臨床に関して腫瘍外科学分野の多田寛先生、病理診断学分野の柴原裕紀子先生、病理部の渡辺みか先生、にご指導していただきました。また、実験技術について病理部の高橋弥生さん、病理診断学部の岩淵絵里奈さん端秀子さんにご指導していただきました。

この場をお借りして先生方、皆様に厚くお礼申し上げます。

最後に本研究の機会を与えてくださった大内憲明教授、石田孝宣准教授および腫瘍外科学分野、先進外科学分野の皆様方のご協力に厚くお礼申し上げます。

## IX. 参考文献

1. Syed BM, Green AR, Paish EC, Soria D, Garibaldi J, Morgan L, Morgan DAL, Ellis IO, Cheung KL: **Biology of primary breast cancer in older women treated by surgery: with correlation with long-term clinical outcome and comparison with their younger counterparts.** *British journal of cancer* 2013, **108**(5):1042-1051.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
3. Dawood S, Hu R, Homes M, Collins L, Schnitt S, Connolly J, Colditz G, Tamimi R: **Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study.** *Breast cancer research and treatment* 2011, **126**(1):185-192.
4. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, members P: **Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Annals of Oncology* 2011, **22**(8):1736-1747.
5. Ejlersten B, Jensen MB, Nielsen KV, Balslev E, Rasmussen BB, Willemoe GL, Hertel PB, Knoop AS, Mouridsen HT, Brunner N: **HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, **28**(6):984-990.
6. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdottir

- K, Olsen KE, Mouridsen H *et al*: **retrospective analysis of topoisomerase II $\alpha$  amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(30):7483-7490.
7. Nielsen KV, Ejlerlsen B, Moller S, Jorgensen JT, Knoop A, Knudsen H, Mouridsen HT: **The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D.** *Acta oncologica* 2008, **47**(4):725-734.
8. Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, Villalobos IE, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M *et al*: **Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(7):859-867.
9. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP: **Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples.** *Genes, chromosomes & cancer* 2004, **39**(4):288-297.
10. Cinieri S, Orlando L, Fedele P, Cusmai A, D'Amico M, Rizzo P, Chetri MC: **Adjuvant strategies in breast cancer: new perspectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gallen International Expert Consensus Conference.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2007, **18 Suppl 6**:vi63-65.

11. Sleeman JP, Nazarenko I, Thiele W: **Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development.** *International Journal of Cancer* 2011, **128**(11):2511-2526.
12. Lale Atahan I, Yildiz F, Ozyigit G, Sari S, Gurkaynak M, Selek U, Hayran M: **Percent positive axillary lymph node metastasis predicts survival in patients with non-metastatic breast cancer.** *Acta oncologica* 2008, **47**(2):232-238.
13. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N *et al*: **Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18.** *Journal of Clinical Oncology* 1997, **15**(7):2483-2493.
14. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B: **Preoperative Chemotherapy in Patients With Operable Breast Cancer: Nine-Year Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18.** *JNCI Monographs* 2001, **2001**(30):96-102.
15. Buzdar AU: **Preoperative chemotherapy treatment of breast cancer--a review.** *Cancer* 2007, **110**(11):2394-2407.
16. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, Buzdar AU, Smith IE, Symmans WF, Singh B *et al*: **Preoperative Therapy in Invasive Breast Cancer: Pathologic Assessment and Systemic Therapy Issues in Operable Disease.** *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(5):814-819.
17. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley

- SM, Sneige N *et al*: **Clinical Course of Breast Cancer Patients With Complete Pathologic Primary Tumor and Axillary Lymph Node Response to Doxorubicin-Based Neoadjuvant Chemotherapy.** *Journal of Clinical Oncology* 1999, **17**(2):460.
18. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J *et al*: **Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes.** *Journal of Clinical Oncology* 2012.
19. Hennessy BT, Hortobagyi GN, Rouzier R, Kuerer H, Sneige N, Buzdar AU, Kau SW, Fornage B, Sahin A, Broglio K *et al*: **Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(36):9304-9311.
20. Guarneri V, Broglio K, Kau SW, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V, Buchholz T, Meric F, Middleton L, Hortobagyi GN *et al*: **Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006, **24**(7):1037-1044.
21. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M *et al*: **Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(8):1275-1281.
22. Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Ferno M, Ryden L: **Biomarker expression and St Gallen**

- molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up.** *Breast cancer research and treatment* 2013, **140**(1):93-104.
23. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM: **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1998, **11**(2):155-168.
24. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(1):118-145.
25. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2006, **25**(1):118-145.
26. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T *et al*: **Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group.** *Journal of the National Cancer Institute* 2011, **103**(22):1656-1664.



27. Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, Amari M, Tadano-Sato A, Takahashi Y, Watanabe M *et al*: **Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients.** *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2012:1-9.
28. Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, Laenkholm AV: **ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 2012, **132**(2):511-521.
29. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D: **Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites.** *Annals of Oncology* 2002, **13**(7):1036-1043.
30. D'Andrea MR, Limiti MR, Bari M, Zambenedetti P, Montagutti A, Ricci F, Pappagallo GL, Sartori D, Vinante O, Mingazzini PL: **Correlation between genetic and biological aspects in primary non-metastatic breast cancers and corresponding synchronous axillary lymph node metastasis.** *Breast cancer research and treatment* 2007, **101**(3):279-284.
31. Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L: **Does Analysis of Biomarkers in Tumor Cells in Lymph Node Metastases Give Additional Prognostic Information in Primary Breast Cancer?** *World J Surg* 2010, **34**(7):1434-1441.
32. Cardoso F, Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Rouas G, Dolci S, Ferreira F, Paesmans M, Piccart M: **Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes.** *Annals of oncology : official journal*

- of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2001, 12(5):615-620.*
33. Radisky DC, LaBarge MA: **Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype.** *Cell Stem Cell* 2008, **2(6):511-512.**
  34. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar F: **Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?** *Cancers* 2011, **3(1):716-729.**
  35. Singh A, Settleman J: **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.** *Oncogene* 2010, **29(34):4741-4751.**
  36. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M *et al*: **The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells.** *Cell* 2008, **133(4):704-715.**
  37. Baum B, Settleman J, Quinlan MP: **Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease.** *Seminars in cell & developmental biology* 2008, **19(3):294-308.**
  38. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G, Andersen JA, Mitelman F, Heim S: **Clonal heterogeneity in breast cancer: Karyotypic comparisons of multiple intra—and extra—tumorous samples from 3 patients.** *International Journal of Cancer* 1995, **63(1):63-68.**
  39. Heim S, Teixeira MR, Dietrich CU, Pandis N: **Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast.** *Cancer genetics and cytogenetics* 1997, **95(1):16-19.**
  40. Torres L, Ribeiro F, Pandis N, Andersen J, Heim S, Teixeira M: **Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases.**

- Breast cancer research and treatment* 2007, **102**(2):143-155.
41. Marusyk A, Polyak K: **Tumor heterogeneity: Causes and consequences.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2010, **1805**(1):105-117.
42. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR: **Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Cancer treatment reviews* 2011, **37**(6):422-430.
43. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *The Journal of Immunology* 1984, **133**(4):1710-1715.
44. Engstrøm MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, Vatten LJ, Bofin AM: **Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients.** *Breast cancer research and treatment* 2013:1-11.
45. Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR: **Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer.** *British journal of cancer* 2004, **91**(12):2012-2017.
46. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Arima N: **Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis.** *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2010, **17**(4):269-275.
47. von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Müller BM, Blohmer JU, Sinn BV, Eidtmann H, Eiermann W,

- Gerber B, Tesch H *et al*: **Ki67 Measured after Neoadjuvant Chemotherapy for Primary Breast Cancer**. *Clinical Cancer Research* 2013, **19**(16):4521-4531.
48. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K-i, Matsuoka Y, Yamashita H, Fukuda M: **An evaluation of predictive factors involved in clinical or pathological response to primary chemotherapy in advanced breast cancer**. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2002, **9**(2):145-152.
49. Matsubara N, Mukai H, Fujii S, Wada N: **Different prognostic significance of Ki-67 change between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer**. *Breast cancer research and treatment* 2013, **137**(1):203-212.

## X. 図の説明

図 1. 術前化学療法タキサン系薬剤の有無に関する生存曲線

A; タキサン系薬剤の有無による無病生存率 (DFS; Disease-free Survival)

B; 全生存率 (OS; Overall Survival)

DFS、OS いずれもタキサン系薬剤の有無による有意差は認められなかった。

図 2. 免疫組織化学 ; 各抗体による染色状況

A; HE 染色

B; Estrogen receptor (ER)

C; Progesterone Receptor (PgR)

D; Human epidermal growth factorII (HER2)

E; Ki-67

F; Topoisomerase II $\alpha$  (TOP2a)

すべて 200 倍顕鏡による画像である。

図 3. Ki-67 LI および TOP2a H-Score の原発巣と転移リンパ節の相関関係

Ki-67 LI および TOP2a H-Score いずれも原発巣と転移リンパ節巣の間に正の相関関係を認めた。

図 4. 原発巣、転移リンパ節巣の Luminal A 及び B に関する生存曲線

A; 原発巣における無病生存率(DFS)    B; 転移リンパ節巣における無病生存率(DFS)

C; 原発巣における全生存率(OS)        D; 転移リンパ節巣における全生存率(OS)

原発巣では DFS に有意差が見られなかったが、転移リンパ節では Luminal A 群で有意に再発が少なかった。OS は原発巣、転移リンパ節巣いずれも Luminal A で死亡が少なかった。リンパ節転移巣における OS では Luminal A 群の死亡症例はゼロであった。

図 5. 原発巣、転移リンパ節巣 Herceptest 乖離症例 18 例における Luminal A と B の生存曲線

A; 原発巣における無病生存率(DFS)    B; 転移リンパ節巣における無病生存率(DFS)

C; 原発巣における全生存率(OS)        D; 転移リンパ節巣における全生存率(OS)

原発巣では OS,DFS とも Luminal A が Luminal B よりも予後が悪い結果であった。転移リンパ節では通説通り Luminal A が予後良好であった。

図 6. 免疫組織蛍光染色の染色例

原発巣 Herceptest 0、転移リンパ節 Herceptest 3+と乖離した症例。HE 染色、免疫組織染色による HER2、免疫組織蛍光染色（PID 染色）による染色例。

いずれも 400 倍顕鏡である。

図 7. 原発巣と転移リンパ節における免疫組織蛍光染色（PID 染色）の関係

赤；原発巣、転移リンパ節とも陽性 青；いずれも陰性

緑；原発巣陰性リンパ節陽性                      ピンク；原発巣陽性リンパ節陰性

PID はリンパ節で比較的高値を示した。原発巣と転移リンパ節巣で免疫染色にて結果が乖離した症例は PID でも矛盾は見られなかった。

## XI. 図

図 1. 術前化学療法タキサン系薬剤の有無に関する生存曲線

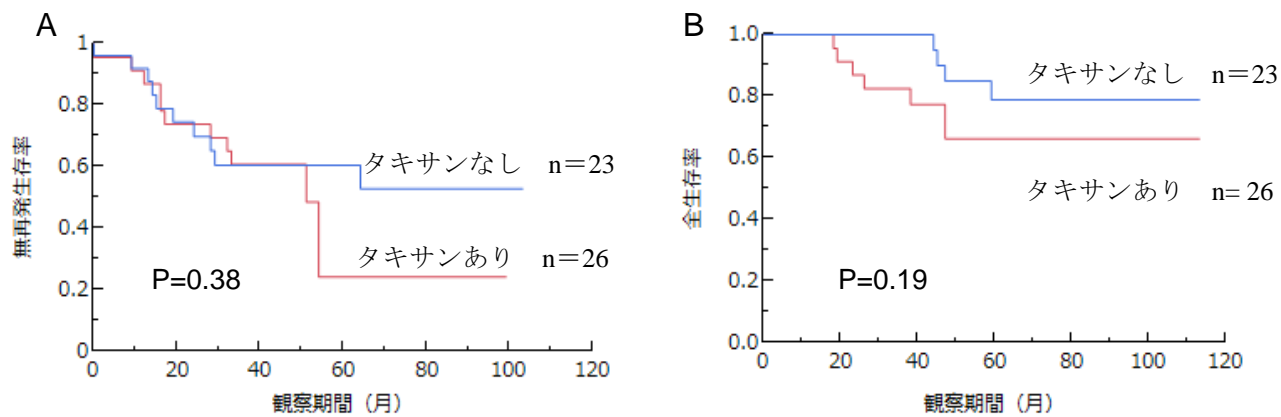
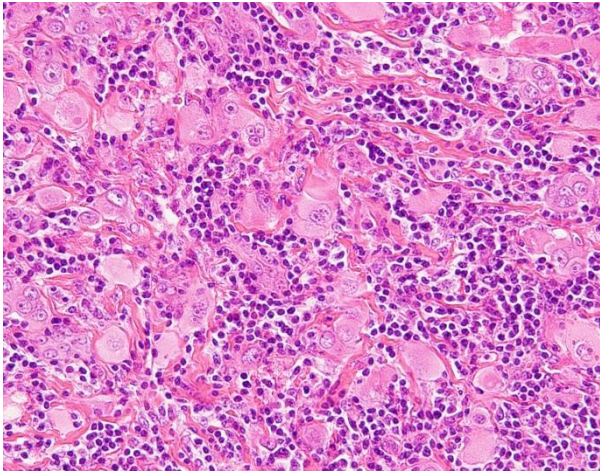


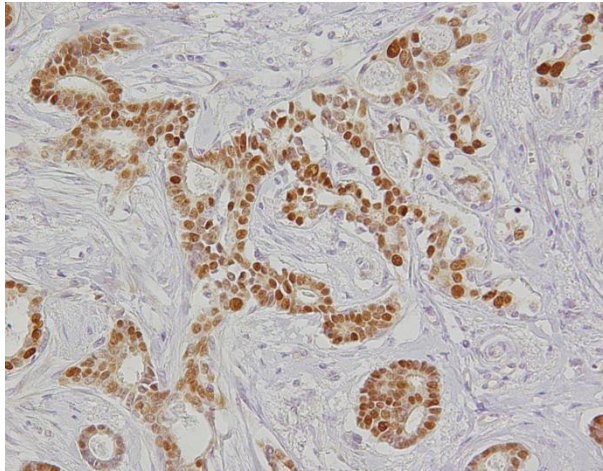


図 2. 免疫組織化学；各抗体による染色状況

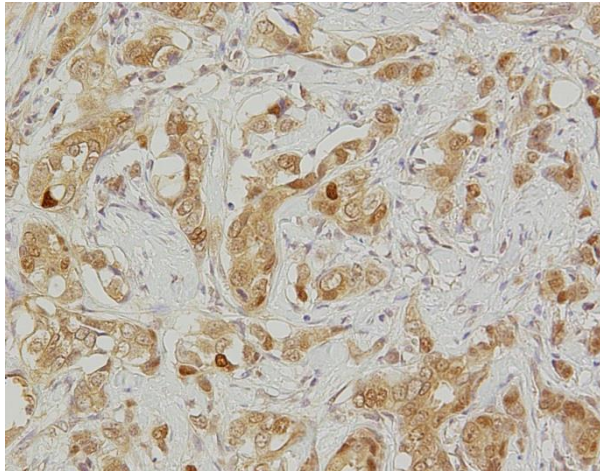
A



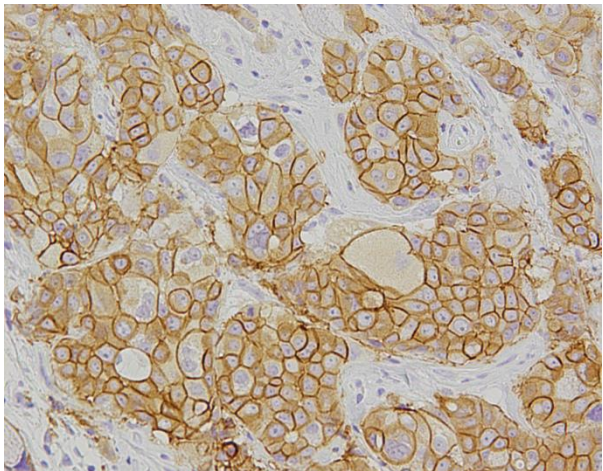
B



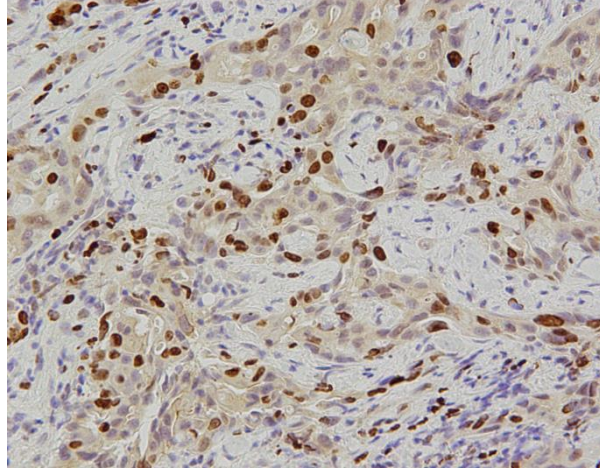
C



D



E



F

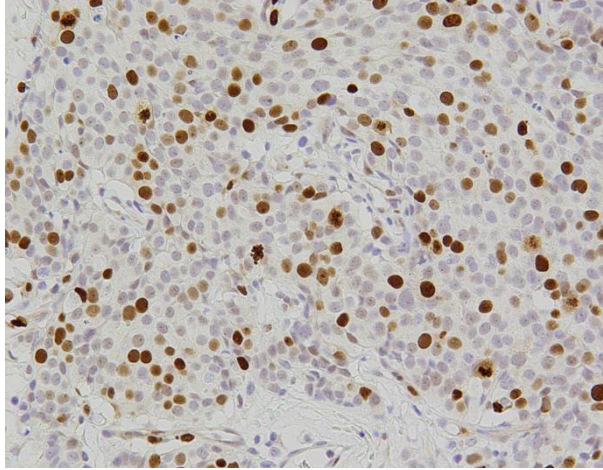


図 3. 原発巣と転移リンパ節巣の Ki-67 LI 及び TOP2a の相関

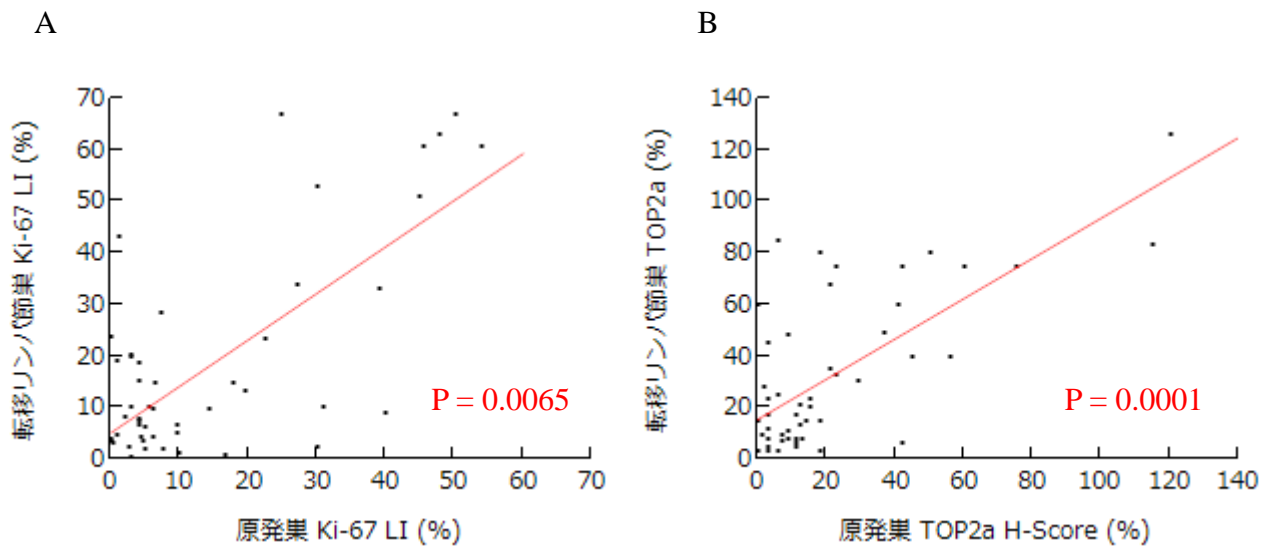


図 4. Luminal A 及び B における原発巣、転移リンパ節巣それぞれの生存曲線

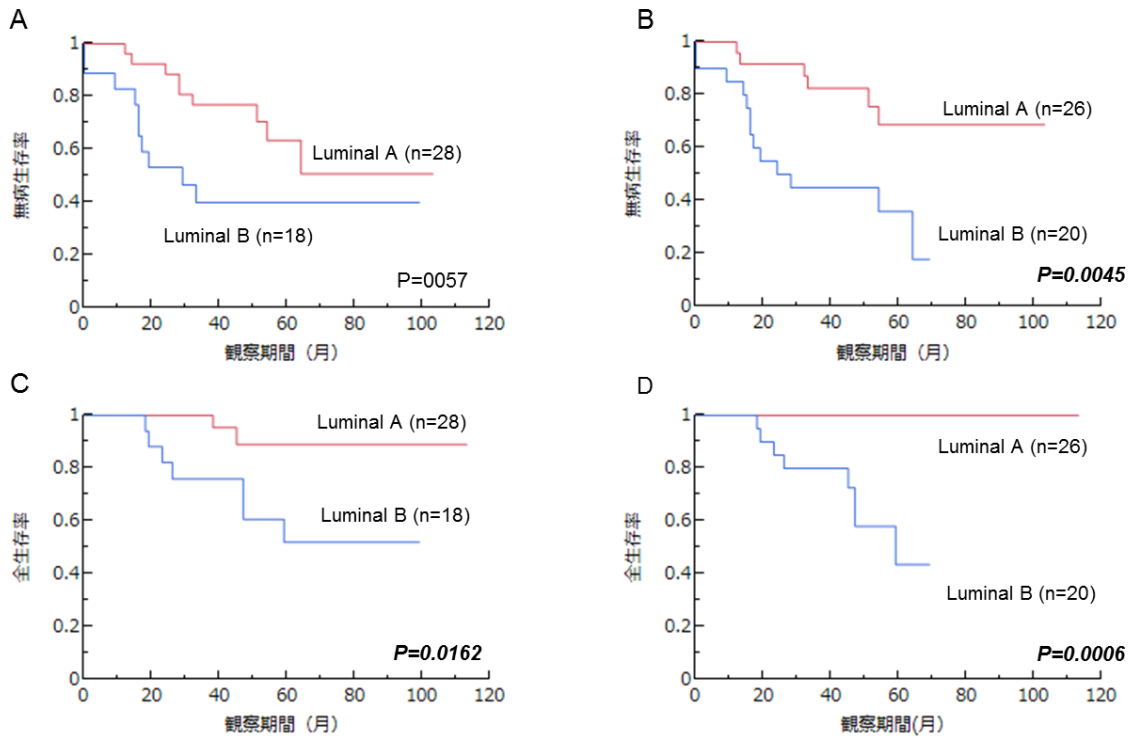


図 5. 原発、転移リンパ節巣サブタイプ乖離症例の Luminal type の生存曲線

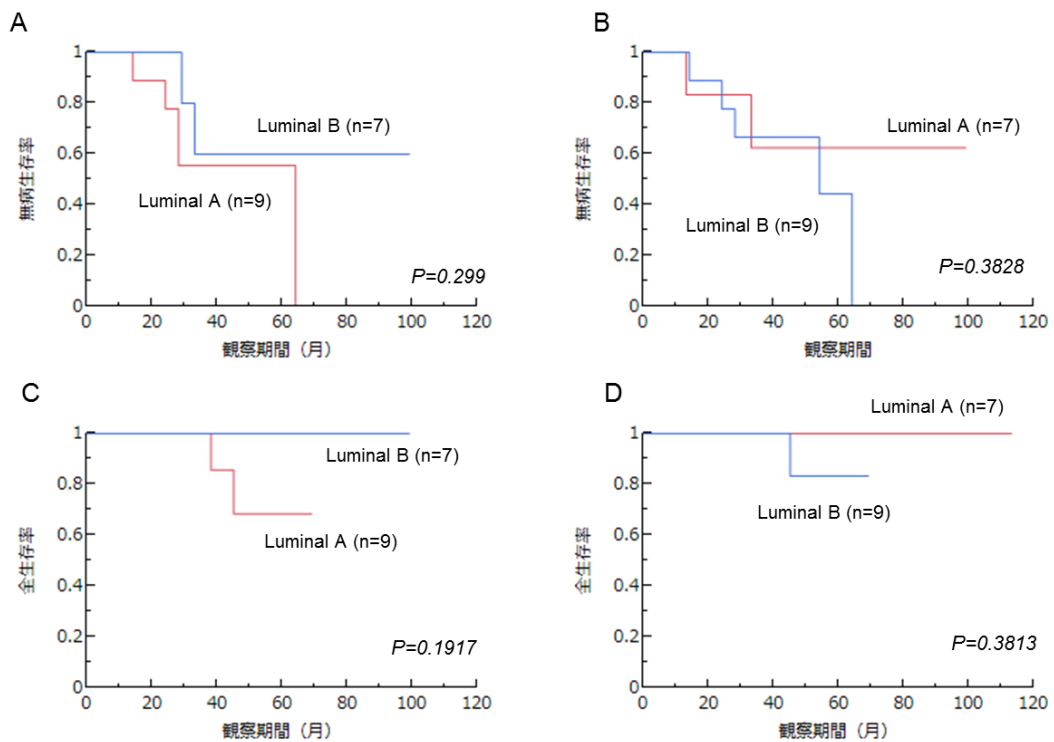
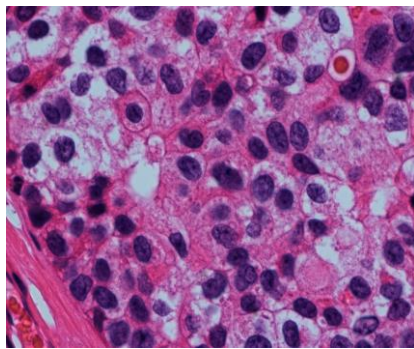


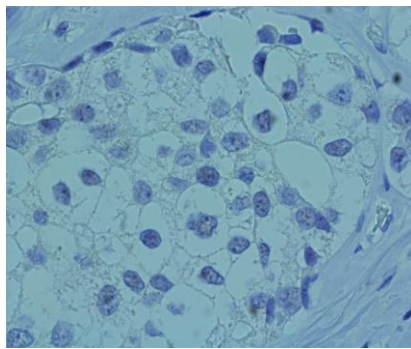


図 6. 免疫組織蛍光染色；原発巣、転移リンパ節 Herceptest 乖離症例

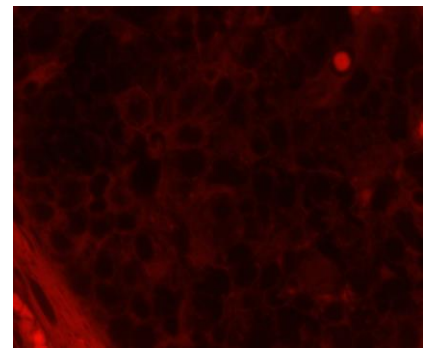
(原発巣)



HE×400

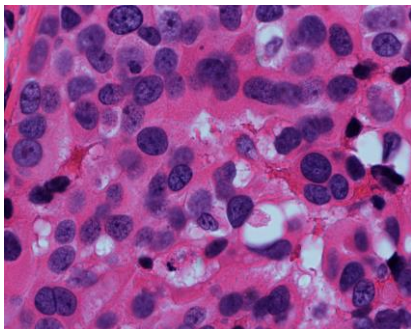


Herceptest Score 0×400

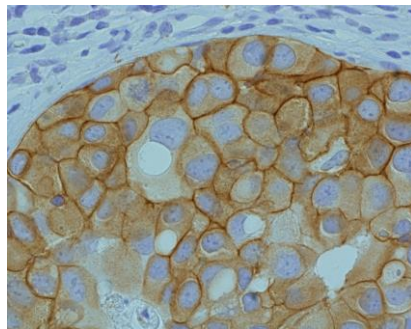


PID×400 Score 4.9

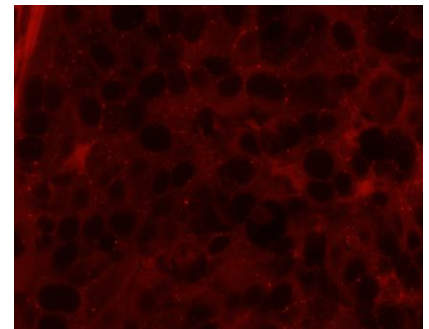
(転移リンパ節)



HE×400

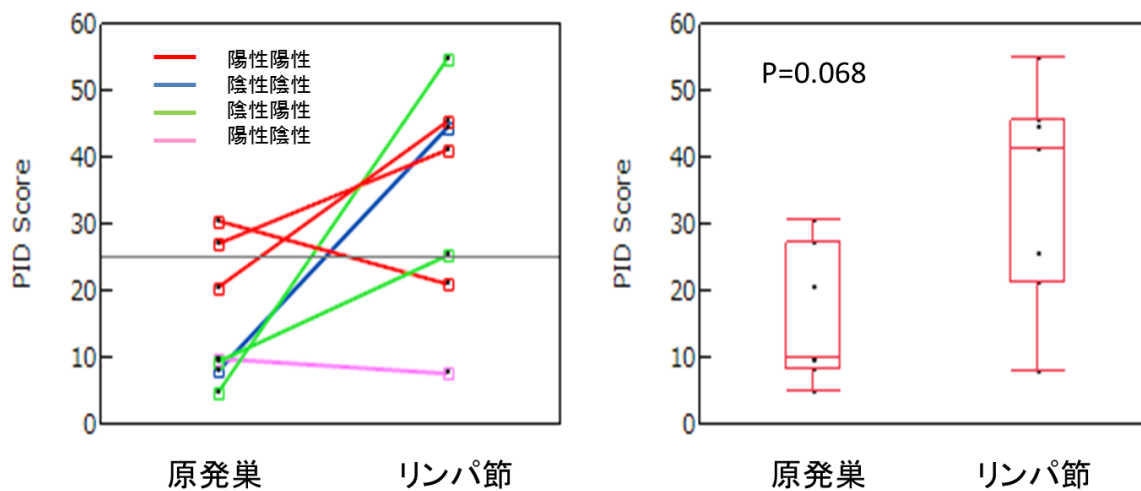


Herceptest Score 3×400



PID×400 Score 55.2

図 7. 原発巣と転移リンパ節との PID の関係



## XII. 表

表 1. 臨床病理学的因子

臨床病理学的因子	症例数	%
年齢 (歳): 中央値 49, 平均値 51.3 (レンジ 31-80)		
≤40	8	16.3
41-50	18	36.7
51-60	14	28.6
61-70	5	10.2
≥71	4	8.2
pTNM		
II	17	34.7
III	29	59.2
IV	3	6.1
原発巣最大浸潤径 (mm): 中央値 23, 平均値 28.2 (レンジ 2-80)		
≤20	22	44.9
20 -50	19	38.8
≥50	8	16.3
組織学的グレード		
1	6	12.2
2	32	65.3
3	11	22.5
転移リンパ節個数		
1-3(pN1)	20	40.8
4-9(pN2)	17	34.7
≥10(pN3)	12	24.5
病理学的効果判定		
1a	20	40.8
1b	20	40.8
2	9	18.4
3	0	0

表 2. 術前化学療法レジメ

レジメ	症例数	%
Anthracyclin 単独	27	55
Anthracyclin + Taxane	19	39
Taxane 単独	2	4
Taxane + Trastuzumab	1	2
合計	49	100

Anthracycline; FEC、CEF もしくは CMF

Taxane; タキソテールもしくはタキソール

表 3. 1 次抗体

抗体	クローン	抗体入手先	希釈倍率	抗原賦活
ER	6F11	Leica Microsystems	1:50	AC(pH6)
PgR	1A6	International	1:50	AC(pH6)
HER2*		Dako	1:1000	AC(pH6)
HER2**	4B5	Roche	1:1	Boil(90°)
Ki-67	MIB-1	Dako	1:300	AC(pH6)
TOP2a	K5733	Dako	1:1000	AC(pH6)

AC: オートクレーブ in 0.01M クエン酸緩衝液 buffer (pH6.0 or pH9.0), 121°C, 5 分

MW: マイクロウェーブ in 0.01M クエン酸緩衝液 buffer (pH6.0), 95°C, 15 分

ER; estrogen receptor, PR; progesterone receptor

HER2; human epidermal growth factor receptor-2

HER2\*; 免疫染色

HER2\*\*; PID 染色に使用

TOP2a; Topoisomerase II  $\alpha$

表 4. St Gallen 2011 によるサブタイプ分類

Intrinsic subtype	Clinico-pathologic definition	
Luminal A	‘Luminal A’	ER and/or PgR positive HER2 negative Ki-67 low (<14%)
Luminal B	‘Luminal B (HER2 negative)’	ER and/ or PgR positive HER2 negative Ki-67 high ( ≥14%)
	‘Luminal B (HER2 positive)’	ER and/ or PgR positive HER2 over-expressed or amplified Any Ki-67
Erb-B2 overexpression	‘HER2 positive (non luminal)’	HER2 over-expressed or amplified ER and PgR absent
Basal-like	‘Triple negative(ductal)’	ER and PgR absent HER2 negative

表 5. 臨床病理学的因子と予後

臨床病理学的因子	再発(n=22)	非再発(n=27)	P 値	死亡(n=10)	生存(n=39)	P 値
年齢	51.5±2.4	51.0±2.2	0.67	51.5±13.0	51.5±11.0	0.76
pTNM			<b>&lt;0.0001</b>			<b>0.0008</b>
II	7(31.8%)	10(37.0%)		2(20.0%)	15(38.5%)	
III	12(54.6%)	17(63.0%)		5(50.0%)	24(61.5%)	
IV	3(13.6%)	0		3(30.0%)	0	
腫瘍径	30.2±4.5	26.5±4.1	0.53			0.76
組織学的グレード			<b>0.025</b>	26.7±18.2	28.6±21.9	0.11
1	1(4.5%)	5(83.3%)		1(10.0%)	5(12.8%)	
2	13(59.1%)	19(59.4%)		4(40.0%)	28(71.8%)	
3	8(36.4%)	3(27.3%)		5(50.0%)	6(15.4%)	
リンパ節個数	6.9±1.2	6.1±1.1	0.24			0.16
化学療法効果判定			0.52			0.76
1a	7(31.8%)	13(48.2%)		5(50.0%)	15(38.5%)	
1b	11(50.0%)	9(33.3%)		4(40.0%)	16(41.0%)	
2	4(18.2%)	5(18.5%)		1(10.0%)	8(20.5%)	

表 6. 原発巣と転移リンパ節における ER, PgR, HER2 の比較

		転移リンパ節巣			Fisher's	McNemar's	
					P-Values	P-Values	
原発巣	ER	陰性	陽性	合計	一致		
		陰性	7	3	10	45/49=91.84%	<b>P&lt;0.0001</b>
		陽性	1	38	39	不一致	
		合計	8	41	49	4/49=8.16%	P=0.32
		PgR				一致	
		陰性	4	4	8	38/49=77.55%	P=0.063
		陽性	7	34	41	不一致	
		合計	11	38	49	11/49=22.45%	P=0.37
		HER2				一致	
		陰性	41	2	43	46/49=93.88%	<b>P&lt;0.0001</b>
		陽性	1	5	6	不一致	
		合計	42	7	49	3/49=6.12%	P=0.33

表 7. CNB と原発巣における ER, PgR, HER2 の比較

		原発巣			Fisher's	McNemar's	
					P-Values	P-Values	
CNB 検体	ER	陰性	陽性	合計	一致		
		陰性	4	2	6	31/36=86.1%	P=0.0076
		陽性	3	27	30	不一致	
		合計	7	29	36	5/36=13.9%	P=0.65
		PgR				一致	
		陰性	3	9	12	24/36=66.6%	P=0.37
		陽性	3	21	24	不一致	
		合計	6	30	36	12/36=33.4%	P=0.37
		HER2				一致	
		Negative	33	2	35	34/37=91.9%	P=0.0128
		Positive	1	1	2	不一致	
		Total	34	3	37	3/37=8.1%	P=0.56



表 8. Ki-67 LI および TOP2A H-Score の原発巣、転移リンパ節巣それぞれの予後との関係

		症例数	Ki-67		TOP2A	
			LI (%)	P-values	H-Score	P-values
原発巣	再発	21	21.8±3.1	0.0804	29.5±5.7	0.1314
	非再発	28	8.4±2.7		15.8±4.9	
転移リンパ節巣	再発	21	31.5±3.5	<0.0001	50.0±5.7	0.0004
	非再発	28	8.0±3.1		19.9±4.9	
原発巣	死亡	10	27.0±4.5	0.0203	45.4±7.6	0.002
	生存	39	10.9±2.3		15.6±3.8	
転移リンパ節巣	死亡	10	61.7±8.3	0.0019	61.7±8.3	0.0019
	生存	39	25.4±4.2		25.4±4.2	

表 9. 原発巣および転移リンパ節巣のサブタイプ分類の比較

		転移リンパ節巣				合計
		LuminalA	LuminalB	HER2	TN	%
原発巣	LuminalA	19	8	0	1	28
						57.14
	LuminalB	6	11	1	0	18
						36.73
	HER2	0	0	1	0	1
					2.04	
	TN	1	1	0	0	2
						4.08
	Total	26	20	2	1	49
	%	53.1	40.8	4.1	2	

表 10.

HER2 に対する免疫組織蛍光染色 (PID 染色) および免疫染色の結果

IHC 及び FISH による判定		PID Score	
原発巣	転移リンパ節	原発巣 PID	リンパ節 PID
+	+	20.74	45.64
-	-	8.18	44.72
+	+	27.3	41.4
+	-	10.13	7.89
-	+	4.9	55.02
+	+	30.81	21.34
-	+	9.62	25.57