



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	馬場, 基
Description	配架番号 : 2165
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11683号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11683
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60961
Type	doctoral thesis
File Information	Motoi_Baba.pdf



学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

馬 場 基

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	9 頁
考察	30 頁
総括および結論	33 頁
謝辞	34 頁
引用文献	35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文へ投稿中である。

1. Motoi Baba, Masato Takahashi, Katsushige Yamashiro, Hideki Yokoo, Moto Fukai, Masanori Sato, Mitsuchika Hosoda, Toshiya Kamiyama, Satoru Todo, Akinobu Taketomi, Hiroko Yamashita

Strong cytoplasmic expression of NF- κ B/p65 correlates with good prognosis in triple negative breast cancer

International Journal of Clinical Oncology

本研究は学会未発表である。今後一部の結果を用いて、日本乳癌学会学術総会にて発表を検討している。

緒言

① 論文の背景

トリプルネガティブ乳癌は、エストロゲン(ER)ならびにプロゲステロン(PgR)受容体発現と HER2 受容体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[1]。アフリカ系アメリカ人や、若年者に多いとされ、BRCA1/2 遺伝子変異をもつ遺伝性乳癌との関連性がある。

乳癌治療は、ER/PgR 陽性乳癌や HER2 陽性乳癌に対する内分泌療法や抗 HER2 療法の進歩により、その臨床的予後が改善されつつある。一方トリプルネガティブ乳癌は、依然化学療法のみが標準治療であり、その臨床的転帰は術後数年で約半数に再発を認め、かつ早期内臓転移を起こしやすく、他のサブグループに比べ再発から死亡までの期間も短く予後不良である[2]。トリプルネガティブ早期乳癌では、術前化学療法が標準的な治療として確立されており、同治療により病理学的完全奏効 (pCR) が得られた場合に無再発生存率が高いことから、pCR が予後の代理指標(サロゲートマーカー)として用いられるようになった[3]。

一方、術前化学療法により pCR を得られない場合には、予後不良な経過をたどる傾向がある[4][5]。しかし現在の標準治療では再発・転移を避ける有効な追加治療の選択肢がない。トリプルネガティブ乳癌において新たな治療や生物学的特性の探索は、他のサブグループより強く望まれている。

NF- κ B は、David Baltimore らによって発見された転写因子で、5つのサブユニット(RelA/p65、c-Rel、RelB、p105/p50、p100/p52)からなる[6]。NF- κ B は、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おり[7,8]、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標的遺伝子の転写活性化をする。

(-)-DHMEQ は、エポキシキノマイシンよりデザイン生成された薬剤である。DHMEQ は光学異性体が存在し、(+)-DHMEQ に比較しラセミ体である(-)-DHMEQ が NF- κ B の核移行をより強く抑制することが論文報告されている[9]。

当教室腫瘍研究グループにおいては、三野が胃癌腹膜播種マウスモデルを用いて、(-)-DHMEQ を用いることにより胃癌細胞株の腹膜播種を阻害することを報告し[10]、佐藤が膵癌腹膜播種マウスモデルを用いて、(-)-DHMEQ により膵癌細胞株のアノキス抵抗性を抑制し腹膜播種を抑制することを報告した[11]。

臨床研究では、術前化学療法を施行した乳癌患者の薬物治療前後の生検組織における NF- κ B の染色率を比較したところ、核染色性が高いほど化

学療法抵抗性が高いことが認められた[12]。

また癌細胞株が抗がん剤による刺激を受けると、 $I\kappa B$ がリン酸化・分解されることにより $NF-\kappa B$ は活性化されること、また $NF-\kappa B$ 活性化を経て $BCL2$ プロモーターが活性化されることが報告されている[13]。

② 解明点と未解明点

本研究では $NF-\kappa B/p65$ に着目した。 $NF-\kappa B/p65$ 核染色(核局在)は、化学療法抵抗性に相関性がある基礎的背景と論文報告があるが、それと反する論文報告例があり依然不明な点がある。また $NF-\kappa B/p65$ 細胞質染色強度と生物学的特性に着目し論文報告を認めず、未解明である。

本研究では $NF-\kappa B/p65$ 局在と生物学的特性の相関性に着目し、トリプルネガティブ乳癌における $NF-\kappa B/p65$ 発現と術前化学療法感受性ならびに予後との間に新しい関連性を見出すため検討をおこなった。

③ 本研究で明らかになったこと

本研究症例では、トリプルネガティブ乳癌症例において $NF-\kappa B/p65$ の核内移行と化学療法感受性ならびに予後との間に明らかな関連性は見いだすことは出来なかった。しかし治療前において $NF-\kappa B/p65$ 細胞質染色が強く発現した症例は、化学療法感受性如何にかかわらず、予後が良好であることが確認できた。この細胞質における $NF-\kappa B/p65$ 発現性は、今後のトリプルネガティブ乳癌への新しい治療への足掛かりになり得ることが示唆された。

略語表

Ab	antibody
mAb	monoclonal antibody
CR	complete response
cCR	clinical complete response
pCR	pathological complete response
ER	estrogen receptor
PgR	progesterone receptor
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2
IHC	immunohistochemistry
Ki67 LI	Ki67 labeling index
NAC	neoadjuvant chemotherapy
NF-κB	nuclear factor kappa B
PD	progressive disease
PR	partial response
SD	stable disease
TNBC	triple negative breast cancer
DHMEQ	dehydroxymethylepoxyquinomicin
(-)-DHMEQ	dehydroxymethylepoxyquinomicin ラセミ体
DFS	disease free survival
OS	overall survival

実験方法

1. 基礎研究

細胞株

トリプルネガティブ乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞 (ATCC) を使用した。細胞株は、FBS10%、ペニシリン 100units/ml、ストレプトマイシン 100ug/ml に調整した RPMI-1640 液を使用し、37 度 5%CO₂ 加湿インキュベーターにて培養した。

MDA-MB-231 細胞における NF- κ B/p65 核内移行の確認

今回 NF- κ B 阻害剤として元慶応大学(現愛知医科大学)梅澤一夫にて開発された (-)-DHMEQ を使用した。これまで北海道大学旧第一外科教室と梅澤一夫教室の共同研究がなされており、臓器移植時の拒絶反応を抑えるため、関与する NF- κ B を抑制する薬剤開発を目標に共同研究を行っていた。並行して癌研究分野では (-)-DHMEQ を用いて、三野が胃癌細胞株による腹膜播種モデルにて癌の接着抑制を抑えること、佐藤が膀胱癌細胞株による腹膜播種モデルにて腹膜播種を抑制しアノイキス誘導されることを報告している。

NF- κ B 阻害剤である (-)-DHMEQ の至適濃度を検討した。過去の論文では、各種細胞株において、10 μ g/ml にて NF- κ B 活性を抑制することが確認されている [14] [15] [16]。Cell Viability 確認する目的で proliferation assay を施行し、結果を参考に至適濃度を決定した。(-)-DHMEQ を希釈し 0.1, 1, 5, 10, 20 μ g/ml の間で、96wellplate に播種しマイクロプレートリーダー (Thermo VarioScan) にて Day1, 3 に WST-1 液添加 (10 μ l/well) 添加・1 時間インキュベートし吸光度 (440nm) を検討した。

MDA-MB-231 において、核内移行が行われるかを 1) ウェスタンブロット解析、2) 蛍光染色によって確認を行った。

・ウェスタンブロット解析

MDA-MB-231 細胞を 10 cm DISH にて Day-2 に播種・37 度 5%CO₂ 加湿インキュベーターで培養し、Day0 に上清を吸引除去し、human TNF α 単剤群ならびに human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群には、濃度 20ng/ml で 30 分間添加反応させた後上清吸引除去し、human TNF α 群は培養液を添加し、(-)-DHMEQ 群と human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群には、濃度 10 μ g/ml で (-)-DHMEQ を添加し 2 時間反応させた。上清を除去し、氷上で冷却した NaF (5mM) & オルトバナジン酸ナトリウム (5mM) 添加した PBS (p7.5) を 4ml 用いて洗浄し速やかに -80°C 冷凍庫で冷凍し固定した。核タンパクならびに細胞質タンパク分離・抽出には Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を用いた。-80°C 冷凍庫にて氷結保存した各 Dish を取りだし、氷上で、PBS/Phosphatase Inhibitors 5ml $\Rightarrow$ 3ml & スクレーパーを用

い洗浄剥離し細胞を回収した。500rpm・5 分間(4℃)で遠心しデブリスを分離し上清を回収した。【細胞質画分の回収】. 1x Hypotonic Buffer を 250 μ l $\times$ 2 ずつ加え、優しく数回ピペッティングする。予冷したマイクロチューブに移し、氷上で 15 分間インキュベートする。Detergent を 13 μ l ずつ加え 10 秒間ボルテックスし、4℃・14,000 x g, 30 秒間遠心分離し、上清(細胞質画分)を予冷した別のマイクロチューブに回収した。残ったペレットを核画分の回収に用いた。

【核画分の抽出】ペレットに Complete Lysis Buffer を 25 μ l $\times$ 2 加え、ピペッティングし 10 秒間ボルテックスした後、アイスボックスで冷やしながら振盪(シェーカー; 150rpm; 30 分間)した。再度 30 秒間ボルテックスし 4℃・14,000 x g 10 分間遠心分離し、上清(核画分)を予冷したマイクロチューブに回収した。いずれの細胞質画分・核画分のマイクロチューブで-80℃冷凍庫にて保存した。

【ウェスタンブロット工程】各抽出タンパクは、SDS サンプルバッファー添加し 95℃・5 分間加温・変性させた。各タンパクは 40 μ g ずつ、Any-kD pre-cast gel (Bio-Rad, Hercules, USA)を使ったスタンダード SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を使い泳動した。PVDF メンブレンへ転写した後、免疫ブロックした。NF- κ B/p65 の 1 次抗体として NF- κ B(L8F6) Mouse monoclonal Ab #6956 (Cell Signaling Technology Japan K.K. Tokyo, Japan) (希釈率 1:1000)を使用し、 β アクチンには β -actin Rabbit Ab #4967 (Cell Signaling Technology Japan K.K. Tokyo, Japan) (希釈率 1:1000)を使用し、2 次抗体として Anti-mouse IgG HRP-linked Ab

#7076S (Cell Signaling Technology Japan K.K. Tokyo, Japan) (希釈率 1:3000)を使用した。

ブロットは Amersham ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)を使用し、測定ならびに評価には LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) と Image J software (National Institutes of Health, MD, USA)を使用した。

・蛍光染色による解析

MDA-MB-231 細胞を 10 cm DISH にて Day-3 に播種・37 度 5%CO₂ 加湿インキュベーター培養し Day0 で約 2×10^5 cells/ml 細胞攪拌溶液を作成した後、Nunc ラブテックチャンバースライド 8well (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) に 500 μ l/well ずつ播種し、再度 24 時間培養する。Day1 に、Control 群に PBS(-)、human TNF α 単剤群と human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群には human TNF α を濃度 20ng/ml・30 分間で保温、上清をサクションし、Control 群と human TNF α 単剤群は、Medium に置換、human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群には、10 μ g/ml (-)-DHMEQ 溶液に置換し 2 時間培養した。上清をピペットで廃液した後、PBS(-)で 3 回洗

浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定（室温 15 分間）した。固定後、3 回 PBS (-) で洗浄し、NF- κ B/p65 の 1 次抗体として NF- κ B/p65 mouse mAb, 6956s (Cell Signaling Technology Japan K.K. Tokyo, Japan) (希釈率 1:100) を 30 μ l ずつ滴下し、湿潤箱で室温 60 分間反応させた。その後 3 回 PBS (-) で洗浄、2 次抗体として ALEXA594 red anti-mouse Rabbit Ab (Invitrogen, Carlsbad, USA) (希釈率 1:200) を 100 μ l ずつ滴下し、遮光下・湿潤箱で室温 1 時間反応させた。PBS (-) 2 回洗浄、脱イオン水で 1 回洗浄しチャンバー壁を剥がし、DAPI をそれぞれ中心に 3 μ l ずつ滴下しカバーガラスをつけ遮光下 5 分間反応させたのち、蛍光顕微鏡にて顕鏡した。

2. 臨床症例を用いたレトロスペクティブ検討

2012 年 4 月より北海道がんセンター乳腺外科に配属となり、北海道がんセンターにおける術前化学療法を施行したトリプルネガティブ乳癌臨床症例を用いた検討を行った。北海道がんセンター2012 年度院内臨床試験に申請し受理され臨床研究をすすめた。本研究はレトロスペクティブに解析を行い、いずれもヘルシンキ宣言人間を対象とする医学研究の倫理的原則に沿って行った。2002 年～2012 年に術前化学療法の後、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、組織検体は初診時針生検検体ならびに手術時検体を使用し、同センター病理部山城勝重先生の協力をいただき、検体ブロックより未染色 4 μ m 薄切プレパラート作成し、HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色ならびに ER、PgR、HER2 (HER2:2+ の場合、FISH 法を追加施行し遺伝子増幅を確認) 染色し、さらに NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 免疫染色を行い、検鏡評価を行った。

NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 の評価方法は、400 倍率下で最も染色率の高い視野で、染色された癌細胞ならびに癌細胞総数をカウントした。但し、針生検検体では組織量が少ない場合、手術検体では治療効果によるがん細胞数の減少により 1000 未満の症例は認められた。各プレパラート内にエクストラコントロールとして脾臓細胞を置き、染色性の評価検討を適宜行った。

NF- κ B/p65 染色では、核が染色された細胞、細胞質が染色された細胞をカウントした他に、細胞質染色細胞では、染色強度の評価も併せて行った。評価の基準として、エクストラコントロールとして脾臓細胞の染色強度を基準とし 2+ と評価の上、それより染色強度が高いものを 3+、弱いもの 1+、染色されないものを 0 として評価した。

Bcl2 ならびに Ki67 は細胞質が染まった細胞をカウントした。Ki67 は Hotspot の有無も併せて検討したが、今回の検体においては認められなかった。

使用した 1 次抗体は、Ki67 に mouse monoclonal anti-human Ki67 antibody (clone

30-9, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)、NF- κ B/p65 に abbit polyclonal anti-NF- κ B p65 antibody C-20, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (希釈率 1:600) 使用し、Bcl2 に mouse monoclonal anti-human BCL2 antibody (clone 124, Dako, Glostrup, Denmark) (希釈率 1:200) 使用し、iVIEW DAB detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) を用い評価した。臨床的効果判定は、超音波検査ないし X 線 CT にて計測し、the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST, 2000) を用いて complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD) or progressive disease (PD) の 4 段階で評価した[17]。一方病理学的効果判定は日本乳癌学会による効果判定基準を用いて 0 (no response), 1 (mild to moderate response), 2 (marked response), 3 (complete response) の 4 段階で評価した[18]。病理学的完全奏効 (pCR) : 乳房原発巣ならびに腋窩リンパ節において癌の遺残を乳管内外に関係なく認めない状態、とした。病理学的評価は、病理専門医によるダブルチェックをうけ評価した。治療歴・再発/生存の有無等の診療録利用し、追跡予後調査も併せて行った。

統計学方法は、術前化学療法前後の生物学的因子比較に Mann-Whitney の U 検定を、臨床病理学的因子と生物学的因子との比較に Spearman の順位相関係数 (+0.40 越えないし -0.40 未満かつ p 値 0.05 未満にて有意に正の相関ないし負の相関を認める)、術前化学療法後の生物学的因子 (IHC 染色評価) の比較に Mann-Whitney の U 検定を、術前化学療法の効果予測因子、無再発生存・全生存期間の予後予測因子を調べる単変量・多変量解析の際に COX ハザードモデルを、それぞれ使用した。生存解析に Kaplan-Meier 法を用い、生存曲線の差の検定にログランク検定を用いた。

実験結果

・NF- κ B/p65 阻害剤(-)-DHMEQ 濃度条件設定

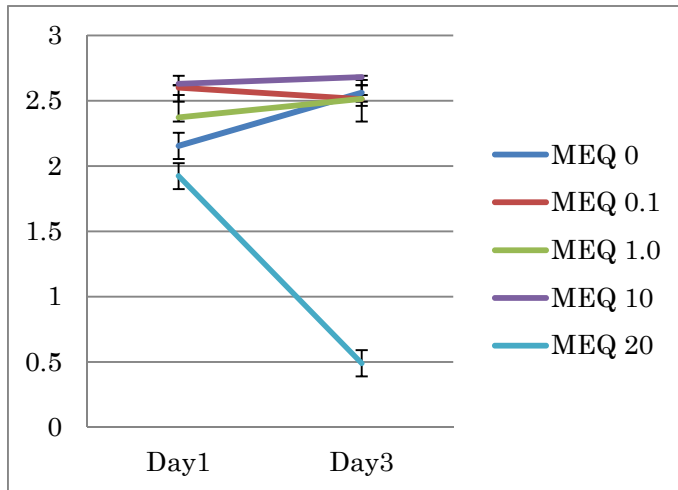


Figure 1A (-)-DHMEQ 各濃度における MDA-MB-231 細胞の細胞増殖

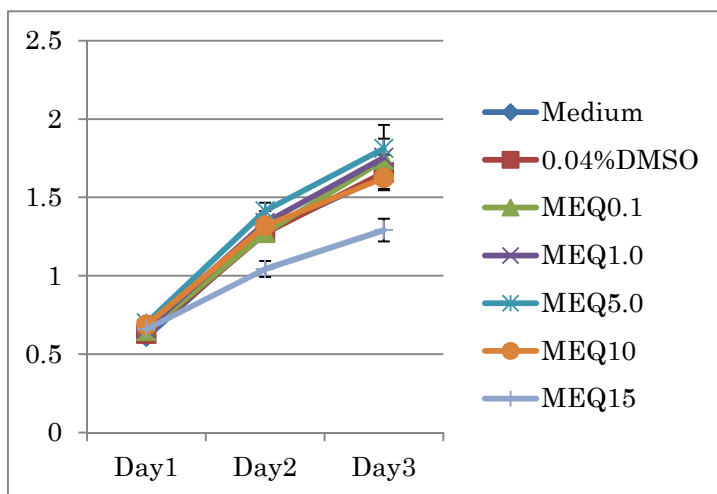


Figure 1B (-)-DHMEQ 各濃度における MDA-MB-231 細胞の細胞増殖

基礎実験として、(-)-DHMEQ の本実験における至適濃度を検討した。

・(-)-DHMEQ を $0.1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、MDA-MB-231 細胞の細胞増殖実験（培養期間 3 日間）を行った。 1.5×10^5 個/ml 細胞各藩溶液を作成し、 $100 \mu\text{l/well}$ 播種した。 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ では、細胞増殖の抑制を認めなかったが $20 \mu\text{g/ml}$ にて強い増殖抑制が認められた。

追加実験を行い、 $20 \mu\text{g/ml}$ を $15 \mu\text{g/ml}$ に変更し実験を行った。

前回播種数が多いため増殖性が阻害され可能性を考え、 3.8×10^4 個/ml に減量し $100 \mu\text{l}$ /well 播種し実験を行った。 $15 \mu\text{g/ml}$ がそれより低い濃度群に比べ増殖に差を認めた。

以上 MDA-MB-231 細胞株を用いた細胞増殖実験結果を踏まえ、また過去論文実験にて濃度 $10 \mu\text{l/ml}$ が使用されていたことを踏まえ、同濃度を (-)-DHMEQ の濃度と決定した。

1. MDA-MB-231 細胞における NF- κ B/p65 核内移行の確認

MDA-MB-231 細胞において、核内移行が行われるかを 1) ウェスタンブロット解析、2) 蛍光染色によって確認を行った。

1) ウェスタンブロット解析による NF- κ B/p65 局在性の解析

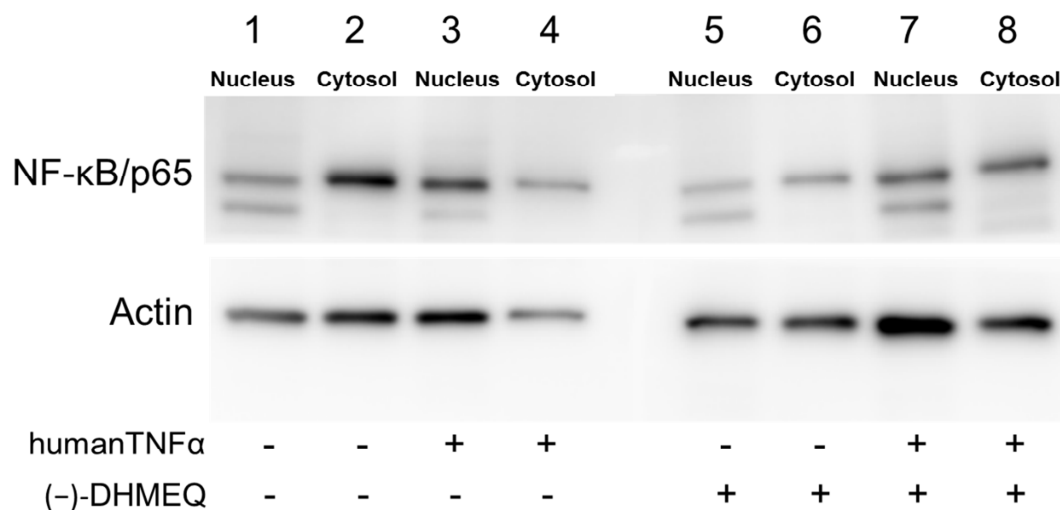


Figure 2 ウェスタンブロット解析

Lane 1, 2: 定常状態 (Medium のみ), Lane 3, 4: human TNF α 20ng/ml (0.5 hour)
 Lane 5, 6: (-)-DHMEQ 10 μ g/ml (2 hours), Lane 7, 8: human TNF α 20ng/ml (0.5 hour)
 → (-)-DHMEQ 10 μ g/ml (2 hours)

ウェスタンブロット解析の解析結果は、NF- κ B/p65 は、75kD と 50kD の間にバンドを認めた。コントロールの Actin の描出に不均一さを認めた。定常状態 (lane 1, 2) では、核内に 2 本弱く描出され細胞質内に強く描出された。一方 human TNF α 刺激状態 (lane 3, 4) では、核内バンドが強く描出され、細胞質内は相対的に核内と比較し弱く描出された。human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群 (lane 7, 8) では、A 定常状態と B human TNF α 単剤群の中間的に、核内と細胞質内のバンドがほぼ同等の強さに描出された。

2) 蛍光染色による NF- κ B/p65 局在性の解析

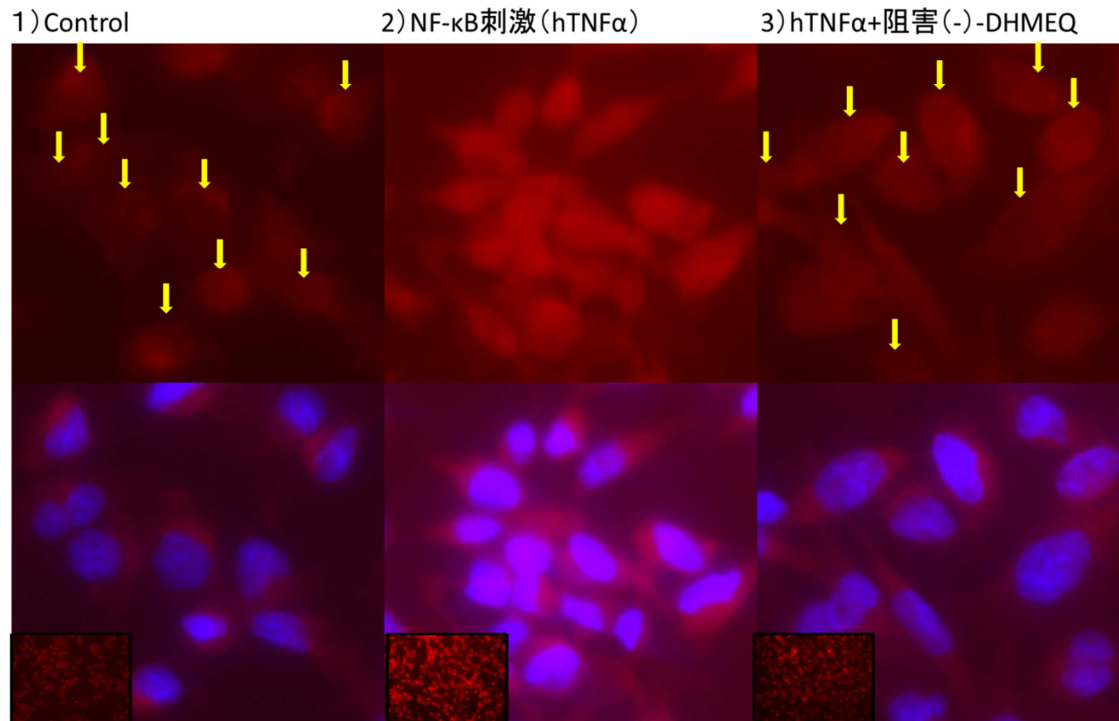


Figure 3 蛍光染色による解析

前提条件として Medium のみである定常状態をコントロール群とした。
Negative コントロールとして、1 次抗体を省きその他コントロール群と同様に処理を行い、DAPI (青色) のみ染色されていることを確認した。
コントロール群では、DAPI と重なる核内部分の染色が抜けている細胞を多く認めたのに対し、human TNF α 単剤群では核内が強く染色される細胞を多数認めた。一方、human TNF α & (-)-DHMEQ 添加群では、human TNF α 単剤添加した細胞群より核染色された細胞が減っていることが確認された。

2. 臨床症例を用いたレトロスペクティブな検討

Table 1 患者背景

Factor		Number of patients (%)
Total number of patients		34
Age at neoadjuvant chemotherapy (years)	Mean $\pm$ SD	51.4 $\pm$ 13.8
	Range	24-79
Menopausal status	Premenopausal	13 (38.2%)
	Postmenopausal	21 (61.4%)
Tumor size (cm)	< 2	2 (5.9%)
	2.1- 5	21 (61.8%)
	5 <	11 (32.3%)
Lymph nodes status	N0	10 (29.4%)
	N1	13 (38.2%)
	N2	5 (14.7%)
	N3	6 (17.6%)
Stage	II	16 (47.1%)
	III	18 (52.9%)
Nuclear grade	1	8 (23.5%)
	2	7 (20.6%)
	3	19 (55.9%)
Ki67 labeling index (%)	Mean $\pm$ SD	73.2 $\pm$ 19.8

2002 年～2012 年に術前化学療法施行後に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。術後観察期間は平均 41 ヶ月 (11-139 ヶ月) であった。術前化学療法における治療内容は、アンスラサイクリン系 (EC 療法: エピルビシン 90 mg/m²・シクロフォスファミド 600 mg/m², 3 週 1 回投与・計 4 回、FEC 療法: 5-FU 500 mg/m²・エピルビシン 100 mg/m²・シクロフォスファミド 500 mg/m², 3 週 1 回投与・計 4 回)、タキサン系 (ドセタキセル 75 mg/m², 3 週 1 回投与・計 4 回、パクリタキセル 80 mg/m² 毎週投与・計 12 回) ないし両者逐次併用が施行されていた。患者背景は、平均年齢 51 歳 (24-79 歳)、閉経前 13 症例 (約 38%) / 閉経後 21 症例 (約 62%) であった。腫瘍径は、腫瘍径 2 cm 以下: 2 例 (約 6%) / 腫瘍径 2 cm から 5 cm 以下: 21 例 (約 62%) / 腫瘍径 5 cm 以上: 11 例 (約 32%) で、リンパ節転移は、陰性例 10 例 (約 30%) / 陽性例 24 例 (約 70%)、臨床病期は Stage II が 16 例 (約 47%) / Stage III は 18 例 (約 53%) であった。核グレードでは 1: 8 例 (約 24%)、2: 7 例 (約 21%)、3: 19 例 (約 75%) とであった。ER/PgR はいずれも陰性であった。

HER2 染色も全例陰性であったが、内訳は IHC 法で 0:21 例(約 62%)、1+:7 例(約 21%)、2+&FISH 陰性:6 例(約 17%)であった。Ki67 LI は、平均 73%(0-92%)と高い染色率であった。

術前化学療法前後の各因子発現の評価

1. NF- κ B/p65 核染色

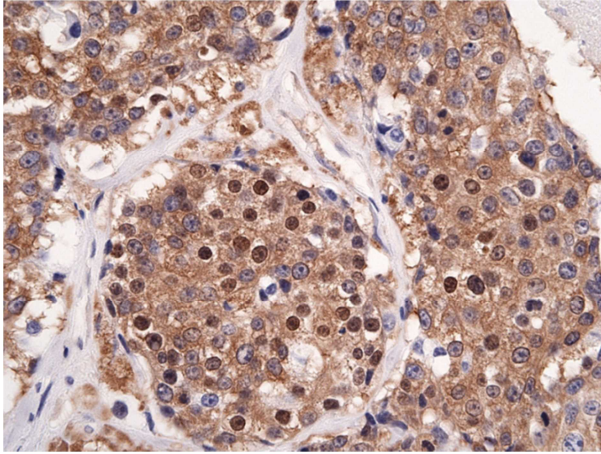


Figure 4 NF- κ B/p65 核染色

NF- κ B/p65 核染色は、術前化学療法前 7 検体 (20.6%) に認め、個々の核染色率はいずれも 2%未満であった。一方術前化学療法後では 6 検体 (17.6%) に認め、個々の核染色率は 10%未満であった。

2 NF- κ B/p65 細胞質染色

NF- κ B/p65 細胞質染色は、術前化学療法前 33 検体 (97.1%) に認め、個々の NF- κ B/p65 細胞質染色率 85%以上であった。一方術前化学療法後 30 検体 (88.2%) に認め、個々の NF- κ B/p65 細胞質染色率 98%以上を認めた。

さらに染色強度の異なりを認めたため、エクストラコントロール(脾臓細胞)と比較し 3 段階に分けて評価した。

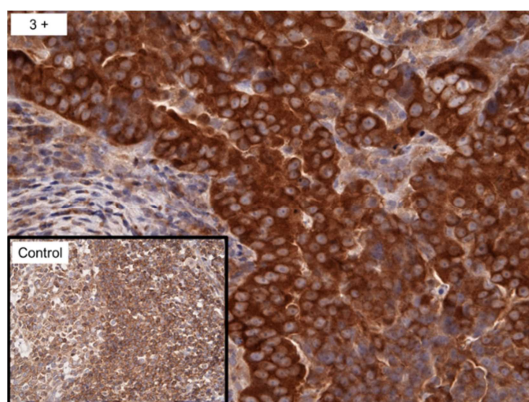


Figure 5A NF- κ B/p65 細胞質染色 : 3+(コントロールより強陽性)

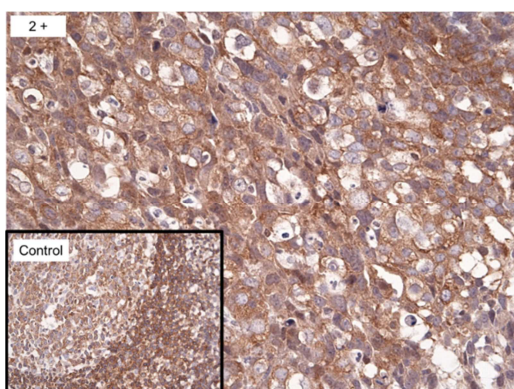


Figure 5B NF- κ B/p65 細胞質染色：2+(コントロールと同等)

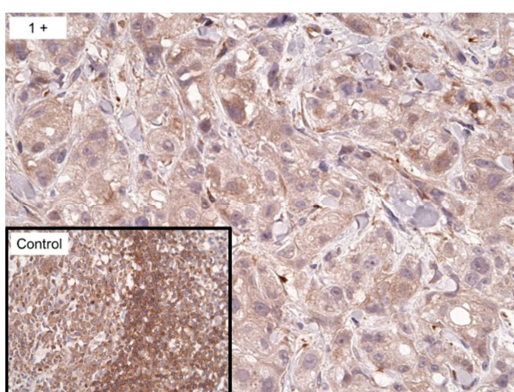


Figure 5C NF- κ B/p65 細胞質染色：1+(コントロールより弱い染色)

NF- κ B/p65 細胞質染色は、術前化学療法前で 3+症例：6 例、2+症例：23 例、1+症例：4 例、0(非染色)症例：1 例であった。一方、術前化学療法後では、※ pCR 症例 6 例を除き、3+症例：0 例、2+症例：14 例、1+症例：12 例、0(非染色)症例：2 例であった。

術前化学療法前 3+症例 6 例は、いずれも術前化学療法後において核染色を認めず全例 non pCR であった。また 6 例全例が NF- κ B/p65 細胞質染色 1+～2+と強染色性は維持されず低下していた。

生物学的因子における術前化学療法前後での変化を Mann-Whitney U-test により検討した。

Table2 術前化学療法前後における生物学的因子

	Before NAC (n=34)		After NAC (n=28)		P ††
	mean $\pm$ SD (range)	median	mean $\pm$ SD (range)	median	
nuclear NF- κ B/p65 †	0.2 $\pm$ 0.4 (0-1.9)	0	0.6 $\pm$ 2.1 (0-10.1)	0	0.8
cytoplasmic NF- κ B/p65 †	96.1 $\pm$ 17.2 (0-100)	100	91.1 $\pm$ 26.3 (0-100)	100	0.9
cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	2.0 $\pm$ 0.7 (0-3)	2	1.4 $\pm$ 0.6 (0-2)	1.5	0.0006*
Bcl2	2.8 $\pm$ 10.9 (0-63.7)	0	10 $\pm$ 17.4 (0-77.7)	1.6	0.03*
Ki67 LI	73.2 $\pm$ 19.8 (0-95.1)	77.3	45.8 $\pm$ 33.9 (1.1-92.5)	59	0.001*

† percentage of cells

††Mann-Whitney U-test

* $p < 0.05$ is considered significant.

NF- κ B/p65 細胞質染色強度、Bcl2、Ki67 の 3 つに因子では有意に差を認め、両者とも術前化学療法前に比べ、同療法後により低い値を示した。

術前化学療法前における生物学的因子と臨床病理学的因子の間に相関性について Spearman の順位相関係数にて検討した。

Table 3 生物学的因子と臨床病理学的因子の間に相関性(術前化学療法前)

	Age	Tumor size	Lymph node status	Nuclear grade
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	-0.505 ^a	0.097	0.102	-0.166
	0.78 ^b	0.59	0.57	0.36
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	0.010	-0.230	-0.221	0.192
	0.96	0.20	0.22	0.29
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	-0.0089	-0.012	-0.465*	0.128
	0.96	0.95	0.006	0.48
pre Bcl2	-0.0036	-0.0397	0.143	-0.278
	0.98	0.83	0.43	0.12
pre Ki67 LI	-0.238	-0.0805	0.0741	0.336
	0.18	0.66	0.68	0.056

[†] percentage of cells

^aSpearman' s correlation coefficient.

^bSpearman' s rank correlation test.

*Spearman' s correlation coefficient < -0.4 or 0.4 < is considered significant.

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

逆相関の関係を有意に認めたものは、NF- κ B/p65 染色強度とリンパ節転移のみであった。有意ではなく逆相関関係の弱い傾向は、Bcl2 と核グレード、Ki67 LI と年齢の間に認めた。

一方、正相関の関係について有意なものは認められず、弱い傾向を Ki67 LI と核グレードの間に認めた。

術前化学療法前における生物学的因子同士の間、相関性があるか Spearman の順位相関係数を用いて同様に検討した。

Table 4 生物学的因子間の相関性(術前化学療法前)

	pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†] Intensity	pre Bcl2	pre Ki67 LI	Ki67 LI change
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]						
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	-0.70 a 0.000006 b *					
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†] Intensity	-0.02 0.9	0.16 0.4				
pre Bcl2	-0.37 0.03 *	0.42 0.02 *	-0.11 0.6			
pre Ki67 LI	-0.09 0.6	-0.04 0.8	0.18 0.3	-0.16 0.4		
Ki67 LI change	0.34 0.05	-0.14 0.4	0.11 0.6	0.11 0.5	-0.31 0.08	
pre HER2	0.18 0.3	-0.14 0.4	-0.06 0.7	-0.3 0.09	0.023 0.9	-0.01 0.95

[†] percentage of cells

^aSpearman's correlation coefficient.

^bSpearman's rank correlation test.

*Spearman's correlation coefficient < -0.4 or 0.4 < is considered significant.

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

NF- κ B/p65 は核染色と細胞質染色間に有意に逆相関の関係を認めた。しかし、その他に、弱い逆相関関係を認めたのは、Bcl2 と NF- κ B/p65 核染色の間に認めた。一方、正相関の関係を有意に認めたのは、Bcl2 と NF- κ B/p65 細胞質染色の間に認め、有意でないが弱い正相関の関係を Ki67 LI change (術前化学療法前後の変化量) と NF- κ B/p65 核染色の間に認めた。

術前化学療法前における生物学的因子と臨床学的奏効判定間の相関性について t 検定(対応あり)を用いて検討した。

Table 5 生物学的因子と臨床学的奏効評価間の平均値比較(4 群)

	PD (n=2)	SD (n=4)	PR (n=22)	CR (n=6)
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	0.7 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 1.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	99.3 $\pm$ 0.9	99.5 $\pm$ 1	94.1 $\pm$ 21.3	99.8 $\pm$ 0.2
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	2 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.4
pre Bcl2	0.5 $\pm$ 0.6	16.4 $\pm$ 31.5	1.2 $\pm$ 2.3	0.03 $\pm$ 0.08
pre Ki67 LI	54.9 $\pm$ 40.9	72.6 $\pm$ 7.7	80 $\pm$ 11.8	55.2 $\pm$ 30.4

[†] percentage of cells

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

生物学的因子は、4 群をそれぞれ 2 群にわけて検討を行った。統計学的計算の行えない PD(n=2)/nonPD(n=32)を除いて、以下の 2 つ検討を行ったが、PD-SD 群(n=6)/PR-CR 群(n=32)、nonCR 群(n=6)/CR 群(n=6)のどちらの比較においても有意な差を認めなかった。

術前化学療法前における生物学的因子と病理奏効判定間の相関性について Mann-Whitney U-test を用いて検討した。

Table 6 生物学的因子と病理学的奏効評価の平均値比較(2 群)

	Grade0-2b (n=28)		Grade3 (pCR) (n=6)		P ††
	mean $\pm$ SD (range)	median	mean $\pm$ SD (range)	median	
nuclear NF- κ B/p65 †	0.21 $\pm$ 0.47 (0-1.9)	0	0.1 $\pm$ 0.2 (0-0.4)	0	0.75
cytoplasmic NF- κ B/p65 †	95.4 $\pm$ 19.0 (85.2-100)	100	99.4 $\pm$ 1.4 (96.6-100)	100	0.8
cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	1.9 $\pm$ 0.7 (0-3)	2	2.3 $\pm$ 0.5 (2-3)	2	0.45
Bcl2	3.3 $\pm$ 12.0 (0-63.7)	0.1	0.4 $\pm$ 0.8 (0-2.1)	0	0.58
Ki67 LI	73.1 $\pm$ 21.7 (0-95.1)	77.3	74.0 $\pm$ 7.5 (64.6-82.5)	74.7	0.41

† percentage of cells

†† Mann-Whitney U-test.

* $p < 0.05$ is considered significant.

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

病理学的奏効評価を完全奏効(pCR)と完全奏効でないもの(non pCR)の2群に分け、各因子について t 検定(対応あり)を用いて母集団の平均に差があるか検討したが有意な差を認めなかった。

臨床病理学的因子ならびに生物学的因子が病理学的完全奏効 (pCR) の効果予測因子となるか多重ロジスティック回帰分析を用いて検討を行った。

Table 7 臨床病理学的因子ならびに生物学的因子と病理学的完全奏効 (pCR)

Factor	Univariate		
	RR	95%CI	<i>p</i>
Age	0.931	0.745-1.162	0.53
Menopausal status	4.005	0.009-1836.4	0.66
Tumor size	3.168	0.456-22.004	0.24
Lymph node status	0.370	0.081-1.683	0.20
Nuclear grade	0.276	0.016-4.798	0.38
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	1.539	0.027-89.33	0.84
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	0.998	0.785-1.270	0.99
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	0.160	0.010-2.433	0.19
pre Bcl2	1.802	0.3770-8.619	0.46
pre Ki67 LI	1.014	0.952-1.081	0.66

[†] percentage of cells

RR relative risk, CI confidence interval

* $p < 0.05$ is considered significant.

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

いずれの因子も pCR との統計学的に関連性を認めず、効果予測因子とは認められなかった。

NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 始め生物学的因子ならびに臨床病理学的因子を無再発生存との関連性を検討するため COX ハザードモデルを用いて単変量解析・多変量解析を行った。

Table 8 病理学的因子ならびに生物学的因子と無病生存期間 (DFS)

Factor	Univariate			Multivariate		
	RR	95%CI	p	RR	95%CI	p
Age	1.018	0.972-1.065	0.45			
Menopausal status	0.616	0.159-2.384	0.48			
Tumor size	1.145	0.387-3.389	0.81			
Lymph node status	1.920	1.098-3.359	0.02*	1.997	1.063-3.751	0.03*
Nuclear grade	0.476	0.234-0.966	0.04*	0.439	0.182-1.059	0.07
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	1.650	0.570-4.771	0.36			
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	1.195	0.711-2.007	0.50			
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	0.555	0.241-1.276	0.17			
pre Bcl2	0.983	0.900-1.073	0.70			
pre Ki67 LI	0.976	0.954-0.999	0.04*	0.992	0.968-1.018	0.54
post nuclear NF- κ B/p65 [†]	1.093	0.857-1.394	0.47			
post cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	0.994	0.972-1.016	0.58			
post cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	0.665	0.246-1.798	0.42			
post Bcl2	1.000	0.966-1.036	0.98			
post Ki67 LI	0.988	0.969-1.007	0.21			
pCR	0.712	0.402-1.260	0.24			
[†] percentage of cells						
RR, relative risk; CI, confidence interval.						
*p < 0.05 is considered significant.						

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

単変量解析ではリンパ節 (p=0.02)、核グレード (p=0.04)、Ki67 LI (p=0.04) にそれぞれ有意に単一因子として無再発生存と関連性を認めた。

この3因子を用い多変量解析を追加解析した結果、リンパ節 (p=0.03) が有意に DFS との強い相関因子として認められた。

同様に NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 始め生物学的因子ならびに臨床病理学的因子を全生存期間との関連性をみるため、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。

Table 9 病理学的因子ならびに生物学的因子と全生存期間 (OS)

Factor	Univariate			Multivariate		
	RR	95%CI	p	RR	95%CI	p
Age	1.040	0.992–1.091	0.10			
Menopausal status	0.596	0.154–2.309	0.45			
Tumor size	1.324	0.439–3.992	0.62			
Lymph node status	1.784	1.027–3.101	0.04*	1.303	0.551–3.083	0.55
Nuclear grade	0.422	0.206–0.866	0.02*	0.369	0.150–0.907	0.03*
pre nuclear NF- κ B/p65 [†]	1.520	0.519–4.452	0.45			
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	1.023	0.935–1.118	0.62			
pre cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	0.721	0.297–1.747	0.47			
pre Bcl2	0.972	0.841–1.123	0.70			
pre Ki67 LI	0.968	0.942–0.993	0.01*	0.988	0.958–1.020	0.47
post nuclear NF- κ B/p65 [†]	1.217	0.917–1.617	0.17			
post cytoplasmic NF- κ B/p65 [†]	0.997	0.976–1.019	0.81			
post cytoplasmic NF- κ B/p65 intensity	0.947	0.352–2.548	0.91			
post Bcl2	1.008	0.975–1.042	0.63			
post Ki67 LI	0.990	0.972–1.009	0.31			
pCR	0.712	0.401–1.264	0.25			
[†] percentage of cells						
RR, relative risk; CI, confidence interval.						
*p < 0.05 is considered significant.						

注釈)

初診時針生検の検体で行った免疫染色による各因子には「pre」と表記し、術前化学療法後の手術検体で行った各因子には「post」と表記し区別した。

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 LI (p=0.01) の 4 つの因子で有意に関連性を認め、4 因子を用いて多変量解析を行ったところ、核グレードが、OS と有意に強い関連をもつ因子として認められた。

生物学的因子である NF- κ B/p65、Bcl2、Ki67 因子について、任意に閾値設定・2 群化した上で Kaplan-Meier 法を用いて無再発生存ならびに全生存について、予後予測因子として検討を行った。また同様に、病理学的完全奏効 (pCR) の有無で 2 群化し同様に検討を行った。

1. NF- κ B/p65 核染色

初診時針生検検体 (術前化学療法前) にて pre nuclear NF- κ B/p65 と表記した。

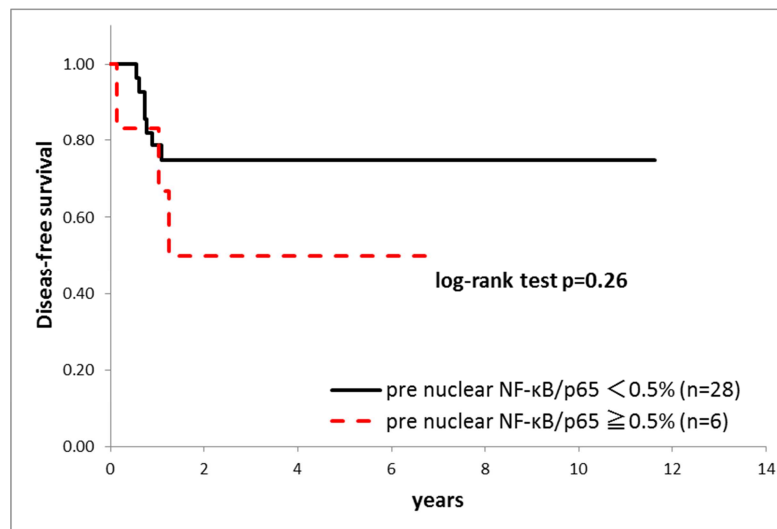


Figure 6A pre NF- κ B/p65 核染色と無病生存率

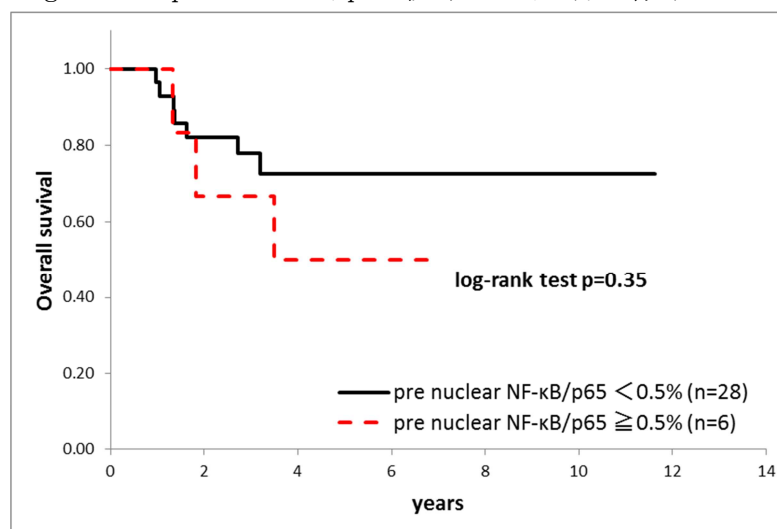


Figure 6B pre NF- κ B/p65 核染色と全生存率

pre NF- κ B/p65 核染色は無病生存ならびに全生存においても、その染色率が 10%未満で、その間で閾値を設定し検討したが、いずれも Kaplan-Meier 法で得られた生存曲線は 2 群間で重なり有意な差は認めなかった。

2. NF- κ B/p65 細胞質染色強度

NF- κ B/p65 細胞質染色強度では、閾値(cut off 値)を 3 と 0-2 とした。

初診時針生検検体(術前化学療法前)にて pre NF- κ B/p65 細胞質染色強度と表記した。

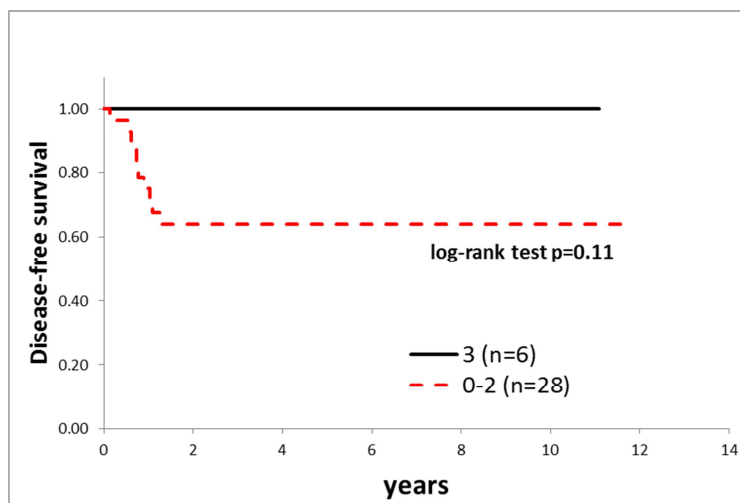


Figure 7A pre NF- κ B/p65 細胞質染色強度と無病生存率

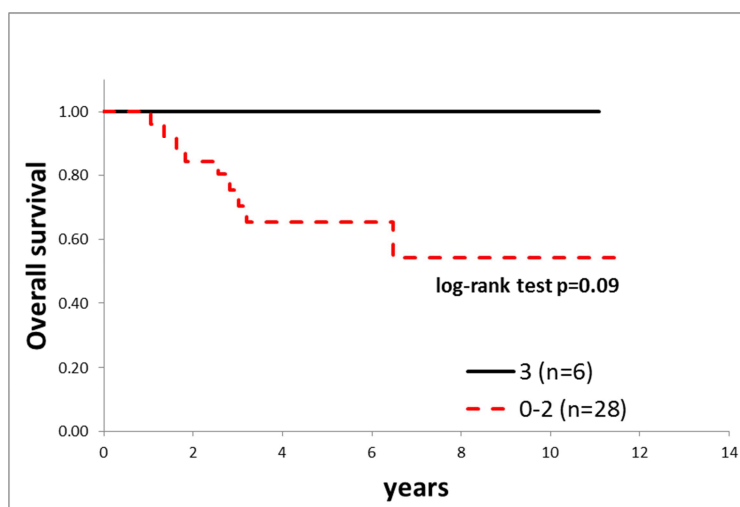


Figure 7B pre NF- κ B/p65 細胞質染色強度と全生存率

pre NF- κ B/p65 細胞質染色強度を 3+ と 0-2+ の 2 群に分け検討したところ、3+ 症例 6 例は全例無再発生存であり、Kaplan-Meier 法にて生存曲線を計算すると、3+ 群は全例無再発であり全例生存中であつたが、統計学的有意な差は認めなかつた。

3. Bcl2

Bcl2 は、閾値 (cut off 値) を 5%以上/未満とし検討した。

初診時針生検検体 (術前化学療法前) にて pre Bcl2 と表記した。

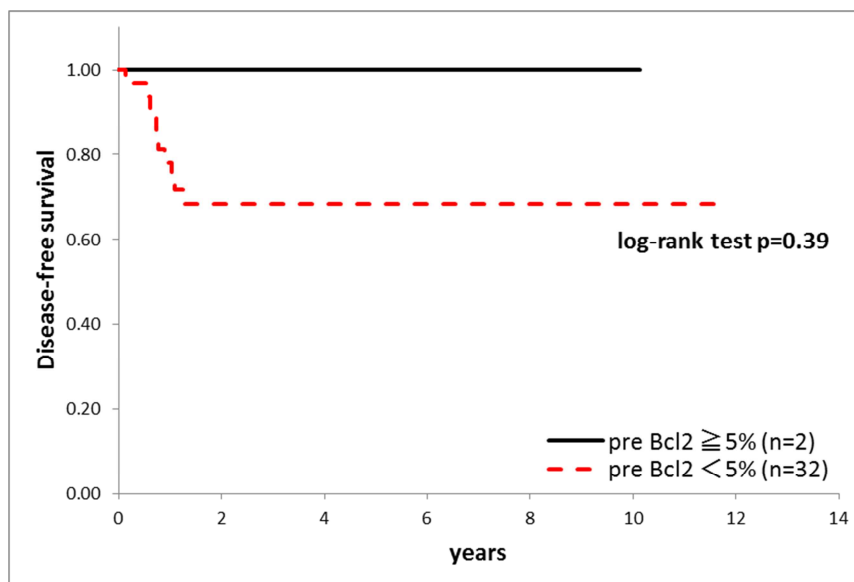


Figure 8A pre Bcl2 と無病生存率

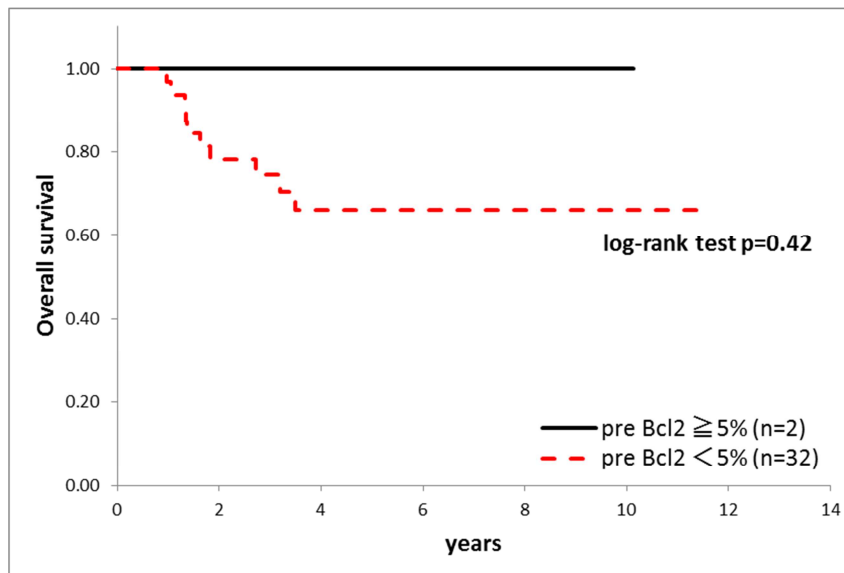


Figure 8B pre Bcl2 と全生存率

初診時針生検における Bcl2 を 2 群に分け検討した。

閾値 5% で 2 群にわけた場合に、染色率 5% 以上症例 2 名がいずれも無再発生存であり、Kaplan-Meier 法にて生存曲線を計算すると、Bcl2: 5% 以上の群は、全例無再発であり全例生存中であつたが、統計学的有意な差は認めなかった。

3. Ki67 LI

Ki67 LI は、閾値 (cut off 値) を 70%以上/未満とし検討した。

初診時針生検検体 (術前化学療法前) にて pre Ki67 と表記した。

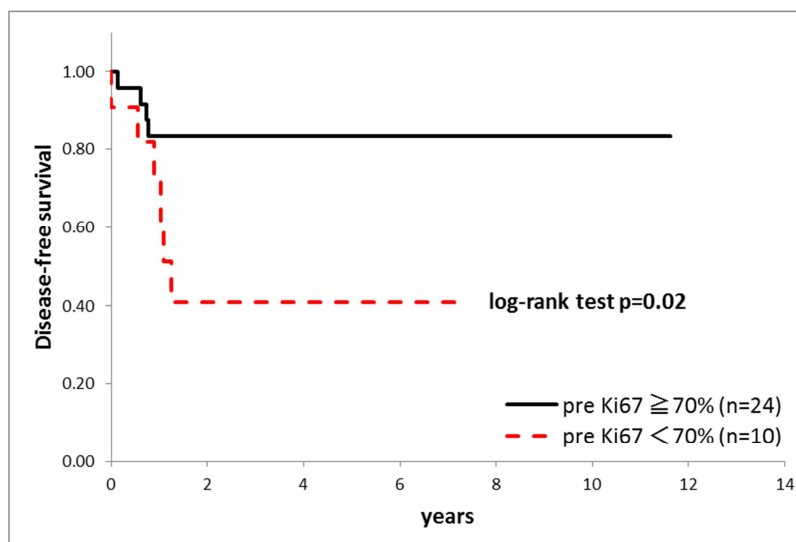


Figure 9A pre Ki67 と無病生存率

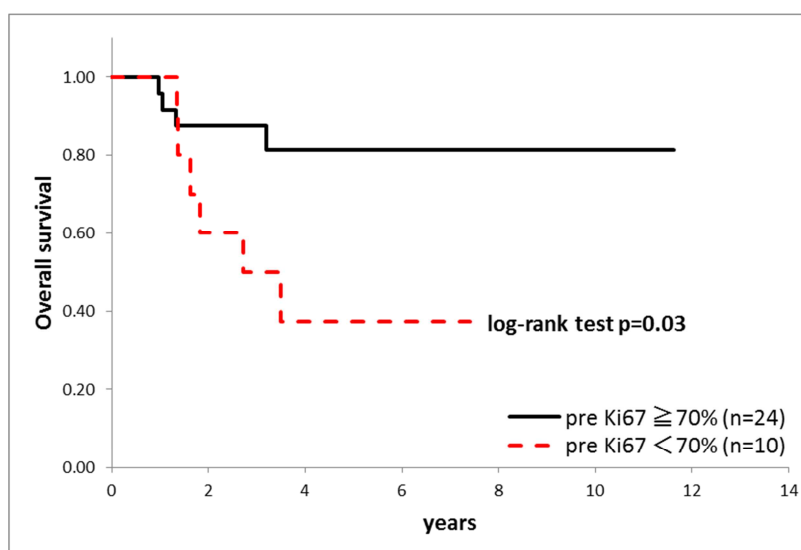


Figure 9B pre Ki67 と全生存率

pre Ki67 では、閾値 70%以上/未満で 2 群化すると、無病生存ならびに全生存ともに両群とも再発ならびに死亡症例を認めたが、統計学的に有意な差をもって、初診時 (術前化学療法前) に高い Ki67 値 ($\geq 70\%$) を示した方が予後良好であった。

4. 病理学的奏効

病理学的奏効を pCR (効果判定 3) / non pCR (効果判定 0-2) とした。

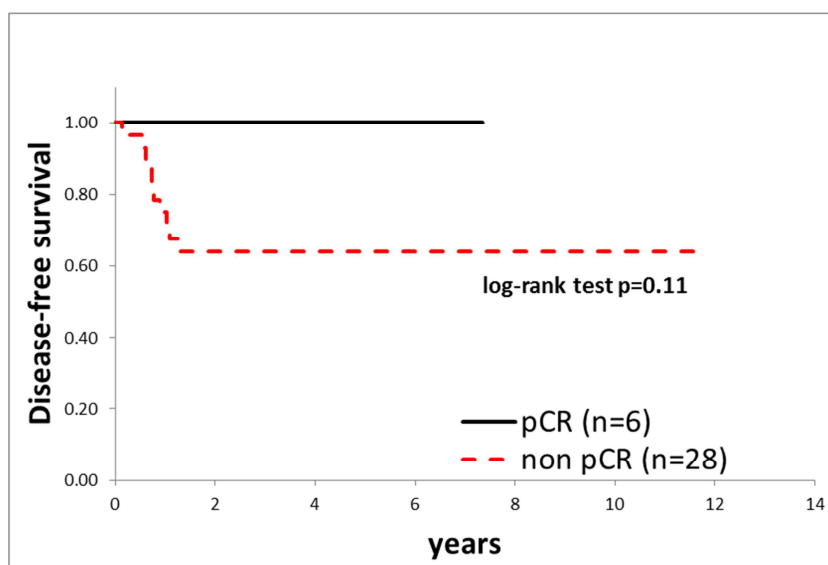


Figure 10A 病理学的奏効と無病生存率

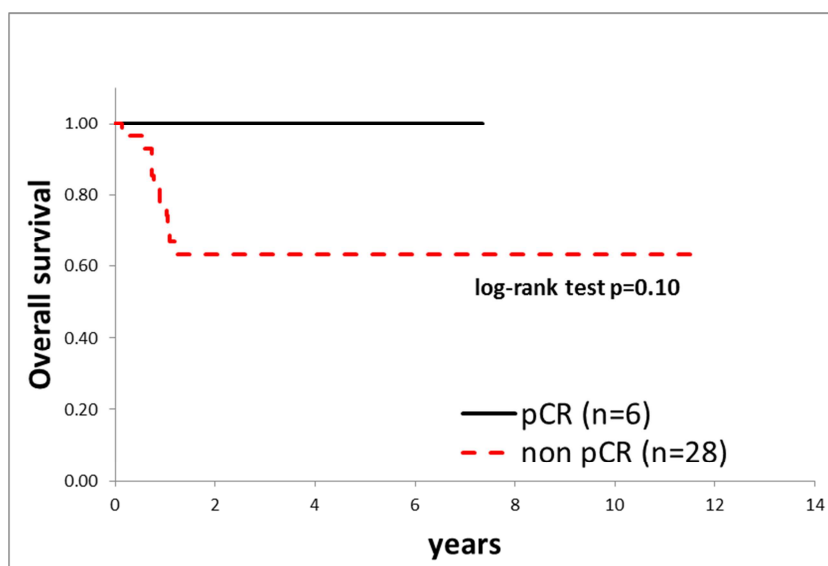


Figure 10B 病理学的奏効と全生存率

病理学的奏効において pCR/non pCR で検討すると、pCR 症例 6 名は全例無再発生存であり、Kaplan-Meier 法にて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かったが、その生存に差がある傾向を認めた。

考 察

NF- κ B は、がん細胞における細胞の増殖、アポトーシス、化学療法耐性化に深くかかわっていることは既知の論文・報告で論じられている。一方乳癌治療において、一方トリプルネガティブ乳癌は、遺伝子プロファイルによって6つの集団に分類され[1]、未だ術後5年以内に半数以上の再発を認める予後不良なサブタイプである。しかし現在の治療は化学療法のみ[19]で、その生物学的特性の知見ならびに新たな治療開発が強く望まれている。トリプルネガティブ乳癌は、術前化学療法によってpCRを得ることが良い予後と相関関係が認められ、pCRが良い予後の代理マーカーになるといわれている[3]。しかし、現在乳癌における化学療法の中心的薬剤であるアントラサイクリン系ならびにタキサン系薬剤によっても十分な治療効果を得られていない[20,21]。化学療法による治療効果とがん細胞内NF- κ Bとのメカニズムにおいて新たな知見を求め、本研究を開始した。

まず Montagut の報告したように、乳癌細胞へストレスを与えた際にNF- κ Bの核内移行の有無を確認し、かつNF- κ B阻害剤による阻害を確認するため、トリプルネガティブ乳癌細胞株MDA-MB-231細胞を使用し、ストレス負荷薬剤としてhuman TNF α 、NF- κ B阻害剤として旧慶應義塾大学(現愛知医科大学)梅澤一夫先生が生成し[9]、当教室でNF- κ B阻害剤として免疫抑制の他、様々な作用を研究・報告してきた(-)-DHMEQを用いた[11]。乳がん細胞株においては、NF- κ Bの恒常的発現を認めBasal-likeな乳癌(トリプルネガティブ乳癌)の増殖においても認められている[22]。トリプルネガティブ乳癌細胞株であるMDA-MB-231細胞を使用し蛍光染色とウェスタンブロット法を用いて確認を行った。その結果は、蛍光染色実験では、定常状態と比較しhuman TNF α 刺激を行うとNF- κ B/p65核内移行を認め、human TNF α 刺激下に(-)-DHMEQによりNF- κ Bの阻害を行うと、NF- κ Bの核内移行が阻害されることが認められた。ウェスタンブロット解析では、まずコントロールにActinを使用したか、均一なバンドが描出されていない結果であった。human TNF α 刺激群、human TNF α & NF- κ B阻害剤併用群に着目すると、どちらも核が細胞質より強く発現していた。この結果がそれぞれ実験精度の問題であるのか、Actin濃度の規則的な濃度差があるのか文献的な検索を行ったが不明であった。よって、考えられる解決策は、Lamin等ほかのコントロールで再度実験を行うことがよいと考えられた。

ただし、human TNF α 刺激群、human TNF α & NF- κ B阻害剤併用群を比較すると、併用群では相対的に核成分の発現が弱まり、細胞質成分がより強く発現されているように認めら、蛍光染色実験と同様な変化が起こっていると考察された。

次に、これらが臨床症例・がん組織においても Montagut が述べていた事象を含め新しい事象を検索するため、臨床検体を用いて免疫染色を行い、評価・検討を行った。

Montagut 他で NF- κ B/p65 の核内発現は乳癌における術前化学療法の効果予測因子である[12,23]と報告されているが、本実験では NF- κ B/p65 の核内染色を認めた症例は術前化学療法前および術前化学療法後ともにわずかであり、またその染色率も非常に低かった。通常では術前化学療法施行後、約 1 ヶ月程度で手術を施行する。この期間に本研究との大きな差はないと考えられるが、論文に明確な記載はされておらず比較できず不明である。

また免疫染色については、本研究ではコントロールの染色性に問題はなかった。Montagut とは異なり、本研究ではトリプルネガティブ乳癌のみで検討を行った。基礎研究では、ホルモン陰性・HER2 陰性乳癌細胞株は総じて NF- κ B/p65 の核移行の度合いが高い報告があるが、IHC 法による抗体染色によってトリプルネガティブ乳癌と診断した乳癌症例内には、遺伝子プロファイルによるサブグループ診断がされておらず不明である。よって本研究 34 症例が、どのサブタイプであるかにより、今回の低い染色率の原因探求の足がかりになりうると考える。

NF- κ B/p65 核染色は、高い核グレード・ER 陰性・高い Ki67 値・pCR 率との相関性がある、との報告[24]や、p53 発現・HER2 陽性等関連があるとの報告がある[25]。しかし本研究では pCR との関連性ならびに予後との関連性は認められなかった。NF- κ B/p65 核染色と化学療法抵抗性については、過去の報告では Montagut や Buchholz らは NF- κ B/p65 核染色と抵抗性に関連性あり[12,23]と報告している一方で、Jones らは NF- κ B/p65 核染色は組織学的あるいは核グレードが高いこと、ホルモン陰性と関連性があり、NF- κ B/p65 核染色を術前化学治療前に認めていた症例のほうが高い pCR を得たと報告[24]もあり、一定の見解が得られていない。本研究では、過去の報告で使用されたものと同じ NF- κ B/p65 抗体を用いて染色を行ったが、術前化学療法前に 34 症例中 7 例、治療後手術検体では 6 例で核染色を認めた。しかし、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新たな知見を認めた。強陽性 3+症例は、術前化学療法前(初診時針生検組織)で 34 症例中 6 症例に認めた。手術検体において NF- κ B/p65 細胞質染色強度が強陽性 3+症例は、34 症例中 1 例も認めなかった。

NF- κ B/p65 細胞質強陽性 3+であった 6 症例は、術前化学療法によって病理学的完全奏効(pCR)は全例得られなかった。また手術時検体では NF- κ B/p65 核染色も認めなかった。しかし、その予後は non pCR にも関わらず全例無再発生存中であった。

Bcl2 染色結果も NF- κ B/p65 核染色と同様に染色率が低く、有意な知見を本研

究において得ることはできなかった。

Ki67 では、当乳腺外科吉岡や Minckwitz らが報告した 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[26,27]、2. 術前化学療法後にも高い Ki67 染色が維持された症例では、予後不良である[28,29]、の 2 点においては、本検討では認められなかった。

原因については、症例が少ないことによるバイアスの可能性も考えられ不明である。

しかし、本研究結果から、治療前において Ki67LI が高い値(70%以上)を示した症例は、統計学的に有意な差をもって予後良好であったことから考えられることは、Table2 で術前化学療法前後において Ki67LI は、有意な差をもってその平均値は低くなっていることから、統計学的な有意な差は認められなかったものの、「術前化学療法後に低い Ki67 染色を示した症例は、予後が良好である」ことを示唆する結果であったと考えた。

pCR が予後の代理マーカーであるかは乳癌サブタイプによって異なる[22]と云われており、そのうちトリプルネガティブおよび HER2 陽性のタイプでは術前化学療法によって pCR を得られた症例では、予後が良いとの報告[3]が多数されており、北大乳腺外科吉岡も報告したように同様の論文報告を多数認める。本研究では 34 症例中 6 例(17.6%)で術前化学療法により pCR となり、6 例全例で無再発生存中である。

本研究結果により、NF- κ B/p65 細胞質染色強度が強陽性であることが予後良好であることが示唆された。しかし本研究結果が意味するところは不明である。細胞質染色性が増強することが、間接的に NF- κ B/p65 の活性化抑制・核内移行抑制に関与しているのか、あるいは新たなメカニズムがあるのか、今後のさらなる基礎的研究による解明が必要である。

総 括 および 結 論

NF- κ B/p65 核染色は、本研究においては 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 細胞質染色(強度)は、術前化学療法といった薬物療法の影響にかかわらず、治療前に強く染色された症例では、良い予後との相関性が認められ、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。よって、NF- κ B/p65 の細胞質内における染色性と分子学的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。

謝 辞

慶応義塾大学梅澤一夫先生、北海道大学吉岡達也先生、基礎研究にてご指導いただきました横尾英樹先生ならびに深井原先生、臨床研究においてご指導いただきました北海道がんセンター乳腺外科高橋將人先生ならびに病理部山城勝重先生、また本研究全体にわたりご指導いただきました北海道大学乳腺外科山下啓子教授、指導教官である北海道大学消化器外科分野Ⅰ武富紹信教授におかれましては、言葉では言い表せない程大変お世話になりました。この場を借り厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

1. Abramson, V.G., Lehmann, B.D., Ballinger, T.J. & Pietenpol, J.A. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer* 121, 8-16(2014)
2. Clifford, A.H. & Luca, G. Triple-negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *Oncologist* 16, 1-11(2011)
3. von Minckwitz, G. *et al.* Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* 30, 1796-1804(2012)
4. Liedtke, C. *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1275-1281(2008)
5. Carey, L.A. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *Oncologist* 16, 71-78(2011)
6. Karin, M. & Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221-227(2002)
7. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436(2006)
8. Li, N. & Karin, M. Signaling pathways leading to nuclear factor-kappa B activation. *Methods Enzymol.* 319, 273-279(2000)

9. Umezawa, K. Possible role of peritoneal NF-kappaB in peripheral inflammation and cancer: lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomed Pharmacother.* 65, 252-259(2011)
10. Mino, K. *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion. *Cancer Sci.* 102,1052-1058(2011)
11. Sato, M. *et al.* Anoikis induction and inhibition of peritoneal metastasis of pancreatic cancer cells by a nuclear factor-kappaB inhibitor, (-)-DHMEQ. *Oncol. Res.* 21, 333-343(2013)
12. Montagut, C. *et al.* Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 607-616(2006)
13. Nakanishi, C. and Toi, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs *Nature Reviews Cancer* 5. 297-309(2005)
14. Miyake, A. *et al.* Inhibition of active HIV-1 replication by NF- κ B inhibitor DHMEQ. *Microbes and infection* 12, 400-408(2010)
15. Horie, R *et al.* DHMEQ, a new inhibitor, induces apoptosis and enhances fludarabine effects on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 20, 800-806(2006)
16. Watanabe, M *et al.* A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ selectively targets

constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 114, 32-38(2005)

17. Kurosumi, M. *et al.* Histopathological criteria for assessment of therapeutic response in breast cancer (2007 version). *Breast Cancer* 15, 5-7(2008)
2750-2767 (2011)

18. Wolff, A.C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 118-145(2007)

19. Lehmann, B.D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750-2767 (2011)

20. Jones, R.L. *et al.* Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 119, 315-323(2010)

21. Lips, E.H. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy in ER+ HER2- breast cancer: response prediction based on immunohistochemical and molecular characteristics. *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 827-836(2012)

22. Yamaguchi, N. *et al.* Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is

preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines.

Cancer Sci. 100, 1668-1674(2009)

23. Buchholz, T.A. *et al.* The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 8398-8402(2005)

24. Jones, R.L. *et al.* Nuclear NF-kappaB/p65 expression and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin. Pathol.* 64, 130-135(2011)

25. Shapochka, D.O., Zaletok, S.P. & Gnidyuk, M.I. Relationship between NF-kappaB, ER, PR, Her2/neu, Ki67, p53 expression in human breast cancer. *Exp. Oncol.* 34, 358-363(2012)

26. Yoshioka, T. *et al.* Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer* 22, 185-191(2015)

27. von Minckwitz, G. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-insights from the German experience. *Breast Cancer* 19, 282-288(2012)

28. von Minckwitz, G. *et al.* Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 4521-4531(2013)

29. Jones, R.L. *et al.* The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant

chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 116, 53-68(2009)