

博士論文

乳癌の浸潤性小葉癌と浸潤性乳管癌における微小環境

Cancer-associated fibroblasts と血管新生因子に関する比較検討

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

中川 紗紀

目次

- I. 要約 p.1 - 3
- II. 研究背景 p.4 - 6
- III. 研究目的 p.7
- IV. 研究方法 p.8 - 14
- V. 研究結果 p.15 - 19
- VI. 考察 p.20 - 26
- VII. 結論 p.27
- VIII. 文献 p.28 - 37
- IX. 表と図 p.38 - 61

I 要約

背景と目的：乳癌における浸潤性小葉癌 (invasive lobular carcinoma: ILC)は、浸潤性乳管癌 (invasive ductal carcinoma: IDC)について2番目に罹患者数が多い組織型で、全乳癌の5-15%を占め、近年増加傾向にある。これまでの研究から ILC と IDC がいずれも乳腺の terminal duct lobular unit (TDLU)に由来することが明らかにされているが、一方で両者の分子生物学的、病理組織学的、臨床的特徴には大きな相違が存在することも知られている。最近では両者の形態的な相違は、発癌過程や腫瘍の微小環境すなわち腫瘍間質を構成する cancer-associated fibroblasts (CAFs)等に起因することが示唆されているが、両者の腫瘍間質にどのような相違があるかに関しては明らかにされていない点が多い。病理組織学的に ILC は腫瘍細胞間の結合性が低下し、びまん性に間質へ浸潤するため、腫瘍胞巣を形成しながら浸潤する IDC と違い、明瞭な腫瘍を形成することは稀である。また臨床的に ILC は IDC と比較して生殖器や消化管、腹腔内への転移が多い。

本研究では、乳癌の腫瘍間質を ILC と IDC で比較、差異の有無を明らかにし、両者の病理組織学的、臨床的な相違との関連を検討する。さらに、ILC 固有の治療標的となりうる因子を検索することを目的とする。

方法：ILCの多くを占めるサブタイプである、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER)陽性、ヒト上皮増殖因子受容体-2 (Human epidermal growth factor receptor-2: HER2)陰性のいわゆる luminal like ILC と luminal like IDC を対象として、両者の腫瘍間質を構成する CAFs や血管新生について免疫組織化学的手法、マイクロアレイ解析による比較検討を行った。遠隔転移がなく未治療の luminal like ILC 145 例と luminal like IDC 121 例の手術検体を用いて、免疫組織化学的に間質の CAFs 増生 (α SMA、CD34)、血管新生 (CD31、vasohibin-1、nestin)の程度を比較した。血管新生の評価には、microvessel density (MVD)、vasohibin-1 positive ratio (VPR)、nestin positive ratio を用いた。次に luminal like かつ細胞増殖マーカーである Ki-67 標識率が 14%未満の luminal A like ILC 5 例、luminal A like IDC 5 例のうち、凍結検体の HE 標本で間質が 70%以上を占める 3 例ずつを対象に、血管新生に関わる遺伝子群に関する PCR アレイ解析を行った。ILC において mRNA 発現が高かったインスリン様増殖因子-1 (insulin like growth factor-1: IGF-1)に関して luminal A like ILC 40 例、luminal A like IDC 40 例を対象に免疫組織化学的検討を行った。

結果：血管新生の指標は ILC で有意に高値であったが (MVD: $p = 0.0109$ 、VPR: $p = 0.0266$)、ILC の新生血管は nestin 陽性率が有意に低値であった ($p = 0.0437$)。CAFs の増生は ILC で高度であった (ILC: 70%、IDC: 37%)。PCR アレイでは、ILC で IGF-1 mRNA の発現が高く (Fold change 34.87、 $p = 0.134$)、免疫組織化学的にも ILC で IGF-1、IGF-1 受容体共に発現が高かった (IGF-1: $p = 0.0001$ 、IGF-1R: $p = 0.0455$ 、

$r = 0.339$)。また免疫組織化学的に ILC では IGF-1 と CD31、vasohibin-1 陽性血管数、CAF_s 増生、nestin 陽性率には相関がみられたが、Ki-67 標識率との相関はなかった (CD31: $r = 0.613$, $p < 0.0001$ 、vasohibin-1: $r = 0.485$, $p = 0.0005$ 、CAF_s density: $r = 0.643$, $p = 0.0027$ 、nestin/vasohibin-1: $r = -0.607$, $p = 0.080$ 、Ki-67: $r = 0.158$, $p < 0.0001$)。

考察： ILC では腫瘍間質における CAF_s 増生、血管新生が有意に高かったが、観察される新生血管は nestin 陰性、すなわちペリサイトを欠いた透過性が高くかつ脆弱な血管の割合が高いことが示された。また腫瘍細胞、腫瘍間質での IGF-1、IGF-1 受容体発現は ILC で高い傾向があり、IGF-1 を介した増殖経路である PI3K/AKT/mTOR 経路が血管新生や CAF_s 増生に強く影響している可能性が考えられた。本研究では術後の観察期間が短く、転移再発や原病死などのイベントが少ない為に、これらの因子と予後の関連を検討することが困難であったが、ILC では IGF-1 経路の阻害剤が IDC より有効となる可能性がある。

結論： ILC では IDC と比較して腫瘍間質における CAF_s 増生、血管新生の指標が高値であったが、ILC の新生血管はペリサイトを欠いた脆弱な血管が多いことを初めて明らかにした。また CAF_s の増生や血管新生を促進する IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 経路は、ILC でより強く発現していることが示唆された。

II. 研究背景

乳癌における浸潤性小葉癌 (invasive lobular carcinoma: ILC)は、浸潤性乳管癌 (invasive ductal carcinoma: IDC)について2番目に罹患者数が多い組織型であり、欧米では全乳癌の10-15%、本邦では5-10%を占め、近年増加傾向にある¹⁾⁻³⁾。

これまでに、Wellings や大内らによってヒト乳癌は乳腺の terminal duct lobular unit (TDLU)を発生源地とすることが明らかにされたが^{4),5)}(図1)、ILCはIDCの1亜型と考えられ、ILCが研究対象となることはまれであった^{6),7)}。しかし近年、ILCとIDCには分子生物学的、病理組織学的、臨床的特徴に大きな相違が存在するとの報告が相次いでいる⁸⁾⁻¹¹⁾。病理組織学的にILCは細胞間の結合性が低下した比較的小型の腫瘍細胞からなり、間質に索状または個細胞性にびまん性に浸潤する一方で、IDCは細胞同士が結合性を維持し、腺管や充実胞巣を形成する(図2)。このILCに特徴的な腫瘍細胞の結合性の低下は、CDH1 遺伝子の欠失により、接着因子であるE-cadherinの発現が失われることによる¹²⁾。その他の組織学的特徴として、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER)やプロゲステロン受容体 (progesterone receptor: PR)陽性率が高く、ヒト上皮増殖因子受容体-2 (human growth factor receptor-2: HER2)陰性、細胞増殖マーカーであるKi-67 標識率が低い、いわゆるluminal like サブタイプに分類されるものが多い点は重要である。またILCは多中心発生が多い、核異型度が低い、脈管侵襲が少ないといった点があげられる^{8),9),13)-15)}。臨床的には腫瘍を形成することが稀で、マンモグラフィーや触診での発見が困難であり、診断時の腫瘍径が大きい傾向がある¹⁶⁾。また遠隔転移部位にも特徴的な相違が

あり、ILCではIDCと比較して腹膜や生殖器、消化管への転移も多くみられる^{2),8),17)}。

発生母地がいずれもTDLUでありながら病理組織学的、臨床的特徴が大きく異なる要因は、発癌過程や腫瘍の微小環境、すなわち腫瘍間質を構成するcancer-associated fibroblasts (CAFs)、腫瘍免疫（リンパ球を主体とする炎症性細胞浸潤）、血管新生等の相違によると考えられている^{18),19)}。また大腸癌をはじめ様々な固形腫瘍において腫瘍増殖、血管新生、浸潤、転移には腫瘍細胞と間質の相互作用が重要な役割を果たすと言われている。

腫瘍組織は腫瘍細胞と腫瘍間質に大別され、腫瘍間質はCAFsや血管内皮細胞、リンパ球やマクロファージを含む炎症性細胞、脂肪細胞などで構成されている。このうち腫瘍間質を構成する最大要素であるCAFsは腫瘍増殖を促進するだけでなく、薬物治療の抵抗性を高めるという報告もある^{18),19)}。治療抵抗性という観点では、ILCは抗腫瘍薬に対する感受性が低いとする報告が複数あり、原因としてluminal like乳癌である他に、何らかの機序が関与していると推察されているが、現時点では解明されていない^{6),14),20)}。

ここ数年、乳癌でも腫瘍間質が注目されており、CD8陽性Tリンパ球(CD8+)やFOXP3陽性Tリンパ球(regulatory T cell: Treg)による腫瘍免疫に関する研究が盛んである。Tregは腫瘍の浸潤や転移を促進し、CD8陽性Tリンパ球は予後良好因子となること、またER、PR、HER2陰性のいわゆるトリプルネガティブタイプでは、間質に浸潤するリンパ球(tumor infiltrative lymphocyte: TIL)のCD8+/Treg比が高く、かつKi-67標識率が高い症例で化学療法の奏効率が高いことが明らかにされた²¹⁾。

しかし Ali らの報告では、ILC と IDC では TIL に有意差を認めなかった²²⁾。

一方、血管新生を評価する尺度として免疫組織化学的に CD31 陽性血管数、vasohibin-1 陽性血管数を計測した microvessel density (MVD)、新生血管の vasohibin-1 陽性率 (vasohibin-1 positive ratio: VPR) が様々な癌腫で用いられており、予後との相関も報告されている^{23)・26)}。これら新生血管におけるペリサイトの発現は血管壁を強固にするが、乳癌の他、大腸癌や膵癌ではペリサイトのマーカーである nestin 陽性率も血管新生の尺度として有用であり、予後と相関するといわれている^{26)・27)・50)}。

しかし、これまでに報告された乳癌の腫瘍間質に関する研究は IDC を対象としたものや、サブタイプ別 (luminal like、HER2 タイプ、トリプルネガティブタイプ) の検討が多く、ILC と IDC の腫瘍間質にどのような相違があるか自体、十分な検討がなされていないのが現状である。

III. 研究目的

本研究では、乳癌の腫瘍間質を ILC と IDC で比較、差異の有無を明らかにし、両者の病理組織学的、臨床的な相違との関連を検討する。さらに両者の腫瘍間質の差異から、ILC 固有の治療標的となりうる因子を検索することを目的とする。

IV. 研究方法

【対象】

2003年1月から2013年12月に東北大学病院乳腺内分泌外科、東北公済病院、博愛会相良病院において手術を施行した乳癌症例のうち、ILCと診断された162例（東北大学病院乳腺内分泌外科40例、東北公済病院72例、博愛会相良病院50例）についてER、PR、HER2、Ki-67の免疫組織化学的評価の結果を元に、4種類の乳癌サブタイプに分類²⁸⁾し、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER)陽性かつ/またはプロゲステロン受容体 (progesterone receptor: PR)陽性、ヒト上皮増殖因子受容体-2 (Human epidermal growth factor receptor-2: HER2)陰性のいわゆる luminal like ILCとされた145例を対象とした。コントロール群として、2007年1月から2013年12月に東北大学病院乳腺内分泌外科にて手術を施行し、luminal like IDCと診断された121例を対象とした。乳癌サブタイプの分類は2013年、2015年のザンクトガレン国際会議で策定された定義に基づいた²⁸⁾(表1)。術前薬物療法施行例、トリプルネガティブタイプ (ER陰性、PR陰性、HER2陰性)、HER2タイプ (HER2陽性)、核グレード3、腫瘍径5cm以上 (T3)、または皮膚や胸壁浸潤を伴う症例 (T4)は除外した。ILC、IDCの診断は乳癌取扱い規約第17版に基づいて行い、TNM分類は Seventh Edition by the International Union Against Cancer (UICC)²⁹⁾ に拠った。また腫瘍の核グレードはElston、Ellisらの基準に従い分類した³⁰⁾。

手術時の患者の年齢、性別、閉経状況などの臨床情報の他、腫瘍の最大浸潤径、腋窩リンパ節転移、脈管侵襲の有無、ER、PR、HER2、Ki-67のデータは病理診断報

告書やカルテ、または各施設から提供されたデータを使用した（表 2-1）。病理所見に関する不足データは新たに免疫染色を行い、補足した。

【免疫組織化学的手法と評価方法】

手術検体を 10%ホルマリンにて固定後、各症例の浸潤部を含むパラフィン包埋ブロックから、厚さ 2 μ m の薄切標本を作成した。これらの標本についてヘマトキシリンエオジン(Hematoxyline & Eosin : HE)染色およびストレプトアビジン・ビオチン法にて免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色での 1 次抗体の希釈倍率と免疫賦活条件を表 3 に示す。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 分間室温で浸し、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 分間室温で浸し、非特異的抗体阻止を行った。それぞれの 1 次抗体に 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。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 (いずれもニチレイバイオサイエンス社、日本)を 2 次抗体として 30 分間、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 (ニチレイバイオサイエンス社)に 30 分間室温で反応させた。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、ヘマトキシリンによる核染色、エタノール脱水処理、キシレン透徹、封入を行った。

二重染色の場合は DAB 発色後に PBS 洗浄し、再度抗原賦活処理から 2 次抗体の反応までは同様の手順を繰り返した。2 種類目の抗体の発色に際して、アルカリフォ

スファターゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイバイオサイエンス社)に 30 分間室温で反応させた。PBS 洗浄後、alkaline phosphatase substrate kit (vector blue; Vector Laboratories、Burlingame、CA)により発色を行った。核染色は行わずエタノール脱水処理、キシレン透徹、封入を行った。

組織学的評価は the Union for International Cancer Control の TNM classification of malignant tumours 第 7 版に基づいて行った。免疫組織化学染色の評価について、ER、PR、Ki-67 に関しては、腫瘍細胞の核の陽性率を、HER2 に関しては腫瘍組織における細胞膜の染色強度を評価した。ER、PR については ASCO/CAP ガイドライン³¹⁾を用い、HER2 に関しては HER2 検査ガイドラインに則り 4 段階に score 化 (0-3)した³²⁾。Ki-67 標識率のカットオフ値を過去の文献に基づいて 14%と定め、ER 陽性かつ HER2 陰性の luminal like をさらに Ki-67 標識率が 14%未満の luminal A like と、14%以上の luminal B like に分類した³¹⁾。

一方で微小血管とは腫瘍増殖、炎症や創傷治癒の過程で既存の血管から分枝して形成される新生血管を指し、毛細血管 (capillary)や細静脈 (venule)を含み、病理組織学的には血管内皮細胞周囲に平滑筋細胞を伴わない³³⁾。血管新生の免疫組織化学的評価では、血管内皮細胞のマーカーとして CD31 と vasohibin-1、ペリサイトのマーカーには nestin を用いた。CD31、vasohibin-1 の標本作製には連続切片を使用した。Microvessel density (MVD)の計測は全例と対象とし、過去の文献に基づいて以下のように行った。低倍率の視野 (x40、x100)で腫瘍間質の微小血管密度が最も高い領域

1カ所をホットスポットとし、同部位において高倍率 (x200)視野下に微小血管数を計測した。染色される血管内皮細胞は、互いに独立したものは、内腔が明らかでない場合も1つの血管と判断した^{23),25)}。得られたデータから vasohibin-1 positive ratio (VPR: vasohibin-1 陽性血管数/ CD31 陽性血管数)を算出した。

腫瘍間質における CAFs のマーカーに関しては、多数の報告があり特定のマーカーが無い場合、過去の文献に基づいて CD34 陰性かつ αSMA 陽性である線維芽細胞を CAFs とした。CAFs 増生の密度の評価は同文献に基づき 5段階にスコア化し、CAFs 低スコア群 (0: 陰性、0.5: 腫瘍細胞周囲にわずかに増生、1: いくつかの腫瘍胞巣周囲を2~3層の線維が取り巻く)と CAFs 高スコア群 (2: 腫瘍巣の広い範囲で線維が束状に増生、3: 腫瘍巣全体に線維が束状に増生)に分類した^{34),35)}。

【血管新生因子、増殖因子の PCR アレイ】

全症例のうち、脈管侵襲やリンパ節転移がなく腫瘍径 2cm 未満 (T1)の luminal A like ILC と luminal A like IDC を 5例ずつ選定し、手術時に採取した凍結検体を Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (サクラファインテック社、日本)に包埋、クリオスタットミクロトーム(MICROM® GmbH HM550VP:ZEISS、Oberkochen、Germany)を用いて 10µm 厚に薄切後、HE 標本作製した。このうち HE 標本における間質の占める面積が 70%以上の 3症例ずつを対象に、腫瘍組織における血管新生因子、血管新生に関与するケモカイン等の発現を比較した。各凍結検体をホモジェナイズ後、RNeasy Micro Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。続い

て RT² First Strand Kit (QIAGEN)を用いて cDNA を作成した。リアルタイム PCR アレイには正常組織や腫瘍組織内の血管新生への関与が明らかにされている既知の遺伝子のうち 84 種類を含む RT² Profiler Human Angiogenesis PCR Array (PAHS-024A) Kit を用い、ABI 7500 (いずれも SABiosciences、Frederick、MD、USA)にて解析を行った。この Kit には 5 種類のハウスキーピング遺伝子 (*B2M*、*HPTR1*、*RPL13A*、*GADPH*、*ACTB*)の他、ポジティブコントロールが含まれており、データの適正化に用いられた。得られた PCR アレイのデータは SABiosciences のウェブサイト上(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis>)で Student's t 検定を用いて解析した。

【IGF-1、IGF-1R の免疫組織化学的評価】

上述の PCR アレイ解析の結果を受けて、全例の中からリンパ節転移のない腫瘍径 2cm 未満の症例を ILC と IDC から 40 例ずつランダムに選定し、IGF-1、IGF-1 受容体 (IGF-1R)の発現を免疫組織化学的に比較した。対象症例の臨床背景、病理組織学的因子を表 2-2 に示す。染色方法は前述の通りである。評価方法は過去の文献に基づいて、腫瘍細胞と腫瘍間質を区別して評価した。IGF-1 は細胞質における染色強度 (0:陰性、1:弱陽性、2:中等度陽性、3:強陽性)、陽性率 (0-100%、10%毎)を評価し、IGF-1R は細胞膜における染色強度を HER2 評価方法に準じて(0:陰性、1:弱くかつ不完全な膜への染色、2:弱く全周性に膜に陽性となる細胞が 10%以上、3:強く全周性に膜に陽性となる細胞が 10%以上)、4 段階に評価した³⁶⁾⁻³⁸⁾。

【統計学的手法】

統計解析には JMP Pro Version 11.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。2 群間の連続変数データの比較は、正規分布に従い等分散を示すものは Student の t 検定を、正規分布に従わないものは Mann-Whitney U 検定にて行った。カテゴリーデータに関しては、Pearson の χ^2 検定、Fisher の正確検定、Mann-Whitney U 検定を適時用いた。また対応のあるデータは Paired t 検定にて解析を行った。以上の解析はすべて p 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

【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：2009-107、2015-1-270）。本研究について開示すべき利益相反事項はない。

V. 結果

【対象症例の臨床的、病理組織学的因子】

ILC162 例を用い ER、PR、HER2、Ki-67 について病理診断報告書のデータまたは免疫組織化学的手法を用いて評価し、2013 年のザンクトガレン国際会議での定義に基づきサブタイプ分類を行った (表 1)。ER 陽性かつ HER2 陰性、Ki67 LI が 14% 未満である luminal A like ILC は 120 例、ER 陽性かつ HER2 陰性、Ki67 LI が 14% 以上である luminal B like ILC は 25 例、ER 陰性かつ HER2 陰性のトリプルネガティブタイプ ILC は 15 例となり、HER2 陽性の HER2 タイプ ILC は 2 例であった。本研究は ER 陽性かつ HER2 陰性である Luminal like ILC 145 例、コントロール群として luminal like IDC 121 例 (luminal A like: 92 例、luminal B like: 29 例) を対象とし、2 群間における年齢、閉経状況、最大浸潤径 (mm、pT)、リンパ節転移の有無 (N)、病理学的ステージ (pStage)、リンパ管侵襲 (ly)、静脈浸潤 (v)、核グレード (nuclear grade: NG)、Ki-67 標識率 (Labeling index : LI) について比較検討した。年齢、閉経状況、リンパ節転移 (N)、リンパ管侵襲 (ly)、静脈浸潤 (v) に関して有意差を認めなかった。一方で最大浸潤径 (mm、pT) は ILC 群で有意に大きく ($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$)、それに伴い病理学的ステージ (pStage) ($p < 0.0001$) にも有意差を認めた。Ki-67 LI は IDC 群で有意に高値であった ($p = 0.0185$) (表 2-1)。

【Microvessel density: MVD と vasohibin-1 positive ratio: VPR】

Luminal like ILC と luminal like IDC について CD31、vasohibin-1 の免疫染色を行った。標本写真を図 3 に、MVD、VPR のデータを表 4 に例示する。CD31 陽性血管数、vasohibin-1 陽性血管数は ILC で有意に高値であった ($p = 0.0109$ 、 $p < 0.0001$)。また VPR も ILC で有意に高値であった ($p = 0.0266$)。CD31 陽性血管数と vasohibin-1 陽性血管数には正の相関を認めた ($r = 0.668$ 、 $p < 0.0001$)。一方 CD31 陽性血管数と VPR、Ki-67 標識率、静脈侵襲、リンパ節転移には相関を認めなかった ($r = -0.080$ 、 $r = 0.136$ 、 $r = 0.080$ 、 $r = 0.023$)。

【Nestin 陽性率】

Nestin と CD31 または vasohibin-1 の二重染色による検討は、表 2-2 に示す luminal like ILC 40 例と IDC 40 例を対象として行った。各群の年齢、閉経状況、腫瘍細胞の核グレード、Ki-67 標識率に有意差はみられなかった。この 80 例はいずれも腫瘍径 2cm 未満の症例であるが、腫瘍径に有意差を認めた (平均値 ILC: 18.8 ± 7.6 、IDC: 12.2 ± 6.3 、 $p = 0.0123$)。

Nestin/vasohibin-1 二重染色の標本写真を HE 染色の標本写真と共に図 4 に、ILC と IDC における nestin 陽性血管数のデータを表 5 に示す。Nestin 陽性血管数は ILC で少ない傾向を認めた (ILC: 12.61 ± 2.01 、IDC: 16.23 ± 2.01 、N.S.)。Nestin/CD31 ratio は ILC で低値となる傾向を認めたが、有意差は認めなかった ($p = 0.0511$)。しかし Nestin/vasohibin-1 ratio は ILC で有意に低値であった ($p = 0.0437$)。

Nestin/vasohibin-1 ratio と腫瘍径、静脈侵襲には弱い相関を認めたが ($r = -0.350$ 、 $r = -0.275$)、核グレード、Ki-67 標識率には相関はみられなかった ($r = -0.143$ 、 $r = -0.203$)。また nestin/CD31 ratio と各因子には相関関係はみられなかった。

【Cancer-associated fibroblasts: CAFs の増生】

CAFs の増生を、表 2-2 に示す luminal like ILC40 例と IDC 40 例を対象として免疫組織化学的に評価した。CAFs のマーカーとして CD34、 α SMA を用い、CD34 陰性かつ α SMA 陽性である線維芽細胞を CAFs とした^{34,35})。前述の CAFs score の 5 段階のうち、score 0.5、1、2、3 の主な標本写真を図 5 に、ILC と IDC を比較したデータを表 6 に示す。全ての症例で CD34 は血管内皮細胞に陽性であったが、腫瘍間質細胞には陰性であった。CAFs 高スコア群は ILC では症例の 70%、IDC では 37% であり ILC で CAFs 増生は有意に高度であった ($p = 0.0087$)。

【腫瘍組織における血管新生に関与する遺伝子群の PCR アレイ】

前述の免疫組織化学的手法を用いた血管新生、CAFs 増生の結果から、luminal like ILC では luminal like IDC と比較して腫瘍間質における血管新生、CAFs 増生が高度であることが明らかとなった。

そこで 2 群間の腫瘍組織における血管新生に関与する遺伝子の発現を比較するため、正常組織や腫瘍組織内の血管新生に関与する既知の遺伝子 84 種類を含む RT²

Profiler Human Angiogenesis PCR Array (PAHS-024A) Kit を用いて PCR アレイを行った。対象は前述のとおり選定された luminal A like ILC と luminal A like IDC 3 例ずつであり、いずれも脈管侵襲 (ly0、v0)やリンパ節転移がなく (N-)腫瘍径 2cm 未満 (T1)の症例であった。対象症例の臨床背景には有意差はみられなかった。PCR アレイの解析結果の scatter plot 図を図 6、主な遺伝子群を表 7 に示す。Luminal A like ILC では CCL11 (chemokine ligand 11、fold-change: 18.24、 $p = 0.020$)、IGF-1 (insulin growth factor-1、34.87、 $p = 0.134$)、TEK (TEK tyrosine kinase、46.81、 $p = 0.114$)、VEGF-C (vascular endothelial growth factor-C、4.07、 $p = 0.172$)の発現が高かった。

【免疫組織化学による追加検討項目の選定】

PCR アレイの結果、ILC と IDC で有意差を認めた CCL11 は、表 2-2 に示す各 40 例での免疫組織化学検討でいずれも腫瘍細胞や間質細胞にびまん性に陽性となり、有意差を認めなかった。続いて、有意差はないものの fold-change が高値であった IGF-1 は、過去の研究において ILC の腫瘍細胞で高度に発現していることが明らかにされているが^{37,38}、間質細胞での染色性を比較検討した報告はない。そこで ILC と IDC の間質細胞における IGF-1、IGF-1R 発現を免疫組織化学的に比較することとした。

【IGF-1、IGF-1R の免疫組織化学的検討】

表 2-2 に示す luminal like ILC、IDC 各 40 例を対象に IGF-1、IGF-1R の免疫組

織化学的検討を行った。代表的な標本写真を図 7 に、IGF-1、IGF-1R の染色強度のデータを図 8 に示す。

IGF-1 は腫瘍細胞の他、CAF_s や血管内皮細胞の細胞質に陽性となった。陽性細胞の割合は陽性症例のほぼ全てで 70-99%であったため、データの解析から除外した。染色強度は前述の様に 4 段階で評価を行った。IGF-1R は腫瘍細胞の他、CAF_s や血管内皮細胞の細胞膜に陽性となり、各症例における腫瘍細胞と CAF_s や血管内皮細胞の染色強度、陽性率はおおむね一致していた。ILC と IDC の 2 群間での検討の結果、IGF-1、IGF-1R いずれも ILC で有意に発現が高かった($p = 0.0001$ 、 $p = 0.0455$)。また IGF-1 と IGF-1R の発現には正の相関が認められた ($r = 0.339$)。

【IGF-1 と MVD、VPR、Ki-67 標識率、CAF_s の相関】

ILC において、IGF-1 と CD31 陽性血管数、vasohibin-1 陽性血管数、CAF_s スコアには正の相関が認められた ($r = 0.613$ 、 $r = 0.483$ 、 $r = 0.643$)。一方、IGF-1 と nestin/vasohibin-1 ratio には負の相関を認めた ($r = -0.607$)。IGF-1 と Ki-67 標識率、VPR の間には相関はみられなかった ($r = 0.158$ 、 $r = -0.225$)。

VI. 考察

近年、複数の研究報告から乳癌を含む固形腫瘍の増殖、浸潤、転移には腫瘍を取り巻く微小環境が深く関与していることが明らかにされている^{18),19),34),35)}。乳癌組織において腫瘍間質は腫瘍細胞の増殖を促進する役割を担っているが、一方で正常の乳腺組織では間質は上皮細胞の極性を維持し、上皮細胞の増殖や **epithelial mesenchymal transformation** (上皮細胞が間質幹細胞のような未分化な性質を獲得し、浸潤、転移能を持つこと)を抑制している⁴¹⁾⁻⁴³⁾。乳癌においては、**Ostman** らの報告にあるように、間質での線維増生すなわち膠原線維や線維芽細胞の増生が高度な腫瘍ほど予後不良であることが報告されている⁴²⁾。腫瘍組織由来の線維芽細胞は **cancer-associated fibroblasts (CAFs)** と呼ばれ、腫瘍間質を構成する最大要素であり様々なケモカインや増殖因子、細胞外基質を産生することが知られており、これらの作用により腫瘍細胞は浸潤能や転移能を獲得するとされている⁴⁴⁾。CAFs は自身が産生する増殖因子による直接的な作用のほか、腫瘍間質を構成する他の要素に作用することで、間接的に腫瘍増殖を促進する。つまり、腫瘍組織において CAFs は **insulin like growth factor (IGF)-1**、**transforming growth factor (TGF)- β** 、**vascular endothelial growth factor (VEGF)**、**fibroblast growth factor (FGF)-2** などの増殖因子を産生し、腫瘍細胞や血管内皮細胞、リンパ球やマクロファージを含む炎症性細胞を活性化することが明らかにされている⁴⁵⁾⁻⁴⁸⁾。

Nestin は神経幹細胞のマーカーとして知られる中間径フィラメントであり、新生

血管や未分化な細胞に一時的に発現することが明らかにされている⁴⁹⁾。乳癌の他、複数の固形腫瘍では新生血管を被覆するペリサイトの有無を評価する為に、nestinの免疫組織化学が利用されているが⁴⁹⁾⁻⁵¹⁾、nestin陽性、すなわちペリサイトを有する新生血管は壁構造が強固であり、血漿タンパク質や酸素等の腫瘍増殖に不可欠な物質をより効率的に運搬できる^{26),52)}。

乳癌のILCとIDCにおいてnestinの発現を比較した報告は過去に1つしかない。Krügerらは、nestinとKi-67の二重染色を行うことでより正確な新生血管の評価が可能としており、結果、IDCで血管新生が亢進していたと報告したが、nestin陰性の血管を含めたMVDのデータは比較されていなかった⁵⁰⁾。

一方、vasohibin-1はVEGFによって誘導され血管内皮細胞に発現する血管新生抑制因子として、様々な固形腫瘍で血管新生のマーカーの1つとして知られている^{24),25)}。玉城らはIDCの血管内皮細胞において、細胞増殖マーカーであるKi-67標識率とCD31陽性血管、またvasohibin-1陽性血管の相関を比較し、Ki-67標識率がvasohibin-1とより強い正の相関をもつことを明らかにした。さらに血管新生の増殖活性を評価する尺度として血管内皮細胞におけるVPRが有用であることを示した²⁵⁾。またSamanehらは肺癌におけるnestin/vasohibin-1、nestin/CD31の二重染色による検討を行っており⁵¹⁾、これら2つの文献をふまえるとnestin/vasohibin-1陽性率がより幼弱な新生血管の成熟度を評価しうると考えられる。

本研究では、MVD は ILC で有意に高値であり、新生血管の nestin/vasohibin-1 positive ratio は ILC で低値であった。通常、血管内皮細胞は免疫組織化学的に CD31 陽性であり、その中に vasohibin-1 陰性/陽性血管が含まれるため nestin/CD31 陽性率は 1 以上にはならないものの、vasohibin-1 陰性の血管が豊富であれば nestin/vasohibin-1 比が 1 以上になりうる。また IDC では ILC より新生血管の vasohibin-1 positive ratio (VPR) が低値であるため、IDC では ILC よりも nestin/vasohibin-1 比が大きくなることも矛盾しない。

Nestin 陰性すなわちペリサイトに被覆されない新生血管は、脆弱で高い透過性をもつことから、ILC では腫瘍間質への酸素や血漿タンパク質の漏出が IDC より多いことが推察された。またペリサイトを欠く血管内皮細胞は遊走能を有するため、新生血管の形成が容易となる⁵²⁾。透過性が高い新生血管は、血漿中の酸素やタンパク質が腫瘍巣に到達する前に間質に漏出するため、腫瘍増殖に不可欠な酸素やタンパク質等の運搬の効率が低下する⁵²⁾が、間質増生を伴いびまん性に浸潤、増殖する発育形態をとる ILC には適した構造である可能性がある。

腫瘍間質と腫瘍細胞間には、前述のような腫瘍増殖因子やケモカインを介した相互作用があることが知られているが、中でも腫瘍の増殖や血管新生、転移能の獲得において IGF-1 を介した増殖シグナル伝達経路 (IGF-1 経路) は最も重要な増殖経路の一つである (図 9)。IGF-1 は正常乳腺組織においても重要な細胞周期促進因子であり、IGF-1 受容体に結合し IGF-1 経路、特に PI3K (the phosphatidylinositol

3-kinase)/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路を活性化し、細胞増殖促進やアポトーシス抑制を起こす⁵³⁾。この IGF-1 経路の中核を担う IGF-1、IGF-1 受容体は正常乳腺組織のみならず原発性乳癌の組織で発現が亢進していることが明らかにされている^{37)-39),45)}。

しかし乳癌の腫瘍間質に関するこれまでの報告は IDC を対象としたもの、もしくは intrinsic type (luminal like、HER2 タイプ、トリプルネガティブタイプ)毎の検討が大部分を占めており、ILC における CAFs の増生や血管新生に関しては明らかにされていない。乳癌細胞での免疫組織化学的検討や PCR アレイによる遺伝子解析では IGF-1、IGF-1 受容体は、IDC と比較して ILC で高度に発現していることが示されているが^{40),46)}、腫瘍間質において同様に比較検討を行った報告はない。腫瘍間質を用いて PCR アレイを行う際、laser captured microdissection (LCM)により腫瘍細胞を除く必要があるが、ILC では腫瘍細胞が個細胞状にびまん性に間質へ浸潤する為、LCM で腫瘍細胞を除くことは技術的に困難である。そこで本研究では、凍結検体の HE 標本における間質の占める面積が 70%以上の症例を用いて PCR アレイを行い、両者の血管新生因子の差異をスクリーニングした。更に免疫組織化学的手法で腫瘍間質における IGF-1、IGF-1 受容体発現を比較した。その結果 ILC では腫瘍間質、特に CAFs における IGF-1、IGF-1 受容体の発現、CAFs の増生が IDC と比較して高度であることが明らかになった。

腫瘍組織中の IGF-1 の発現は CAFs や腫瘍細胞の傍分泌、自己分泌のほか、肝細

胞など他臓器が産生する IGF-1 によっても影響を受けることが明らかにされているが^{47,48}、これらの分泌機構のいずれが腫瘍組織内の IGF-1 発現に最も影響するかは、十分に解明されていないのが現状である。Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group が、ER 陽性乳癌では、ホルモン療法施行中の血清 IGF-1 高濃度は独立した予後不良因子であると報告している一方で、Eppler や複数のグループによる免疫組織化学、PCR アレイを用いた検討では、IGF-1 高発現の腫瘍細胞は組織学的悪性度が低く、予後も良好であることが示されている^{39,40,53}。この相反する血清 IGF-1 濃度と乳腺組織内の IGF-1 濃度の関係を考える上で、Llanos らの報告は興味深い。Llanos らの報告では、乳房の減量手術を受けた健常女性の血清、乳腺組織内の IGF-1、IGFBP3 (IGF binding protein 3: IGF-1 と結合し、IGF-1 受容体への結合を阻害する)濃度を測定したところ、血清と乳腺組織内の濃度に相関は見られなかった⁵²。また Tollefsen らは IGF-1 経路を介して腫瘍増殖、アポトーシス抑制が起こる過程では、下流に存在する insulin-receptor substrate (IRS)、AKT 等の活性化、すなわちリン酸化が不可欠であり、腫瘍組織内での IGF-1 経路の活性化の指標として、IRS や AKT のリン酸化を評価すべきであるとしている⁵⁵。実際に Law らは腫瘍細胞内で、活性化 IGF-1 受容体/インスリン受容体複合体や下流遺伝子転写産物の増加が見られた症例では、予後不良であったと報告している⁵⁶。

本研究での PCR アレイの結果、ILC では IGF-1、VEGF-C の発現が高かった。また IGF-1 は血管内皮細胞からの VEGF 産生を誘導し血管新生を促すが、この環境下では血管内皮細胞は vasohibin-1 を発現する^{24,25}ことが明らかにされている。これ

らをふまえると、ILC では IGF-1/VEGF 経路のネガティブフィードバック機構が働き、血管内皮細胞の vasohibin-1 発現が促される可能性が考えられた。

以上のことから、ILC と IDC の腫瘍組織において IGF-1 経路の活性化を比較する上で、活性化 IGF-1 受容体/インスリン受容体複合体や下流遺伝子転写産物の発現を比較することが必要と考えられた。また正常乳腺組織と乳癌組織、特に ILC では新生血管の構造が異なると考えられ、血清中の IGF-1 が腫瘍間質の IGF-1 発現に影響を及ぼす可能性を十分考慮しなければならない。

近年、IGF-1 を介した PI3K/AKT/mTOR 経路は分子標的治療のターゲットとして注目されており、複数の薬剤の臨床応用または治験が進行中である^{57),58)}。IGF-1 受容体阻害剤 (RTKIs)である figitumumab、cixutumumab は乳癌では現在第 I ~ II 相試験が進行中だが、他の複数の腫瘍では抗腫瘍効果が確認されている。また IGF-1 経路とエストロゲンによる増殖因子シグナル伝達経路 (エストロゲン経路)には相互作用があることが明らかにされており、抗エストロゲン剤と PI3K/AKT/mTOR 経路阻害剤の併用療法は単剤よりも良好な抗腫瘍効果が得られるとしている^{48),59),60)}。我々の研究結果からは、抗エストロゲン剤と PI3K/AKT/mTOR 経路阻害剤の併用療法は ILC の患者群で、より効果を得られる可能性が考えられた。

本研究は、乳癌の ILC と IDC における腫瘍の微小環境、すなわち腫瘍間質での CAFs 増生、血管新生を比較検討した初めての報告である。ILC では CAFs の増生が高度であり、腫瘍細胞や腫瘍間質における IGF-1、IGF-1 受容体の発現は、IDC と比較して有意に上昇していた。さらに ILC で観察される新生血管はペリサイトに被覆

されない血管すなわち、透過性が高く脆弱な血管に富むと推察されたが、ILCにおいて脆弱な新生血管が増生することの意義を検証する為には、さらなる研究を要する。本研究の結果をふまえると、IGF-1 受容体を介した PI3K/AKT/mTOR 経路を阻害することで、ILC ではより高度の血管新生抑制効果、抗腫瘍効果が得られることが示唆された。本研究では術後の観察期間が短く（中央値 ILC: 48 ヶ月、IDC: 38 ヶ月）、転移再発や原病死等のイベントが少ない為に、ILC と IDC の予後に有意差を認めなかった。また CAFs 増生と IGF-1 発現を免疫組織化学的に比較する際、対象症例をリンパ節転移がない T1 症例に限定したため、N 因子や T 因子等の病理組織学的因子と CAFs 増生、IGF-1 発現の相関を検討するに至らなかった。今後のさらなる症例数、観察期間の追加により、ILC での予後予測因子を見いだすことが可能となるかもしれない。

VII. 結論

本研究は、乳癌 ILC と IDC の腫瘍間質において CAFs の増生、血管新生に相違があることを初めて明らかにした。ILC では腫瘍細胞、CAFs、血管内皮細胞における IGF-1、IGF-1 受容体の発現が高度であり、IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 経路による腫瘍や CAFs の増殖、血管新生が促進されている可能性がある。また ILC はペリサイトを欠いた脆弱な血管に富むことが示唆された。本研究の結果からは、ILC では IGF-1 受容体阻害剤や PI3K/AKT/mTOR 阻害剤は IDC より有効である可能性が示された。

VIII. 文献

1. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, et al: The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). *Cancer* 1975;36(1):1-85
2. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, et al: Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004;6(3):149-56
3. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, et al: Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1996;77(1):113-20
4. Wellings SR, Jensen HM: An atlas of sub gross pathology of human breast with special reference to possible cancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:231-273
5. Ohuchi N, Abe R, Kasai M: Possible cancerous change of intraductal papillomas of the breast: a 3-D reconstruction of 25 cases. *Cancer* 1984;54:605-611
6. Katz A, Saad ED, Porter P, et al: Primary systemic chemotherapy of invasive lobular carcinoma of the breast. *Lancet Oncol* 2007;8:55-62

7. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74
8. Korhonen T, Kuukasjärvi T, Huhtala H, et al: The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. *Breast* 2013;22:1119-1124
9. Nabil Wasif, Melinda AM, Ko CY, et al: Invasive Lobular vs. Ductal Breast Cancer: A Stage-Matched Comparison of Outcomes. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1862-1869
10. Bertucci F, Orsetti B, Nègre V, et al: Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene* 2008; 11;27(40):5359-72
11. Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, et al: Differentiation of Lobular versus Ductal Breast Carcinomas by Expression Microarray Analysis *Cancer Res* 2003;63:7167-75
12. Cleton-Jansen AM: E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast Cancer Res* 2002;4:5-8.
13. Mersin H, Yildirim E, Gulben K, et al: Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? *Eur J Surg Oncol*

2003;29:390-395

14. W. Truin, G. Vugts, Roumen RMH, et al: Differences in Response and Surgical Management with Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Lobular Versus Ductal Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015
15. Coradini D, Pellizzaro C, Veneroni S, et al: Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Br J Cancer* 2002;87(10):1105-11
16. Le Gal M, Ollivier L, Asselain B, et al: Mammographic features of 455 invasive lobular carcinomas. *Radiology* 1992;185:705-8
17. Turashvili G, Bouchal G, Baumforth K, et al: Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* 2007;7:55
18. Yan M, Keller ET, Garfield DH, et al: Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013;32:303-315
19. Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6(5):392-401
20. Lips EH, Rodenhuis S, Hwang ES, et al: Lobular histology and response to neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancer. *Breast*

Cancer Res Treat 2012;136(1):35-43

21. Miyashita M, Sasano H, Ohuchi N, et al: Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat 2014;148(3):525-534
22. Ali HR, Pharoah PDP, Caldas C, et al: Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12439 patients. Ann Oncol 2014;25:1536-1543
23. Uzzan B, Cucherat M, Perret GY, et al: Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. Cancer Res 2004;64:2941-2955
24. Sato Y: The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. J. Biochem 2013;153(1):5-11
25. Tamaki K, Moriya T, Sasano H, et al: Vasohibin-1 in human breast carcinoma: A potential negative feedback regulator of angiogenesis. Cancer Sci 2009;100(1):88-94
26. Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T: Nestin: A novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. World J Gastroenterol 2013;19(1):42-48
27. Liu C, Xu H, Lu P, et al: Clinical implications for nestin protein

- expression in breast cancer. *Cancer Sci* 2010;10:815-9
28. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AC, et al: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol: official journal of the European Society for Medical Oncology/ ESMO* 2013;24(9):2206-23
 29. Sobin LH, Wittekind C: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th, Wiley, 2011; pp131-41
 30. Rakha EA, El-Sayed ME, Ellis IO, et al: Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111(1):121-127
 31. Hammond MEH, Hayes DH, Wolff AC, et al: College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28(16):2784-95
 32. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al: College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;25(1):118-45

33. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al: Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8
34. Vered M, Dobriyan A, Taicher S, et al: Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci* 2010;101:274-280
35. Cheng Y, Wang K, Yu J, et al: Cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma after surgery. *Int J Exp Med* 2015;8(2):1896-1903
36. Li ZJ, Ying XJ, Zhou SZ, et al: Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013;19(43):7788-7794
37. Pilichowska M, Kimura N, Nagura H, et al: Immunohistochemical study of TGF- α , TGF- β 1, EGFR, and IGF-1 expression in human breast carcinoma. *Mod Pathol* 1997;10(10):969-75
38. Aaltonen KE, Rosendahl AH, Olsson H, et al: Association between insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) negativity and poor prognosis in a cohort of women with primary breast cancer. *BMC Cancer* 2014;14:794

39. Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M: The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer* 2015;14:43
40. Eppler E, Zapf J, Bailer N, et al: IGF-1 in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-1 content. *Eur J of Endocrinopathy* 2002;146(6):813-821
41. Hu M, Yao J, Polyak K, et al: Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 2008;13(5):394-406
42. Ostman A, Augsten M: Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19(1):67-73
43. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al: Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121(3):335-348
44. Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, et al: Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 2006;116(7):1955-1962
45. Law JH, Habibi G, Hu K, et al: Phosphorylated insulin-like growth factor-1/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is

- related to poor survival. *Cancer Res* 2008;68:10238-46
46. Desmedt C, Gudem G, Zoppoli G, et al: Characterization and clinical relevance of the genomic alterations defining lobular breast cancer. *SABCS 2014*; S2-05
 47. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group: Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol* 2010;11:530-42
 48. Kaaks R, Riboli E, Lukanova A, et al: Insulin-like growth factor I and risk of breast cancer by age and hormone receptor status-A prospective study within the EPIC cohort. *Int J Cancer* 2014;134(11):2683-90
 49. Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, et al: The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* 2011;8:8
 50. Krüger K, Stefansson IM, Collett K, et al: Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. *Breast* 2013;22:282-288
 51. Yazdani S, Miki Y, Sasano H, et al: Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Human*

Pathol 2013;44:1586-1596

52. Raza A: Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol* 2010;85:593-598
53. Chong Kelvin YM, Surbramanian A, Mokebl K, et al: The Prognostic Significance of the Insulin-Like Growth Factor-1 Ligand and Receptor Expression in Breast Cancer Tissue. *J Surg Oncol* 2011;104:228-235
54. Llanos AA, Brasky TM, Dumitrescu RG, et al: Plasma IGF-1 and IGFBP-3 may be imprecise surrogates for breast concentrations: an analysis of healthy women. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:571-9
55. Tollefsen SE, Stoszek RM, Thompson K: Interaction of the alpha-beta dimers of the insulin-like growth factor I receptor is required for receptor autophosphorylation. *Biochem* 1991;30:48-54
56. Law JH, Habibi G, Hu K, et al: Phosphorylated insulin-like growth factor-1/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res* 2008;68:10238-46
57. LoPiccolo J, Blumenthal BM, Bernstein WB, et al: Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008;11:32-50

58. Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR: Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2013;39:313-320
59. Chong YM, Colston K, Jiang WG, et al: The relationship between the insulin-like growth factor-1 system and the oestrogen metabolising enzymes in breast cancer tissue and its adjacent non-cancerous tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2006;99:275-288
60. Eva Maria Ciruelos Gil: Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2014;40:862-871

IX. 表と図

図 1. 浸潤性小葉癌、浸潤性乳管癌の発生母地は乳腺組織の末梢で、乳管と小葉の間に存在する terminal duct lobular unit (TDLU)である (文献 5 を改変)。

図 2. 浸潤性小葉癌 (ILC)と浸潤性乳管癌 (IDC)の組織学的特徴

左 : ILC (x100) 右 : IDC (x100)

ILC は、結合性が低下した比較的小型の腫瘍細胞が、個細胞性あるいは索状構造をとりながら、びまん性に浸潤する。IDC の様な充実胞巣や、腺管構造はみられない。

表 1. Treatment oriented classification of sub-groups of breast cancer

2015 年の St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer にて提唱されたサブタイプ分類。2011 年、2013 年の会議で提唱された intrinsic type を継いでホルモン受容体、HER2 受容体の発現状況、Ki-67 標識率をもとに、治療法に基づいた分類となっている。

表 2-1. 全症例の患者背景と病理組織学的特徴

Ki-67 の閾値を St. Gallen 2011 での定義をもとに 14%とした。

対象症例は全例女性であった。ILC と IDC で年齢、閉経状況には有意差はみられなかった。ILC では腫瘍径が有意に大きく ($p < 0.0001$)、T 因子 ($p < 0.0001$)、Stage ($p < 0.0001$)に反映されていた。脈管侵襲 (ly: $p = 0.0713$ 、v: $p = 0.5443$)や N 因子 ($p = 0.5229$)に有意差はみられなかった。増殖マーカーである Ki-67 標識率は IDC で有意に高値であった ($p = 0.0185$)。

表 2-2. 免疫組織化学 (nestin、CD34、 α SMA、IGF-1、IGF-1R)の対象症例：

患者背景、病理組織学的特徴

全症例のうち、リンパ節転移のない腫瘍径 2cm 未満の症例を ILC と IDC それぞれからランダムに 40 例ずつ選定した。腫瘍径、核グレードに有意差を認めた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

N.S. = not significant、SD: standard deviation

表 3. 免疫組織化学：抗体、抗原賦活処理法、希釈法

図 3. Microvessel density

ILC (上段)、IDC (下段)における HE 標本(A、D)、CD31 (B、E)、vasohibin-1 (C、F)免疫染色標本写真 (x100)。

B、E: CD31 陽性血管内皮細胞は茶色に染色される (赤矢印)。

C、F: vasohibin-1 陽性血管内皮細胞は茶色に染色される (黒矢印)。

CD31 は径が大きな成熟した血管の内皮細胞にも陽性となるが、vasohibin-1 は主に径が小さい血管内皮細胞に陽性となる傾向を認めた。

表 4. ILC と IDC における MVD と vasohibin-1 陽性率

2 群間における MVD、VPR の値を示す。MVD、VPR の値はいずれも ILC で有意に高値であった。

(Fisher's exact test、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。)

VPR : Vasohibin-1 positive ratio (Vasohibin-1/ CD31)

図 4. nestin, vasohibin-1 の二重染色 (x100)

A: ILC の HE 画像、 B : nestin/vasohibin-1 二重染色

B: nestin は血管内皮細胞に青く染まり、vasohibin-1 は血管内皮細胞に茶色に染ま

る。nestin 陽性血管数/vasohibin-1 または CD31 陽性血管数を nestin positive ratio とした。

表 5. Nestin 陽性率

CD31 陽性血管数、vasohibin-1 陽性血管数に対する nestin 陽性率を示す(平均値±標準誤差)。(Fisher's exact test、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。)

VASH1: vasohibin-1

図 5. 腫瘍間質における CAFs 増生

CAFs 増生を 5 段階で評価した。ILC、IDC で線維増生が目立つ標本の HE 標本、 α SMA の代表的な写真を示す (x100)。ILC、IDC のほぼ全ての症例で CD34 は血管内皮細胞に陽性であったが、間質には陰性であった。

A: ILC の 1 例 (HE)

B: CAFs score 3 (A の症例)

C: CAFs score 2

D: IDC の 1 例 (HE)

E: CAFs score 1 (D の症例)

F: CAFs score 0.5

表 6. 腫瘍間質における CAFs 増生

ほぼ全例で CD34 は血管内皮に陽性、間質には陰性であった。CAFs score 0-1 を CAFs low density group、CAF score 2-3 を CAFs high density group とした。

CAFs high density group の割合の検討では、ILC で有意に高値であった (Mann-Whitney U test: ILC 70% vs IDC 37%、 $p = 0.0087$)。

図 6. 血管新生に関与する遺伝子群の PCR アレイ解析

Luminal A like ILC 3 例と luminal A like IDC 3 例の解析では、CCL11、IGF-1 の発現が ILC で高かった。

表 7. ILC で発現が高かった遺伝子

2 群間の比較で有意差を認めたのは CCL11 のみであったが、IGF-1、TEK、VEGF-C も ILC で発現が高い傾向を認めた。

(Student's t-test、 $p < 0.05$ を有意差あり。)

CCL11: chemokine ligand 11、IGF-1: insulin like growth factor -1

TEK: TEK tyrosine kinase、VEGF: vascular endothelial growth factor

図 7. IGF-1,IGF-1R の免疫組織化学的検討

IGF-1 の染色強度を 4 段階で評価した (score0-3)。IGF-1 は腫瘍細胞 (赤矢印)、CAFs (黒矢印頭)、血管内皮細胞 (黒矢印)の細胞質に陽性となった。IGF-1R は腫瘍細胞、間質細胞の膜、細胞質に陽性となった。(x100)

A: ILC の 1 例 (HE)

B: IGF-1 score 3

C: IGF-1R score 3

D: IDC の 1 例 (HE)

E: IGF-1 score 0

F: IGF-1R score 0

図 8. 免疫組織化学的手法による IGF-1、IGF-1R の比較

IGF-1、IGF-1R とともに各陽性症例における陽性細胞の割合は 70-99%であった。そのため、ILC と IDC の 2 群間の比較には染色強度を用いた。また腫瘍細胞と間質の染色態度は同様の結果であった。解析は χ^2 検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

図 9. IGF-1 経路を介した腫瘍細胞と腫瘍間質の相互作用

CAFs が産生する IGF-1 により、腫瘍細胞の増殖、血管内皮細胞の増殖が促進される (傍分泌作用)。腫瘍細胞、CAFs は IGF-1 の自己分泌によっても増殖を促す。また血管内皮細胞では、IGF-1 を介して VEGF による血管新生が亢進し、negative feedback として vasohibin-1 を発現する。

図 10. 腫瘍組織における IGF-1 経路とエストロゲン経路の相互作用

乳癌の腫瘍細胞内では、エストロゲンによる腫瘍増殖経路（エストロゲン経路）と IGF-1 経路の相互作用の存在が明らかにされている。IGF-1 を介した PI3K/AKT/mTOR 経路、RAS/MAPKs 経路とエストロゲン経路、アロマターゼによるエストロゲン合成は乳癌細胞の増殖、アポトーシス抑制を促す。

図 11. PI3K/AKT/mTOR 経路における分子標的治療薬とホルモン剤の作用部位

乳癌の腫瘍増殖においてエストロゲン経路と IGF-1 経路の相互作用は重要である。現在、抗エストロゲン剤と PI3K/AKT/mTOR 阻害剤（分子標的治療薬）併用療法の臨床試験が複数進行中である。

図 1. 乳腺 Terminal Duct Lobular Unit : TDLU の模式図

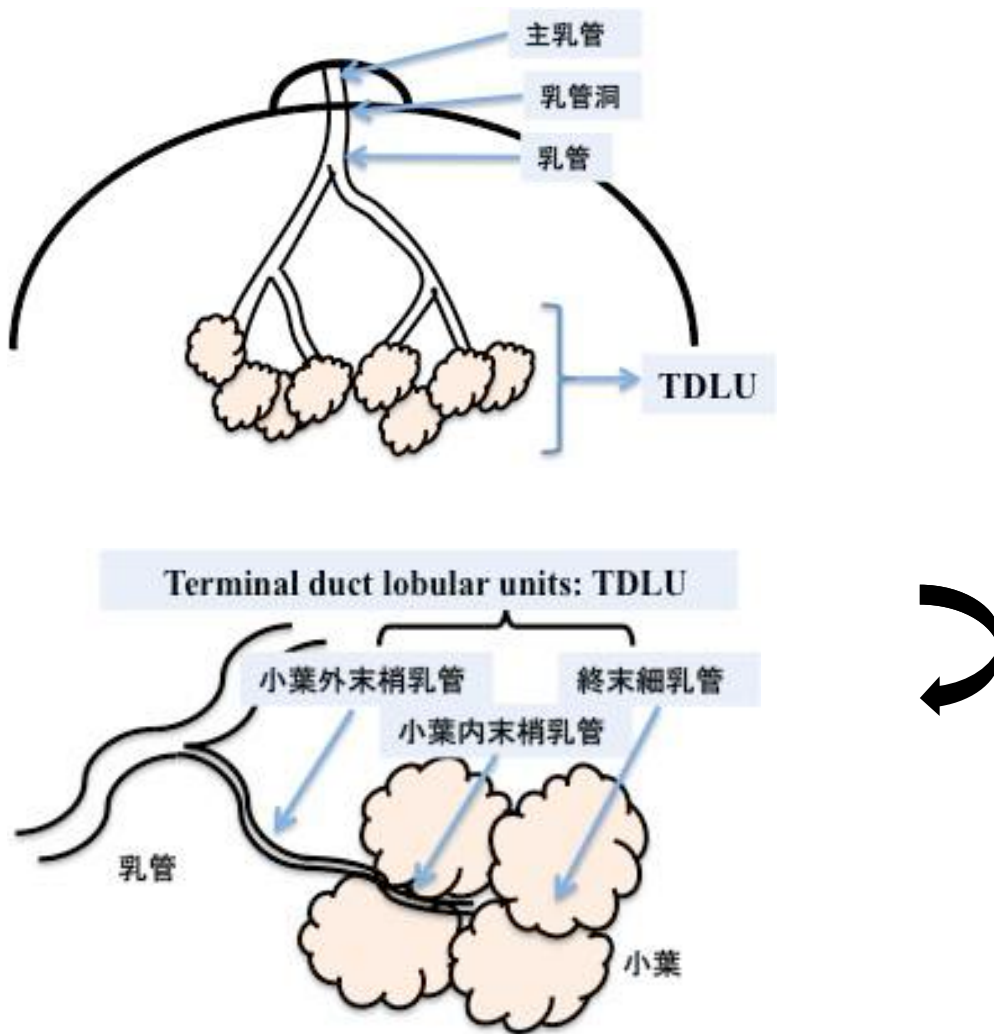


図 1. 浸潤性小葉癌、浸潤性乳管癌の発生母地は乳腺組織の末梢で、乳管と小葉の間に存在する terminal duct lobular unit (TDLU)である。(文献 5 を改変)

図 2. 浸潤性小葉癌 (Invasive lobular carcinoma: ILC)と浸潤性乳管癌 (Invasive ductal carcinoma: IDC)の組織学的特徴

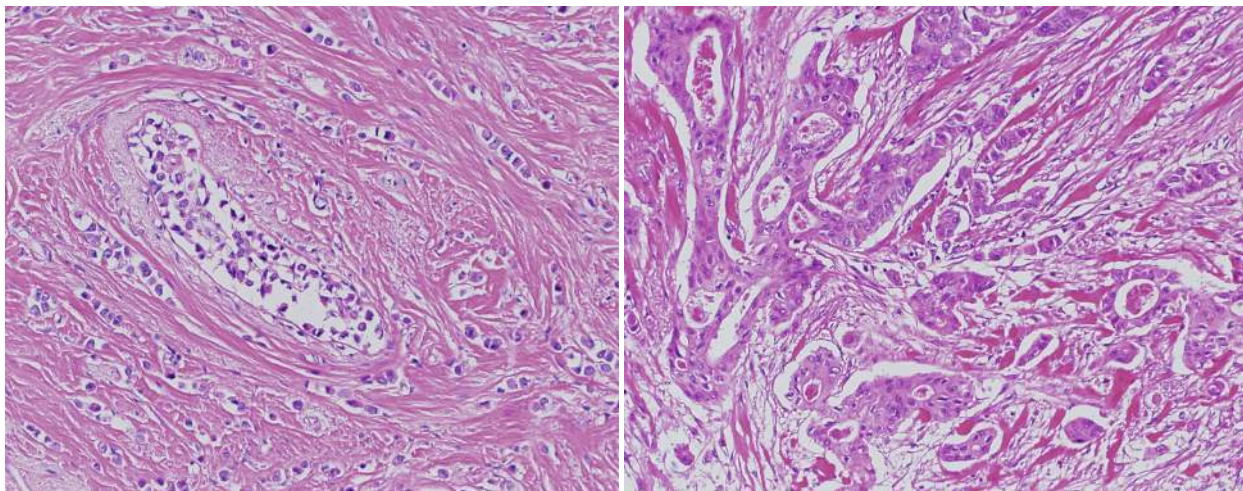


図 2.

左：浸潤性小葉癌 (x100)

右：浸潤性乳管癌 (x100)

ILC では結合性が低下した比較的小型の腫瘍細胞が個細胞性あるいは索状構造をとって、びまん性に浸潤する。IDC の様な充実胞巣や、腺管構造はみられない。

表 1. 治療に基づいた乳癌のサブタイプ分類

(St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer)

サブタイプ		薬物療法
トリプルネガティブ (ホルモン受容体陰性 HER2 陰性)		化学療法
HER2 タイプ	ホルモン受容体陰性かつ HER2 陽性	化学療法＋ 抗 HER2 療法
	ホルモン受容体陽性かつ HER2 陽性	
ホルモン受容体陽性 (エストロゲン受容体陽性かつ/またはプロゲステロン受容体陽性) かつ HER2 陰性 = luminal disease as a spectrum (luminal like)		
	ホルモン受容体強陽性、Ki-67 標識率低値、低リスク群 high receptor, low proliferation, low tumor burden = luminal A like	内分泌療法
	中間リスク群	内分泌療法＋ 化学療法
	ホルモン受容体弱陽性、Ki-67 標識率高値、高リスク群 low receptor, high proliferation, high tumor burden = luminal B like	

表 1. ホルモン受容体、HER2 (human epidermal growth factor receptor-2)の発現状況、Ki-67 標識率をもとに、4つのサブタイプに分類。治療法に基づいた分類を行う。本研究では Ki-67 標識率<14%を luminal A like、≥14%を luminal B like と分類する。ホルモン受容体=エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor: PR)。

表 2-1. 患者背景と病理組織学的特徴

	Luminal like ILC	Luminal like IDC	<i>p</i> -value
n	145	121	
年齢 [中央値 (範囲)]	56.5 (27-91)	55 (31-83)	0.3717
閉経前(%)	56 (39)	58 (48)	
閉経後(%)	89 (61)	63 (52)	0.1385
腫瘍径 [平均値±SD(mm)]	20.1±12.4 (2-49)	13.0±6.9 (1-48)	<0.0001
T1 (%)	82 (56)	99 (82)	
T2 (%)	63 (44)	22 (18)	<0.0001
N - (%)	109 (75)	96 (79)	
N + (%)	36 (25)	25 (21)	0.5229
Stage I(%)	77 (53)	88 (73)	
Stage II(%)	68 (47)	33 (23)	<0.0001
ly - (%)	96 (66)	67 (55)	
ly + (%)	49 (34)	54 (45)	0.0713
v - (%)	103 (71)	90 (62)	
v + (%)	42 (29)	31 (38)	0.5443
核グレード 1 (%)	93 (64)	101 (83)	
核グレード 2 (%)	52 (36)	20 (17)	0.0003*
Ki-67 標識率 (中央値±SD)	6.4±9.6	10.3±10.7	0.0185*
Luminal A like (%)	120 (81)	92 (76)	
Luminal B like (%)	25 (19)	29 (24)	

表 2. Ki-67 の閾値を St. Gallen 2011 での定義をもとに 14%とした。Ki-67 標識率 14%未満を luminal A like、14%以上を luminal B like に分類した。

対象症例は全例女性であった。ILC と IDC で年齢、閉経状況には有意差はみられなかった。ILC では腫瘍径が有意に大きく ($p < 0.0001$)、T 因子 ($p < 0.0001$)、Stage ($p < 0.0001$)反映されていた。リンパ管侵襲 ($p = 0.0713$)、静脈侵襲($p = 0.5443$)や N 因子 ($p = 0.5229$)に有意差はみられなかった。増殖マーカーである Ki-67 標識率は IDC で有意に高値であった ($p = 0.0185$)。

(SD: standard deviation)

表 2-2. 免疫組織化学 (nestin、CD34、 α SMA、IGF-1、IGF-1R)の対象症例の患者背景、病理組織学的特徴

	Luminal like ILC	Luminal like IDC	<i>p</i> -value
n	40	40	
年齢 [中央値 (範囲)]	56 (27-89)	53 (37-81)	N.S.
閉経前(%)	18 (45)	26 (65)	N.S.
閉経後(%)	22 (55)	14 (35)	
腫瘍径 [平均値±SD(mm)]	18.8±7.6 (10-19)	12.2±6.3 (4-19)	0.0123*
ly - (%)	28 (70)	30 (75)	N.S.
ly + (%)	12 (30)	10 (25)	
v - (%)	31 (78)	34 (85)	N.S.
v + (%)	9 (22)	6 (15)	
核グレード 1 (%)	18 (45)	34 (85)	0.0091*
核グレード 2 (%)	22 (55)	6 (15)	
Ki-67 標識率 (中央値±SD)	9.3±9.6	10.5±7.2	N.S.
Luminal A like (%)	33 (81)	32 (80)	
Luminal B like (%)	7 (19)	8 (20)	

表 2-2. 全症例のうち、リンパ節転移のない腫瘍径 2cm 未満の症例を ILC と IDC それぞれからランダムに 40 例ずつ選定した。腫瘍径 ($p = 0.0123$)、核グレード ($p = 0.0091$)に有意差を認めた。脈管侵襲には有意差を認めなかった。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

N.S. = not significant、SD: standard deviation

表 3. 免疫組織化学：抗体、抗原賦活処理法、希釈法

	動物種/(クローン名)	入手先	抗原賦活処理	希釈倍率
CD31	マウス、モノクローナル抗体 (JC70A)	Dako	AC/ クエン酸	40
Vasohibin-1	マウス、モノクローナル抗体 (VC1 4E12)	*	AC/ EDTA	400
CD34	マウス、モノクローナル抗体 (NU-4A1)	Nichirei Bioscience	処理なし	200
αSMA	マウス、モノクローナル抗体 (1A4)	Dako	Trypsin 処理	20
Nestin	ウサギ、ポリクローナル抗体	Dako	AC/ クエン酸	8000
IGF-1	ウサギ、ポリクローナル抗体	Abcam	AC/ クエン酸	100
IGF-1R	ウサギ、ポリクローナル抗体	CellSignaling	MW/ クエン酸	1000

表 3.

*: Vasohibin-1 は加齢医学研究所 腫瘍循環研究分野 佐藤靖史教授より御提供頂いた。

AC: オートクレーブ、121°C、5分

MW: マイクロウェーブ、15分

クエン酸: 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0 or pH9.0)

トリプシン処理: 塩化カルシウム 100mg + トリプシン 100mg + トリス緩衝液 100ml、37°C、30分

図 3. Microvessel density

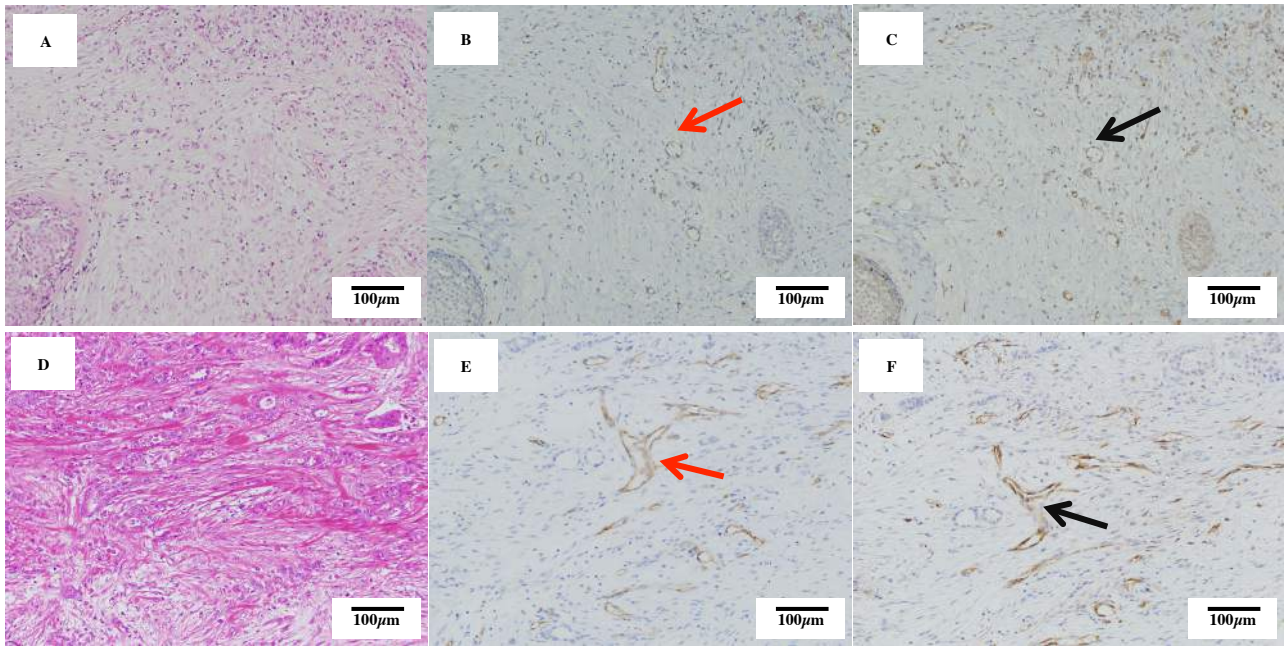


図 3. ILC (上段)、IDC (下段)における HE (A、D)、CD31 (B、E)、vasohibin-1 (C、F)免疫染色標本写真 (x100)。

B、E: CD31 陽性血管は茶色に染色される (赤矢印)。

C、F: vasohibin-1 陽性血管は茶色に染色される (黒矢印)。

CD31 は径が大きな成熟した血管の内皮細胞にも陽性となるが、vasohibin-1 は主に径が小さい血管内皮細胞に陽性となる傾向を認めた。

表 4. ILC と IDC における MVD と vasohibin-1 陽性率

	ILC	IDC	<i>p</i> -value
CD31 陽性血管数	28.56±1.09	24.56±1.10	0.0109*
Vasohibin-1 陽性血管数	14.81±0.73	11.28±0.72	<0.0001
VPR	0.53±0.02	0.47±0.01	0.0266*

表 4. 2 群間における MVD、VPR を示す。MVD、VPR とも ILC で有意に高値であった。
Fisher's exact test を用いて検討を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

VPR : Vasohibin-1 positive ratio (Vasohibin-1/ CD31)

図 4. nestin、vasohibin-1 の二重染色

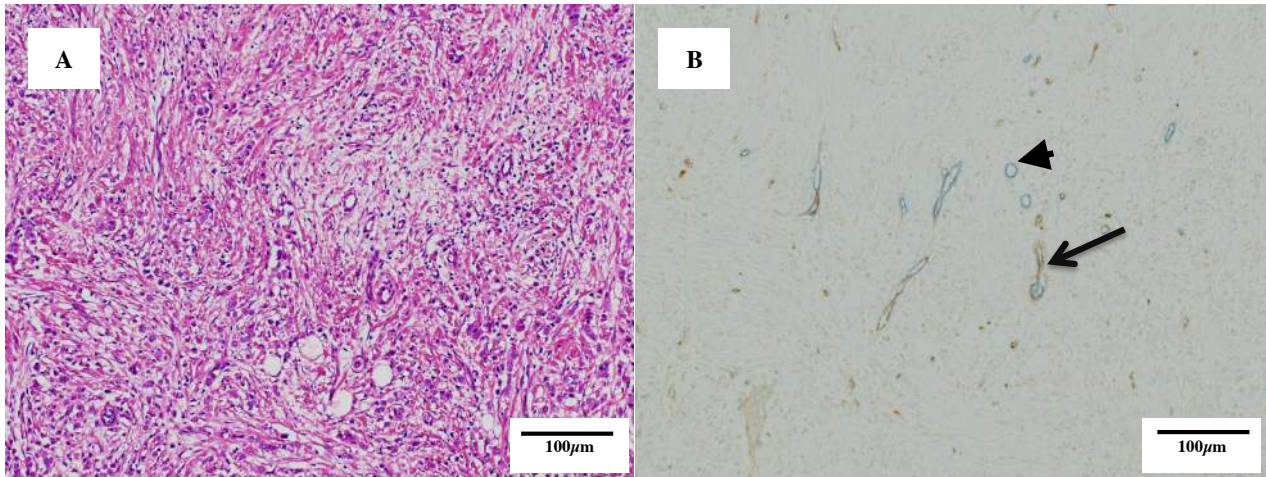


図 4. A: ILC の HE 画像、 B : nestin/vasohibin-1 二重染色

B では nestin は血管内皮細胞に茶色に染まり、vasohibin-1 は血管内皮細胞に青く染色される。

nestin 陽性血管数/vasohibin-1 陽性血管数、または CD31 陽性血管数を nestin positive ratio とした。

表 5. nestin/CD31、nestin/vasohibin-1 二重染色による nestin 陽性率

	ILC	IDC	<i>p</i> -value
nestin 陽性血管数	12.61±2.01	16.23±2.01	N.S
nestin/CD31 ratio	0.37±0.08	0.61±0.07	0.0511
nestin/vasohibin-1 ratio	0.84±0.45	2.11±0.39	0.0437*

表 5. CD31 陽性血管数、vasohibin-1 陽性血管数に対する nestin 陽性率を示す。
(平均値±標準誤差)。(Fisher's exact test、 $p < 0.05$ を有意差ありとした)

図 5. CAFs 増生

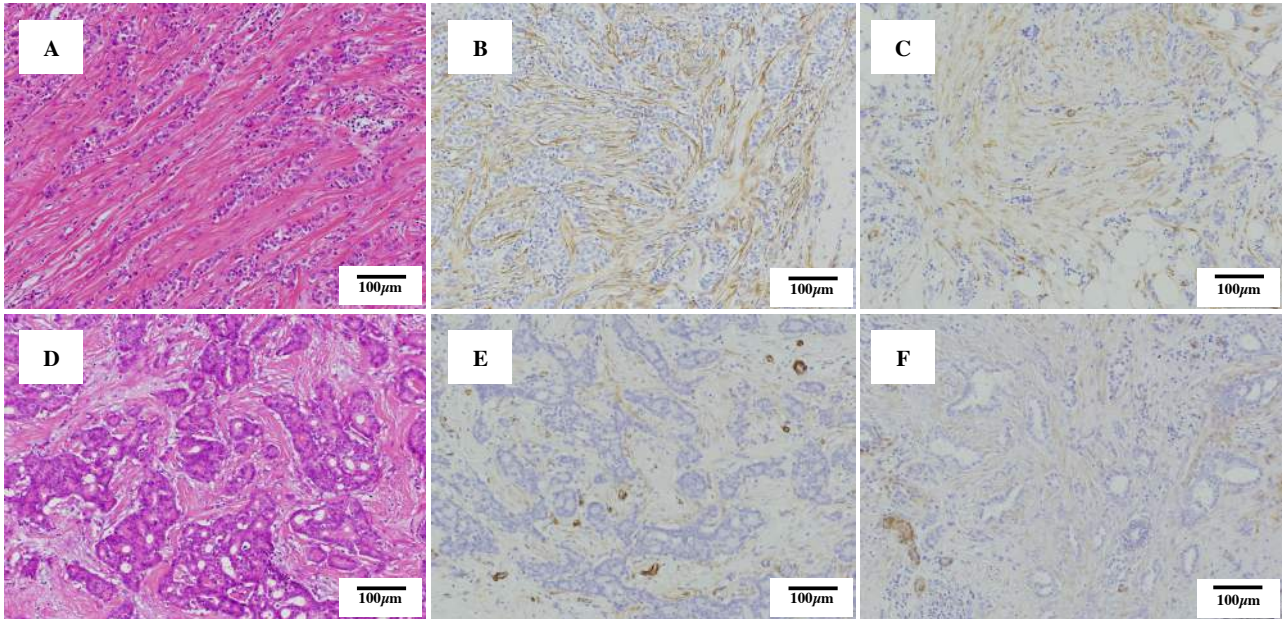


図 5. CAFs 増生を 5 段階で評価した。ILC、IDC で線維増生が高度な標本の HE 標本、 α SMA の代表的な写真を示す (x100)。ILC、IDC のほぼ全ての症例で CD34 は血管内皮に陽性であったが、間質には陰性であった。

A: ILC の 1 例 (HE)

B: CAFs score 3 (A の症例)

C: CAFs score 2

D: IDC の 1 例 (HE)

E: CAFs score 1 (D の症例)

F: CAFs score 0.5

表 6. 腫瘍間質における CAFs 増生

CD34		陰性			
αSMA	陰性～弱陽性	強陽性		高スコア群(%)	p-value
	低スコア群	高スコア群			
CAFs スコア	0、0.5、1	2	3		
ILC n=40 (%)	12 (30)	4 (10)	24 (60)	70%	0.0087
IDC n=40 (%)	24 (63)	8 (22)	6 (15)	37%	

表 6. ほぼ全例で CD34 は血管内皮に陽性、間質では陰性であった。

CAFs スコア 0-1 を CAFs 低スコア群、 CAFs スコア 2、3 を CAFs 高スコア群とした。

CAFs 高スコア群の割合は ILC で有意に高値であった (70% vs 37%、 $p = 0.0087$)。

(Mann-Whitney U 検定)

図 6. PCR アレイ解析の Scatter plot

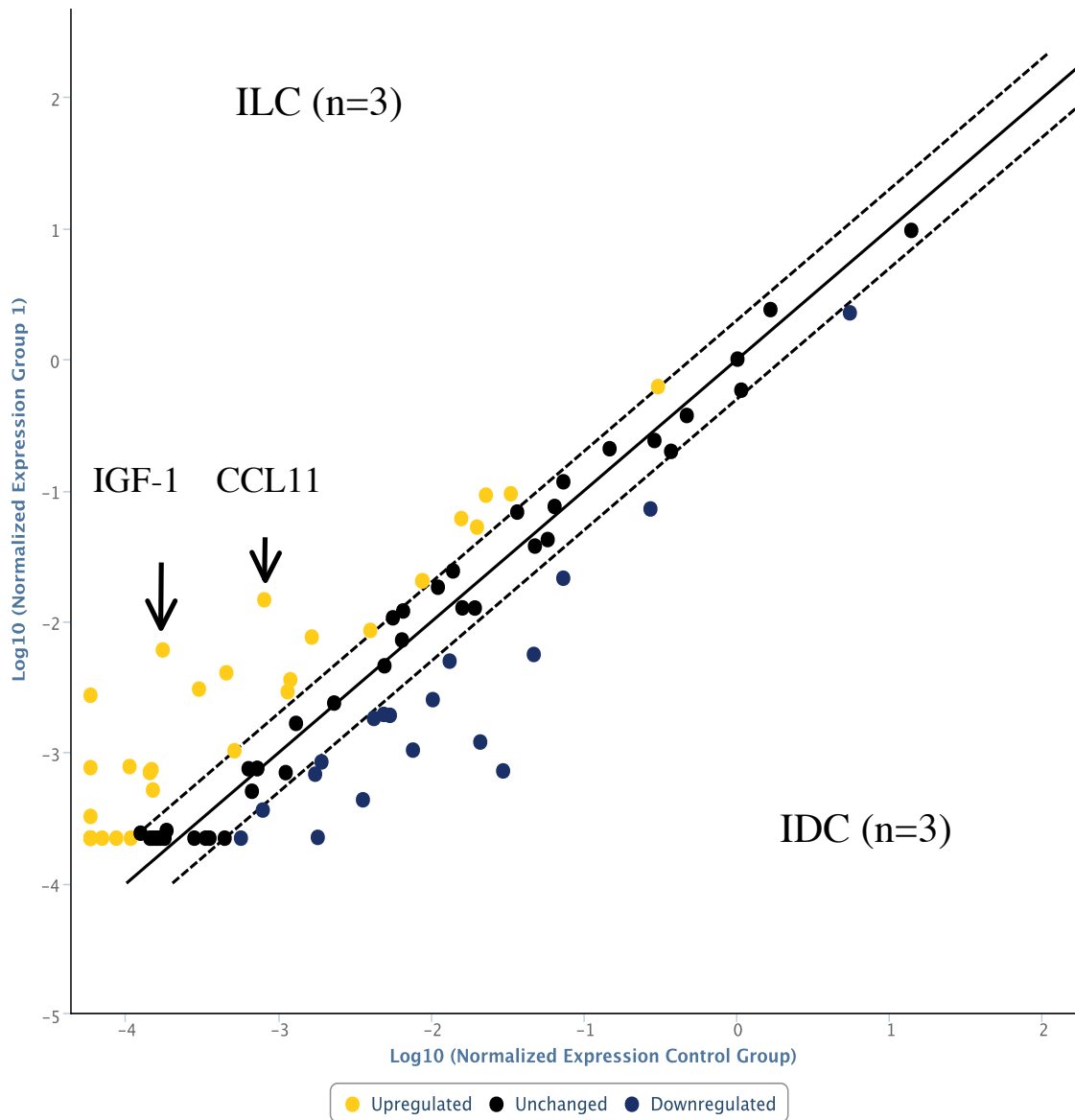


図 6. 血管新生に関与する遺伝子群の PCR アレイ解析

Luminal A like ILC 3 例と luminal A like IDC 3 例の解析では、CCL11、IGF-1 の発現が ILC で高かった (表 7 参照)。

表 7. ILC で発現が高い遺伝子

Gene symbol	Fold change	<i>p</i> -value
CCL11	18.24	0.020
IGF-1	34.87	0.134
TEK	46.81	0.114
VEGF-A	1.05	0.620
VEGF-C	4.07	0.172

表 7. 2 群間の比較で有意差を認めたのは CCL11 のみであったが、IGF-1、TEK、VEGF-C も ILC で発現が高い傾向を認めた。(Student's t-test、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。)

CCL11: chemokine ligand 11

IGF-1: insulin like growth factor -1

TEK: TEK tyrosine kinase

VEGF: vascular endothelial growth factor

図 7. IGF-1、IGF-1R の免疫組織化学的検討

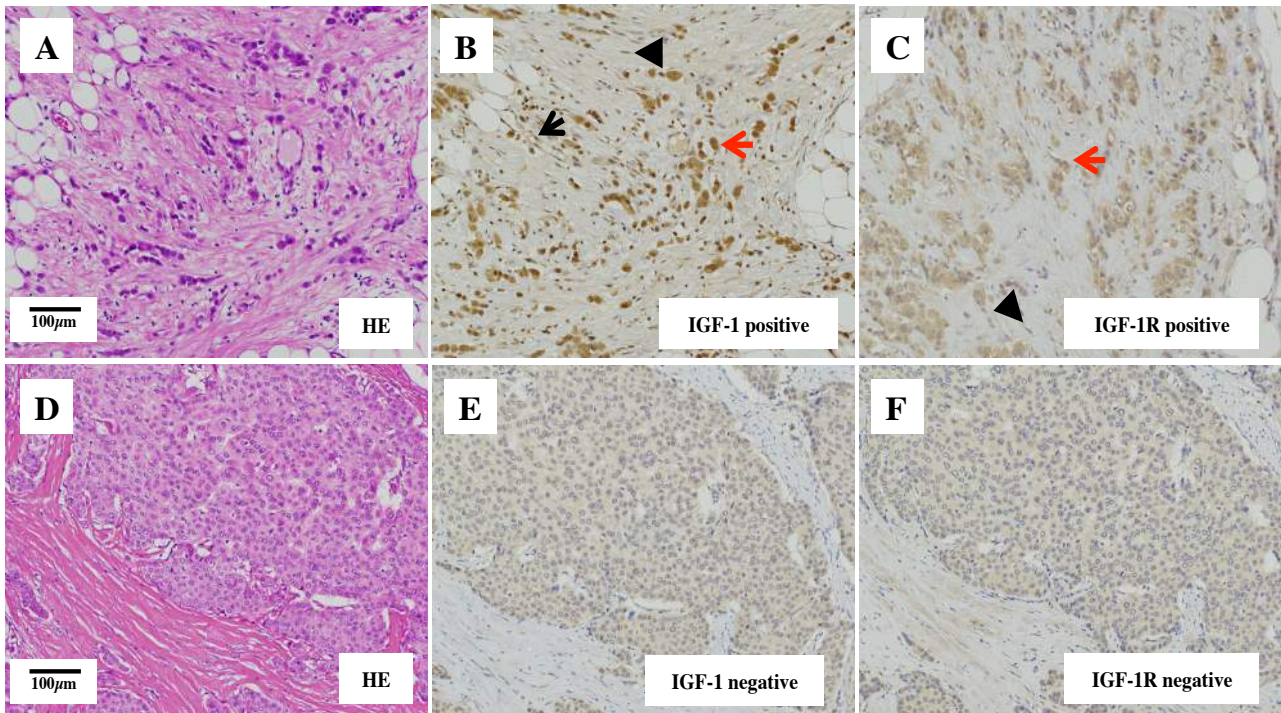


図 7. IGF-1 の染色強度を 4 段階で評価した (score0-3)。IGF-1 は腫瘍細胞 (赤矢印)、CAF's (黒矢印頭)、血管内皮細胞 (黒矢印) の細胞質に陽性となった。IGF-1R は腫瘍細胞、間質細胞の膜、細胞質に陽性となった。(x100)

A: ILC の 1 例 (HE) B: IGF-1 score 3 C: IGF-1R score 3
 D: IDC の 1 例 (HE) E: IGF-1 score 0 F: IGF-1R score 0

図 8. 免疫組織化学的手法による IGF-1、IGF-1R の比較

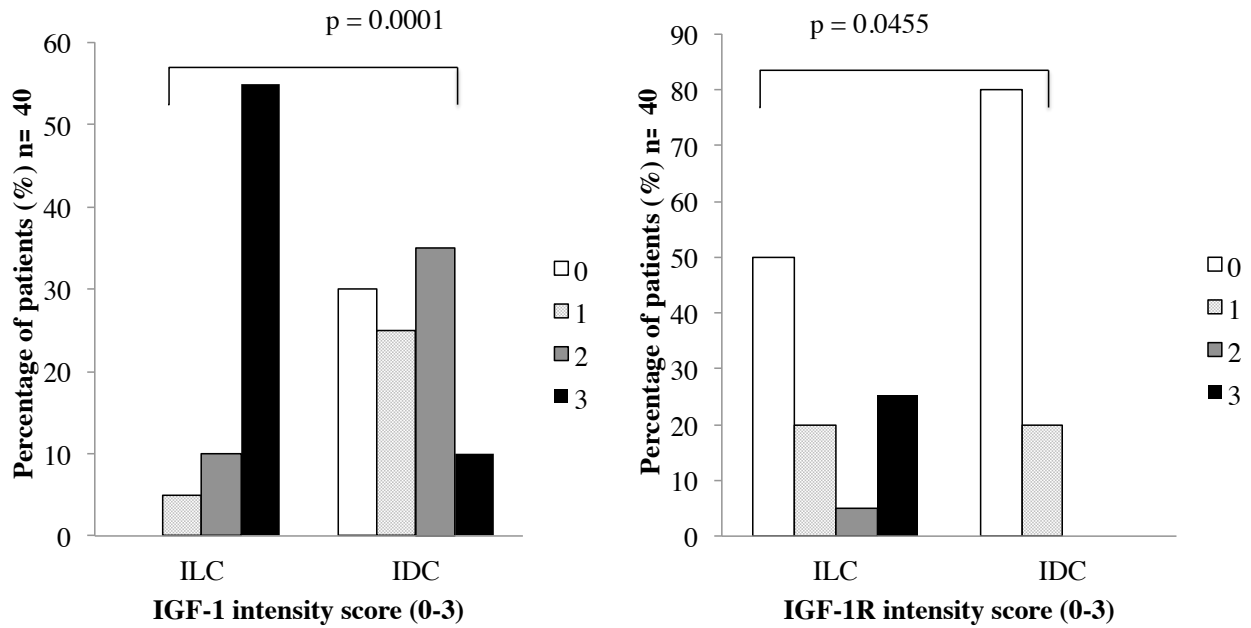


図 8. IGF-1、IGF-1R とともに各陽性症例における陽性細胞の割合は 70-99%であった。そのため、ILC と IDC の 2 群間の比較には染色強度を用いた。また腫瘍細胞と間質の染色態度は同様の結果であった。解析は χ^2 検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

図 9. IGF-1 経路を介した腫瘍細胞と腫瘍間質の相互作用

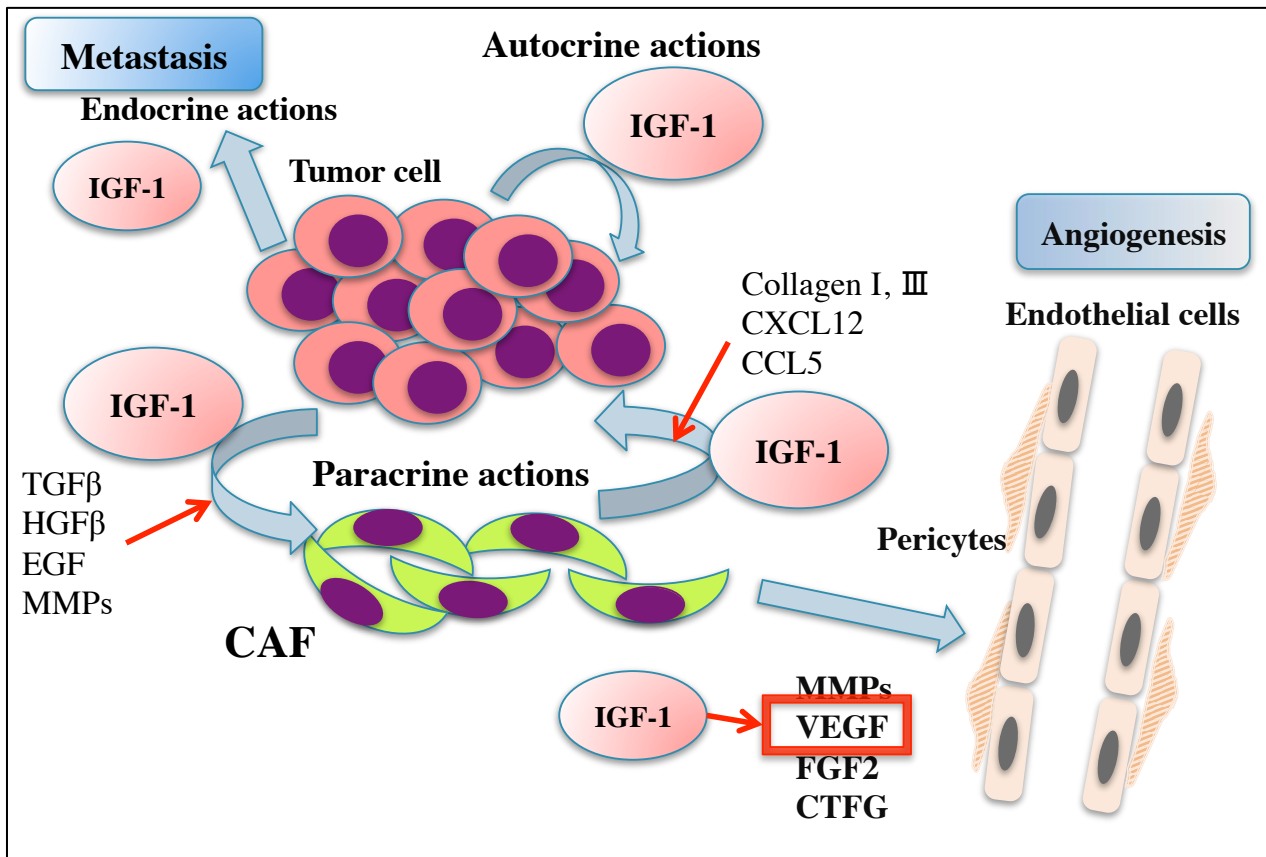


図 9. IGF-1 を介した CAFs と腫瘍細胞の相互作用を示す。CAFが産生する IGF-1 により、腫瘍細胞の増殖、血管内皮細胞の増殖が促進される（傍分泌作用）。腫瘍細胞、CAFは IGF-1 の自己分泌によっても増殖を促す。また血管内皮細胞では、IGF-1 を介して VEGF による血管新生が促進され、negative feedback として vasohibin-1 を発現する。

TGF: transforming growth factor

HGF: hepatocyte growth factor

EGF: epithelial growth factor

FGF: fibroblast growth factor

MMP: matrix metalloproteinase

CXCL、CCL: chemokine ligand

VEGF: vascular endothelial growth factor

CTFG: Connective Tissue Growth Factor, IGFBP-8

図 10. 腫瘍組織における IGF-1 経路とエストロゲン経路の相互作用

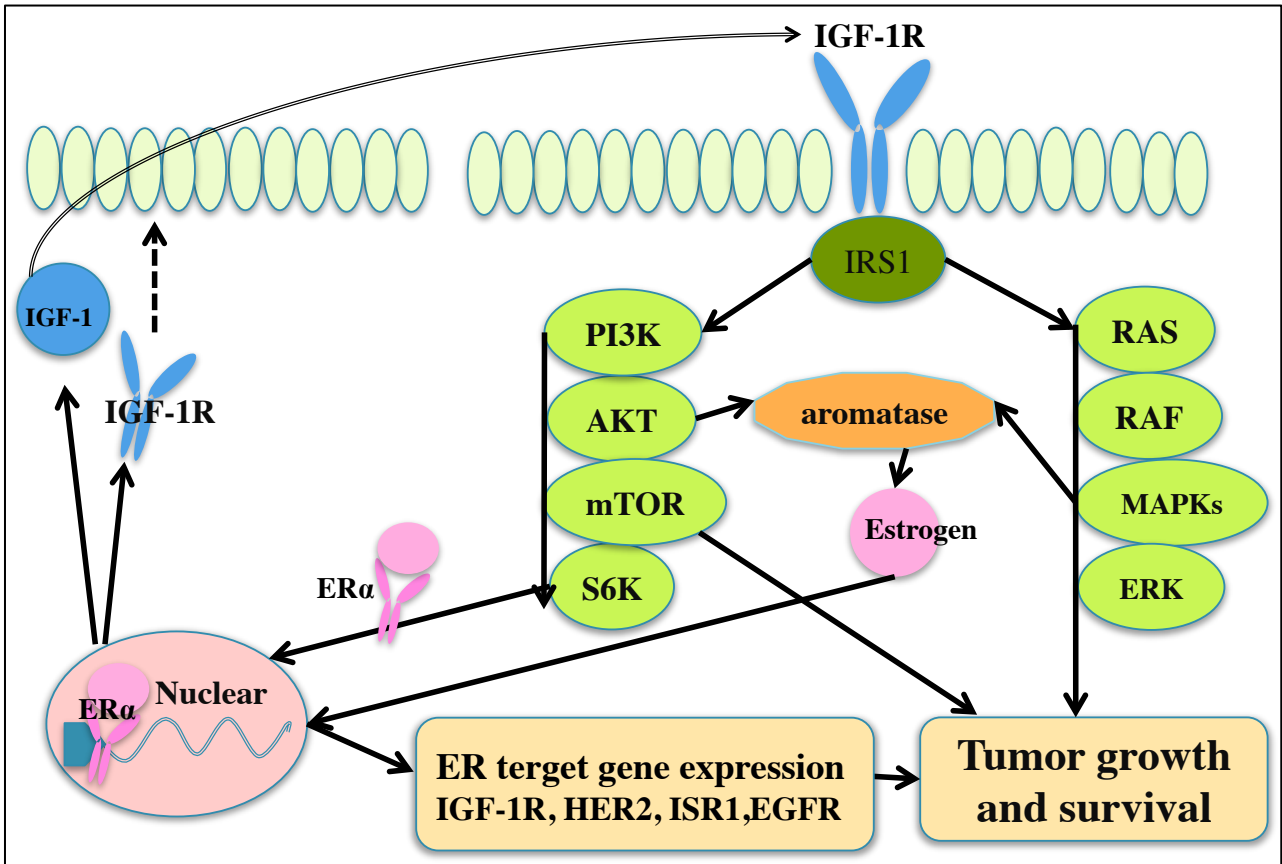


図 10. 乳癌の腫瘍細胞内では、エストロゲンによる腫瘍増殖経路（エストロゲン経路）と IGF-1 経路の相互作用の存在が明らかにされている。IGF-1 を介した PI3K/AKT/mTOR 経路、RAS/MAPKs 経路とエストロゲン経路、アロマトラーゼによるエストロゲン合成は乳癌細胞の増殖、アポトーシス抑制を促す。

図 11. IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 経路における分子標的治療薬とホルモン剤の作用部位

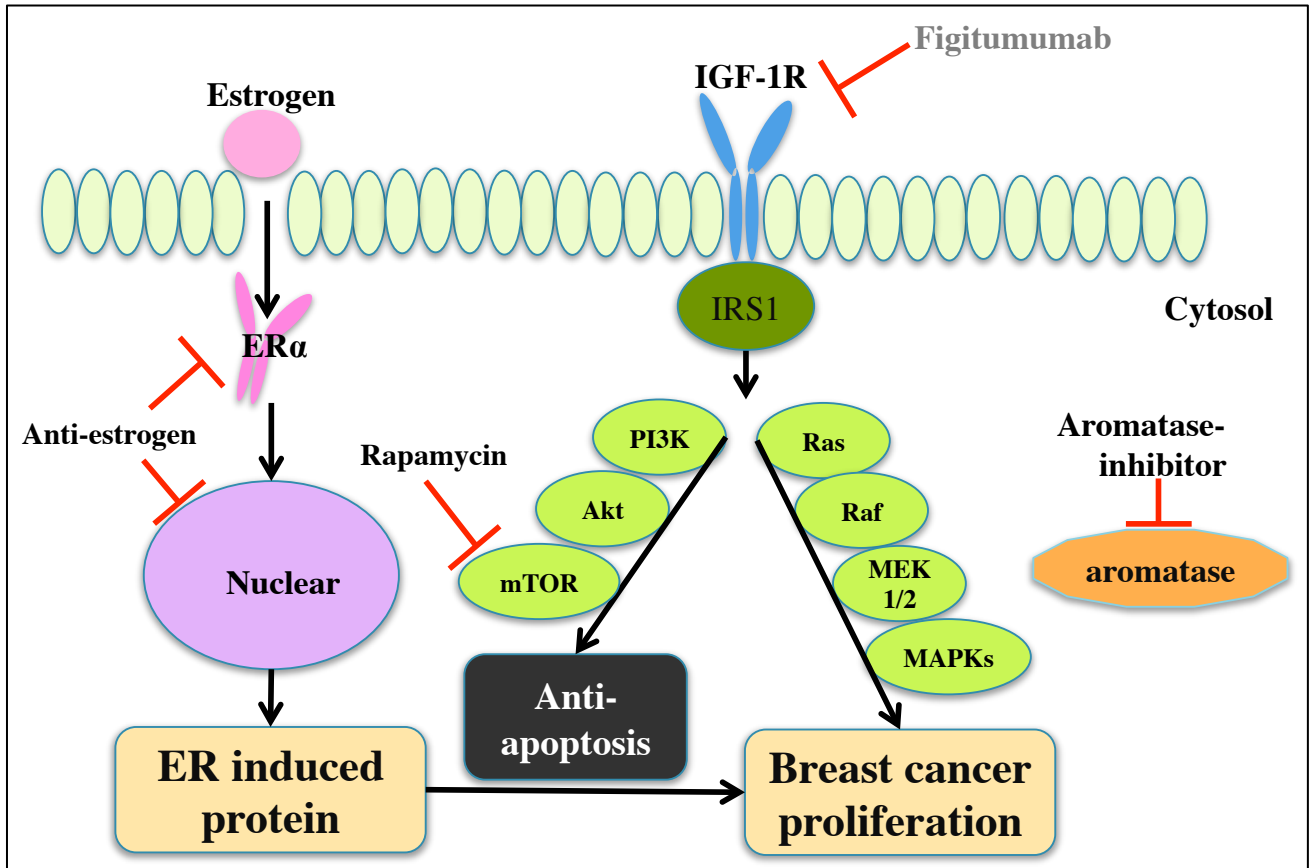


図 11. 乳癌の腫瘍増殖においてエストロゲン経路と IGF-1 経路の相互作用は重要である。現在、抗エストロゲン剤と PI3K/AKT/mTOR 阻害剤 (分子標的治療薬)併用療法の臨床試験が複数進行中である。