



Title	乳癌における腫瘍関連MUC1の発現とその臨床的有用性に関する研究
Author(s)	清水, 亜衣
Description	配架番号 : 2459
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13445号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13445
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91679
Type	doctoral thesis
File Information	Ai_Shimizu.pdf



学 位 論 文

乳癌における腫瘍関連 MUC1 の発現と

その臨床的有用性に関する研究

(Studies on tumor-associated MUC1 expression and
its clinical utility in breast cancer)

2019年3月

北 海 道 大 学

清水 亜衣

学 位 論 文

乳癌における腫瘍関連 MUC1 の発現と
その臨床的有用性に関する研究

(Studies on tumor-associated MUC1 expression and
its clinical utility in breast cancer)

2019年3月

北 海 道 大 学

清水 亜衣

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	13 頁
結果	19 頁
考察	38 頁
結論	43 頁
謝辞	44 頁
利益相反	45 頁
引用文献	46 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に投稿中である。

Ai Shimizu, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Ayae Nange, Asami Okumura, Kentaro Naruchi, Masaharu Sato, Hiroshi Kase, Yasuhito Onodera, Tomoko Mitsuhashi, Hiroko Yamashita, Yoshihiro Matsuno.
Immunohistochemical evaluation of tumor-associated MUC1 as a specific diagnostic marker for breast cancer. Mod Pathol. In submission.

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 清水 亜衣, 畑中 佳奈子, 畑中 豊, 南家 綾江, 奥村 麻美, 成地 健太郎, 佐藤 正治, 山下 啓子, 松野 吉宏
第106回日本病理学会総会, 2017年4月29日 京王プラザホテル
「新規 MUC1 糖鎖特異抗体を用いた乳腺組織における癌関連糖鎖の組織局在に関する検討 <Immunohistochemical analysis of oncoMUC1 in breast tissue using a novel epitope-defined antibody>」
2. 清水 亜衣, 畑中 佳奈子, 畑中 豊, 馬場 基, 石田 直子, 南家 綾江, 奥村 麻美, 成地 健太郎, 佐藤 正治, 加瀬 廣, 三橋 智子, 山下 啓子, 松野 吉宏.
第25回日本乳癌学会学術総会, 2017年7月15日 マリンメッセ福岡・福岡国際会議場
「乳癌における新規 MUC1 癌関連糖鎖特異抗体の診断有用性の検討」
3. 清水 亜衣, 畑中 佳奈子, 畑中 豊, 南家 綾江, 奥村 麻美, 成地 健太郎, 佐藤 正治, 三橋 智子, 山下 啓子, 松野 吉宏
第107回日本病理学会総会, 2018年6月22日, ロイトン札幌・ニトリ文化ホール・さっぽろ芸文館
「乳癌前癌病変における MUC1 癌関連糖鎖の免疫組織化学的变化 <Immunohistochemical alteration of cancer-associated MUC1 in precursor lesions of breast carcinoma>」
4. Ai Shimizu, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Kentaro Naruchi, Masaharu Sato, Hiroshi Kase, Tomoko Mitsuhashi, Hiroko Yamashita, Yoshihiro Matsuno.

Cancer-associated MUC1 epitope-recognizing antibody as a novel immunohistochemical marker for breast carcinoma.

The American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018, Apr 14–18, 2018, McCormick Place, Chicago, Illinois, USA (poster).

要旨

【背景と目的】

MUC1は、種々の腺上皮細胞の apical cell surface を被い、種々の生理活性を果たす高分子の粘液性膜貫通型タンパク質で、全腫瘍の50%以上に発現するといわれる。腫瘍組織におけるMUC1発現は、細胞の増殖、形質転換、接着、浸潤、免疫細胞の応答性および治療抵抗性などに関連するとされ、MUC1の発現量と患者の予後に相関性があることが知られる。腫瘍細胞が発現するMUC1 (tumor-associated MUC1; TA-MUC1) は、細胞内分布と化学構造の両方が、正常細胞のMUC1と異なるとされる。正常細胞ではMUC1が apical cell surface にみられるのに対し、腫瘍細胞のTA-MUC1は細胞膜全周ないしは細胞質へ局在が変化するという。MUC1コアタンパク質上の糖鎖構造はTA-MUC1においては異常に短く、その結果生じるTn抗原、STn抗原などは癌関連糖鎖と呼ばれる。つまりMUC1とTA-MUC1の化学構造の差異とは、糖ペプチド構造の異同といえる。

乳癌ではその90%以上にMUC1が発現し、再発・転移を検出する血中腫瘍マーカー(CA15-3)としてMUC1測定が診療上、広く使用されている。対照的に、乳腺腫瘍の病理診断において良悪鑑別のためにMUC1が利用されることはほとんどない。これは通常のMUC1抗体がMUC1とTA-MUC1の糖ペプチド構造の差異を識別できず、免疫組織化学染色によるTA-MUC1の特異的検出が困難なためと考えられる。このような背景の中、TA-MUC1の代表的な分子のひとつであるTn抗原を有するMUC1(以後Tn-MUC1)のみを認識エピトープとする、Tn-MUC1抗体(SN102)が開発された。本研究は同抗体に着目し、認識されるTn-MUC1の病理組織学的診断マーカーとしての有用性、乳癌の発生進展過程におけるTn-MUC1の発現動態や臨床的意義を明らかにすることを目的として行った。更に治療への応用の可能性を知るため、同抗体による抗体療法の実施可能性を検討した。

【対象と方法】

Tn-MUC1抗体(SN102)とともに、比較対照として既存のMUC1抗体(Ma552)を用いて免疫組織化学解析を行った。対象症例として、2000～2003年に北海道大学病院で外科的切除検体にて浸潤性乳癌(術前治療未施行)と診断され、薬物療法などの術前治療未施行な174例より、浸潤癌と非腫瘍の代表部からなる組織マイクロアレイ(TMA)を作製した。またMulti-lesion解析では、2015～2016年の北海道大学病院の切除乳癌症例から、同一病理切片内に非腫瘍、前癌病変(FEA)、非浸潤癌(DCIS)、浸潤性乳管癌(IDC)を含むと判断した26例のwhole sectionを用いた。免疫組織化学染色の評価にはHスコア法を用いた。光学顕微鏡下にて染色強度をスコア0(陰性)、スコア1(弱陽性)、スコア2(強陽性)の3段階にスコア化し、各強度の腫瘍細胞全体に占める占有率(%)を乗算した和(スコア0×a%+スコア1×b%+スコア2×c%)を総スコア(Hスコア)として用いた。TMA解析では、Tn-MUC1とMUCの発現状態、細胞内局在、

臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。Multi-lesion 解析では、非腫瘍-FEA-DCIS-IDC 移行における Tn-MUC1 発現状態と細胞内局在の変化を評価した。更にヌードマウスへ乳癌細胞株 MDA-MB-231 を移植した担癌動物モデルを用い、Tn-MUC1 抗体 (SN102) の抗腫瘍効果を検討した。

【結果】

TMAを用いた免疫組織化学的手法によるArea of under curve (AUC)値は、Tn-MUC1の全陽性反応（細胞質と細胞膜の反応）と細胞質陽性反応を対象とした評価結果で最も高く（いずれもAUC=0.95）精度の高さが確認された。ROC曲線から得られた至適カットオフ値の特異度は、MUC1が45.6であるのに対しTn-MUC1は97.5と高値であった。Whole sectionを用いたmulti-lesion解析により、Tn-MUC1の細胞質におけるHスコアは、非腫瘍-FEA-DCIS-IDCの各段階を追って漸増した（Hスコア平均値；非腫瘍 12.1, FEA 58.4, DCIS 94.8, IDC 102.4）。これらの検討の中でTn-MUC1は、FEAやDCISでは細胞膜と細胞質に、IDCでは細胞質に発現していた。臨床病理学的因子との関連性の検討により、Tn-MUC1陽性は、ホルモン受容体陽性/HER2陰性/低増殖能タイプでは予後良好な傾向を示し、高増殖能の乳癌において有意な予後不良因子であった（OS； $p=0.0020$, DFS； $p=0.0436$ ）。ヒト乳癌細胞株を移植した担癌マウスモデルにおいて、Tn-MUC1抗体 (SN102) の投与による部分的な腫瘍増殖抑制効果が観察された。

【考察】

Tn-MUC1抗体の乳癌に対する特異性は高く、診断マーカーとしての有用性が明らかとなった。Tn-MUC1抗体による陽性反応が現在推定されている乳癌発生過程の早期から出現することから、Tn-MUC1抗体が乳癌の発生過程におけるTA-MUC1発現の意義を解析するためにも、前癌病変の病理組織学的鑑別の補助診断ツールとしても、有用な抗体であることが示された。更にTn-MUC1が、現在推定されている乳癌発生過程の早期では細胞膜と細胞質に発現し、浸潤癌の段階では細胞質に蓄積する現象が明らかとなった。臨床病理学的因子との検討により、乳癌はTn-MUC1発現意義が異なるヘテロな集団である可能性が示唆された。更にTn-MUC1の治療標的としての有用性、Tn-MUC1抗体を用いた治療応用の可能性が示された。

【結論】

本研究は、Tn-MUC1 抗体 (SN102) が、TA-MUC1 のひとつである Tn-MUC1 の局在変化や性質を評価する上で有用なツールであることを明らかにした。同抗体により認識される Tn-MUC1 が、乳癌の診断や治療への有用性が期待される有望な分子であることを示した。加えて、これまで難しいとされてきた組織細胞検体での MUC1 上の糖鎖構造変化が可視化できることを初めて示した。MUC1 の質的量的変化を観察することが、乳癌の発生進展過程の本態の解明に寄与する可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

VNTR	Variable number tandem repeat
TA-MUC1	Tumor associated MUC1
Cyto	Cytoplasm
Mem	Membrane
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamine
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamine
SA	Sialic acid
STn	Sialyl Tn
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
HE	Hematoxylin and eosin
TMA	Tissue microarray
IDC	Invasive ductal carcinoma
ILC	Invasive lobular carcinoma
MC	Metaplastic carcinoma
SCC	Squamous cell carcinoma
FEA	Flat epithelial atypia
NonN	Non-neoplastic area
IC	Invasive carcinoma
ER	Estrogen receptor
PGR	Progesterone receptor
HER2	Human epidermal growth factor receptor type 2
RTU	Ready to use
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
FBS	Fetal Bovine Serum
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute media
DBPS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PBS	Phosphate Buffered Saline
AUC	Area of under curve

HR	Hormone receptor
Lum A-like	Luminal A like
Lum B-like	Luminal B like
TN	Triple negative
OS	Overall survival
DFS	Disease-free survival
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
IDC	Invasive ductal carcinoma
ADH	Atypical ductal hyperplasia
ALH	Atypical lobular hyperplasia
GEP	Gene expression profiling
CAR-T	Chimera Antigen Receptor T-cell Therapy

緒言

MUC1は、生体内で消化管や気道など、種々の腺上皮細胞の apical cell surface を被う、高分子の粘液性膜貫通型タンパク質である (Patton et al., 1995). これは細胞表面の物質移動の潤滑化や細胞保護作用を担うとともに (Brayman et al., 2004; Gendler, 2001), 情報伝達や細胞間接着にも関与していると考えられている (Hattrup and Gendler, 2006). MUC1は1本のポリペプチド鎖として細胞質内で生合成された後、細胞膜への輸送過程において、コアタンパク質内の sea urchin sperm protein enterokinase and agrin (SEA) ドメイン内で2本鎖に自己切断される。そしてMUC1-N terminal subunitとMUC1-C terminal subunitの非共有結合からなるヘテロ二量体となり、細胞表面に発現する (Nath and Mukherjee, 2014). MUC1の細胞外領域の大部分を占めるMUC1-N terminal subunitのコアタンパク質には serine, threonine 残基に富んだ20種類のアミノ酸配列の繰り返し構造 (variable number tandem repeat; VNTR) がみられる (図1). VNTRの serine, threonine に、一連の糖転移酵素が連続的に働くことで、*O*-グリコシド型糖鎖が豊富に付加(グリコシル化)される (Lloyd et al., 1996). またMUC-1 C terminal subunitは58アミノ酸からなる短い細胞外領域, 28アミノ酸からなる膜貫通領域, 72アミノ酸からなる細胞質内領域で構成される (Kohlgraf et al., 2003; Wesseling et al., 1996; Wesseling et al., 1995).

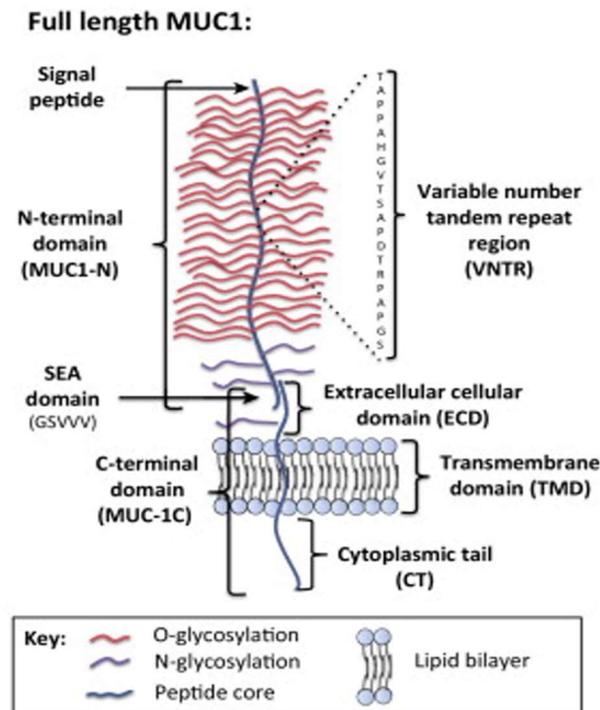


図1 正常細胞における MUC1 (full length) の構造 Nath and Mukherjee, 2014 より改変

MUC1は、乳癌(Hayes et al., 1991; Nacht et al., 1999; Perey et al., 1992), 卵巣癌(Avichezer et al., 1998), 膵臓癌(Burdick et al., 1997), 肺癌(Maeshima et al., 1997; Willsher et al., 1993), 前立腺癌(Zhang et al., 1998), 結腸癌(Burdick et al., 1997; Medina et al., 1999), 胃癌(Strous and Dekker, 1992), 胆嚢癌(Kashiwagi et al., 2000)など, 多種のヒト上皮性悪性腫瘍で過剰発現する. 更に MUC1 の発現は, 星状細胞腫, メラノーマおよび神経芽腫(Oosterkamp et al., 1997), そして多発性骨髄腫や一部のB細胞リンパ腫(Brossart et al., 2001; Burton et al., 1999; Dyomin et al., 2000)などのリンパ球系腫瘍においても報告されており, MUC1 発現は全腫瘍の50%以上に及ぶという(Greenlee et al., 2000). MUC1 の発現量と患者の予後には相関性があることが知られている(Kufe et al., 1984; Nakamori et al., 1994). またこれまでの基礎研究により, 腫瘍組織における MUC1 発現は, 細胞の増殖, 形質転換, 接着, 浸潤および免疫細胞の応答性および治療抵抗性などに関連しているとされる(Beatson et al., 2015; Julien et al., 2006; Julien et al., 2011; Julien et al., 2005; Kufe, 2013; Murugaesu et al., 2014; Singh and Bandyopadhyay, 2007). そのため MUC1 は, 臨床的に血中の腫瘍マーカーや(Duffy, 1999; Duffy et al., 2000; Safi et al., 1991) 癌免疫療法や抗体薬などの治療標的分子としても注目されている(Beatson et al., 2010; Ibrahim et al., 2011; Kimura and Finn, 2013; Kimura et al., 2013).

腫瘍組織で発現する MUC1 (tumor-associated MUC1; TA-MUC1) は, 細胞内分布と, 化学構造の両方が, 正常細胞で発現されるものとは異なるとされる(Nath and Mukherjee, 2014). 正常細胞では MUC1 が apical cell surface にみられるのに対し, TA-MUC1 は細胞膜全周(membrane; mem)ないしは細胞質(cytoplasm; cyto)へ局在が変化するといわれている(図2). また正常細胞では, コアタンパク質が高度にグリコシル化され, 成熟した MUC1 として機能するのにに対し, TA-MUC1 ではコアタンパク質上の糖鎖構造が短縮し, 短く異常な癌関連糖鎖が発現するようになると考えられている.

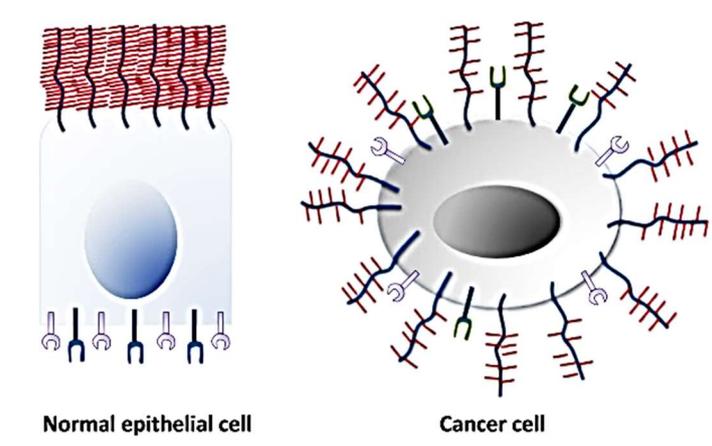


図2 MUC1 の癌性変化

A : 正常細胞 B : 癌細胞
Nath and Mukherjee, 2014
より改変

乳癌は、その大部分が MUC1 を発現することから (Hayes et al., 1991; Nacht et al., 1999; Perey et al., 1992), 現在までに既存の MUC1 抗体を用いた数々の研究の対象として使用され, その中で MUC1 の局在についても報告がなされてきた. それらは異なる抗体と様々な判定方法で行われてきたが, 概ね一致している見解は, 既存の MUC1 抗体の陽性反応が, ER 陽性, 組織学的低グレードなどと相関しているということである (Rahn et al., 2001). 細胞レベルの局在に着目した検討では (Ceriani et al., 1992; Hayes et al., 1991; McGuckin et al., 1995), 細胞外沈着, apical cell surface や細胞膜への陽性所見, あるいは完全な陰性所見を予後良好因子, 細胞質への陽性像を予後不良因子として挙げている報告が多い. しかし用いられた抗体試薬に依存するように, これらの結果にはばらつきが大きい. 近年, MUC1 に対する市販抗体のエピトープが網羅的に検討され, 既存の市販抗体の多くは MUC1 コアタンパクの VNTR の一部を認識するものの, いずれの抗体も *O*-グリコシル化された糖ペプチド構造の差異を認識しないことが明らかになった (Blockzijl et al., 1998; Matsushita et al., 2014). そのため, 細胞内局在の検討など, 癌関連糖鎖を含む TA-MUC1 に関する免疫組織化学的な詳細な解析は, これまでは困難とされてきた.

TA-MUC1 の糖鎖構造変化, つまりタンパク質の翻訳後修飾である *O*-グリコシド型糖鎖の付加は, ゴルジ体において各々の糖転移酵素により行われる. ただし糖転移酵素には複数のアイソザイムが存在する他, 同じ単糖を同じ結合様式で転化する酵素にも, 様々な基質特異性をもつ複数の集団があり, 非常に複雑なプロセスで, 糖鎖修飾の全容解明を困難にしている (Potapenko et al., 2010). 通常, *O*-グリコシル化の第 1 段階は, コアタンパク質の serine, threonine への *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc) の転移である. 正常な細胞では, 糖転移酵素の連続した反応によって Galactose と GlcNAc が繰り返し付加され糖鎖伸長が次々と進み, 最終的には Sialic acid (SA) や Fucose などの結合で修飾される. しかし TA-MUC1 では糖転移酵素の異常などにより糖鎖の伸長が止まり, その結果糖鎖が短縮する (Fu et al., 2016; Potapenko et al., 2010). 例えば Core 1 β 1, 3-galactosyltransferase (C1 β 3GalT) 活性が低下すると GalNAc 以降の糖鎖転移が停止し Tn 抗原の発現が増加する (Cazet et al., 2010). 更に, α 2, 3-および α 2, 6-sialyltransferase (sialylT) などの発現により SA が付加された場合は Sialyl Tn 抗原 (STn 抗原) が生じる (図 3) (Fu et al., 2016; Nath and Mukherjee, 2014; Potapenko et al., 2010).

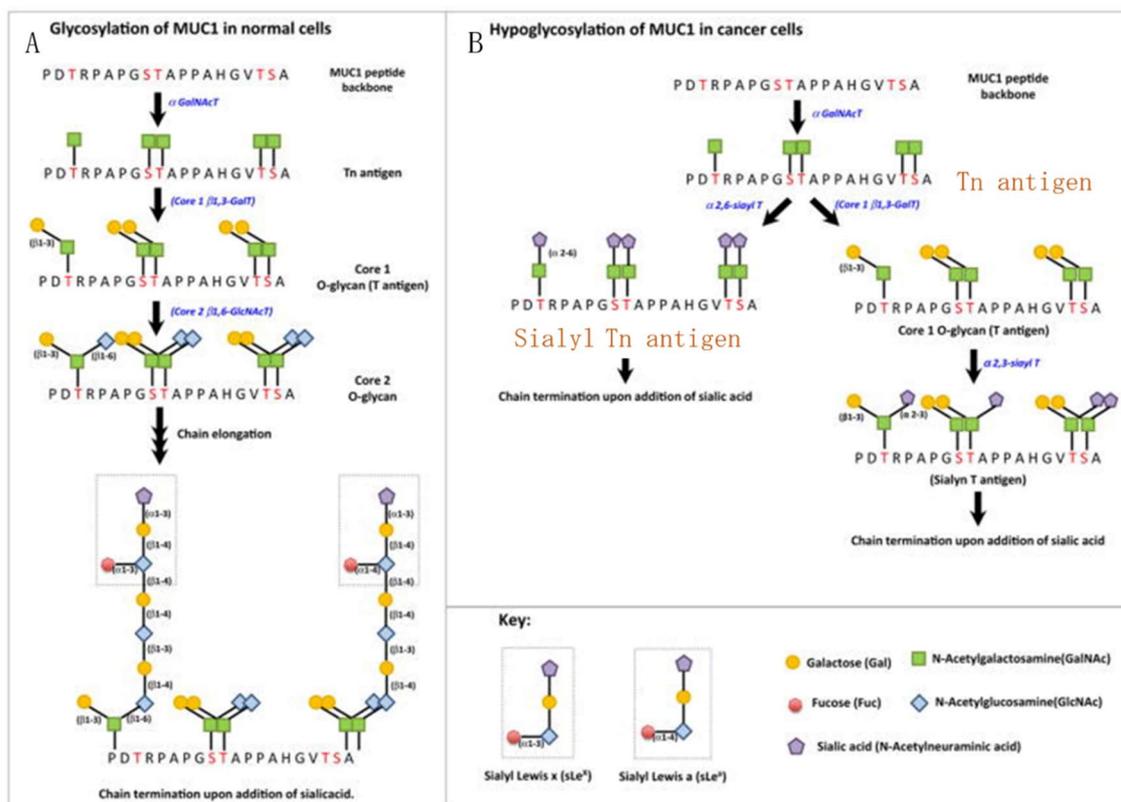


図3 MUC1の糖転移の工程

A: 正常細胞における工程 B: 癌細胞における工程 Nath and Mukherjee, 2014より改変

Tn抗原, STn抗原は、正常細胞では殆ど観察されないことから癌関連糖鎖と呼ばれ、MUC1のコアタンパク上にも認められる。Tn抗原は乳癌の90%, STn抗原は30%に発現しているとされる(Cazet et al., 2010)。乳癌検体を用いた研究では、Tn抗原やSTn抗原に対するモノクローナル抗体の陽性反応や、代表的な糖転移酵素の発現や活性が、癌細胞で上昇し、予後不良因子であることが報告されている(Cazet et al., 2010; Cho et al., 1994; Fu et al., 2016; Recchi et al., 1998; Sewell et al., 2006; Welinder et al., 2013)。しかし、それらの癌関連糖鎖抗原の結合部位や糖転移酵素はMUC1のみを基質としているわけではなく、MUC1の糖鎖構造変化については、未だ不明な点が多い。

このようにTA-MUC1をめぐることは、既存のMUC1抗体ではTA-MUC1の糖鎖構造変化を識別できず、一方で癌関連糖鎖抗原や糖転移酵素に焦点を合わせるとその標的を必ずしもMUC1に限定できないことが課題であった。そこで近年、我々の共同研究施設(医化学創薬研究所)が、これらの課題を解決すべく新規抗体を開発した。この新規抗体は、MUC1のVNTRのペプチドと糖鎖両方の立体構造を認識することを目指し、これまでの生化学的手法とは異なる方法で開発された。まずヒトMUC1のVNTRのthreonineをGalNAcで修飾、つまりMUC1にTn

抗原を付加した糖ペプチドを化学合成した。この糖ペプチドを抗原とし、常法で作製した複数のモノクローナル抗体の特異性を、MUC1 由来の糖ペプチドやその類縁体を固定化した特殊な糖ペプチド固定化アレイ (Matsushita et al., 2014) を用い解析した (図 4)。その結果、Tn 抗原が修飾された MUC1 糖ペプチドへの強い親和性を示し、STn など他の抗原が付加された MUC1 糖ペプチドには結合しないか弱い結合を示し、糖鎖を有さない MUC1 ペプチドや、MUC2 や MUC4 に Tn 抗原が修飾された糖ペプチドとは結合しない clone が選別された。こうして、Tn 抗原が転移した MUC1 の VNTR をエピトープとすることが厳密に定義された、新規の TA-MUC1 を認識する抗体として、Tn-MUC1 抗体 (clone SN102, 以下 SN102) が作製された。

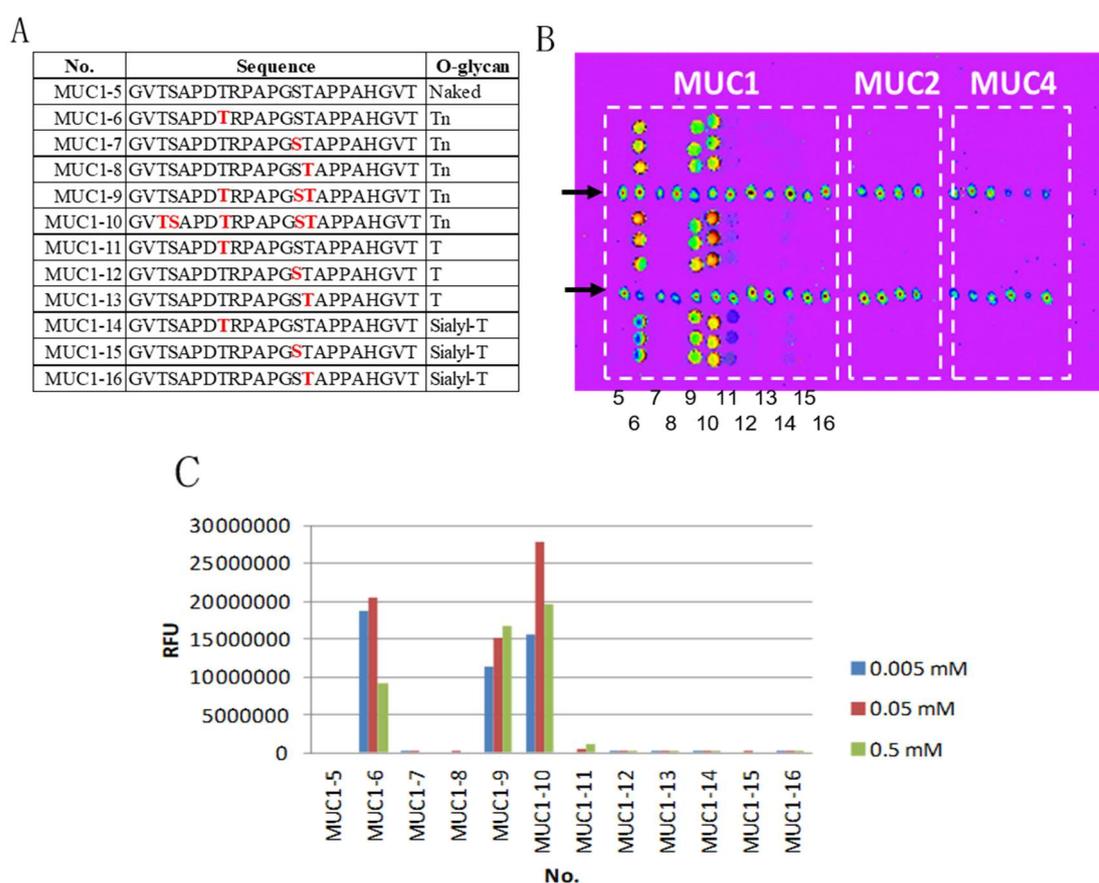


図 4 糖ペプチド固定化アレイを用いた Tn-MUC1 抗体 (SN102) の反応性評価
A. アレイ上に固定された、MUC1 糖ペプチド構造の詳細。赤字は O-グリコシル化の位置。B. MUC1, MUC2 および MUC4 糖ペプチド固定化アレイにおける Tn-MUC1 抗体 (SN102) 結合の確認の蛍光イメージ。MUC1 レーンでは Tn-MUC1 抗体との反応による蛍光が検出されるが、MUC2 や MUC4 レーンでは反応がみられない。黒矢印はグリッドマーカー。C. MUC1 糖ペプチドに対する Tn-MUC1 抗体の結合性の比較。RFU: 相対蛍光強度 (relative fluorescence units)。

乳癌は、その90%以上がMUC1を発現し(Hayes et al., 1991; Nacht et al., 1999; Perey et al., 1992), MUC1 (CA15-3) が再発・転移を検出する血中の腫瘍マーカーとして一般的に利用されている癌腫である(Duffy, 1999; Duffy et al., 2000; Safi et al., 1991) . 国立がん研究センターの最新がん統計によると、乳癌は本邦の女性が罹患する癌のうち最も頻度が高く、死亡数も第5位を占める。病理組織学的にはほとんどが乳管癌、小葉癌で、いずれも腺癌である。それぞれが前癌病変、非浸潤癌、浸潤癌と段階的に発育進展すると考えられている。治療介入の要否やその方法は、多くの場合針生検による病理所見と画像所見、臨床所見を総合して判断される。病理学的には、他臓器の腫瘍に先んじて、形態所見に加え免疫組織化学による層別化が進められており、乳癌をluminal A-like (HR+/HER2-/low proliferation/low grade) , luminal B-like (HR+/HER2-/high proliferation/high grade) , HR+/HER2+, HR-/HER2+, triple negative (HR-/HER2-)の5亜型に分類し、腫瘍の特性に応じた個別化治療を行うことは既に標準的治療となっている(Curigliano et al., 2017; Goldhirsch et al., 2013; Goldhirsch et al., 2011). そのうえで近年は、治療抵抗性が問題となる triple negative type を筆頭とする克服すべき症例群を対象に、新たに解明されつつある癌自体の生物学的多様性や、治療選択肢の多様化に対応した症例層別化に寄与するバイオマーカーの探索が続いている。我々は乳癌においてMUC1の腫瘍マーカーとしての臨床導入が最も進んでいながら、病理組織学的診断や治療選択に関わるマーカーとしての有用性が未だ確立されていないことに着目した。そして乳癌において新規 Tn-MUC1 抗体の特性を検討することが、MUC1の組織発現を新たな視点で見直すことに繋がると考えた。

本研究では、新規 Tn-MUC1 抗体に着目し、TA-MUC1の一種である Tn-MUC1の乳腺組織における発現分布や局在を免疫組織化学的に検討することにより、病理組織学的診断マーカーとしての有用性、乳癌の発生進展過程における Tn-MUC1の挙動や意義、そして Tn-MUC1を認識するツールとしての妥当性を検討した。更に臨床応用の可能性として、同抗体の抗体薬としての使用可能性を検討した。

方法

1. 対象症例

北海道大学病院で手術が施行され、組織学的に浸潤性乳癌と診断された腫瘍のホルマリン固定・パラフィン包埋（FFPE）組織検体を用いた。本研究に際し、病理医が改めて HE 染色標本をレビューし、組織型、グレード、浸潤径と併せ、腫瘍の大きさについて確認した。本研究は北海道大学病院倫理委員会に承認を得たプロトコールに基づき、過去の手術検体、生検検体を用いることから、研究利用に対し包括同意を得た患者を対象とした。また、研究の遂行に当たり、患者情報はすべて連結可能なかたちで匿名化し、本研究の実施にあたっては北海道大学病院の自主臨床研究倫理審査委員会の承諾を得た。

2. 組織マイクロアレイ（TMA）解析のための症例選択

2000～2003 年の乳癌切除材料によって浸潤性乳癌と診断された 191 例のうち、薬物療法などの術前治療未施行な 174 例について、TMA 標本を作製した。各症例の HE 染色標本に、浸潤癌と非腫瘍の代表部を特定し印をつけ、同部に相当するパラフィンブロックの部位を、2.0 mm の針をセットしたアレイヤー（Sakura Finetek Japan）で円柱状にくりぬき（コア）、あらかじめ円柱状に穴をあけた別のパラフィンブロックに埋めるという方法で、組織マイクロアレイ（TMA）ブロックを作製した。同一個体の浸潤癌と非腫瘍はそれぞれのコアを並べて作製した。また、作製した TMA ブロックは薄切後に HE 染色を行い腫瘍細胞の有無を確認した。その結果、引き続き免疫組織学的評価が可能であったのは 144 例であり（組織型内訳；invasive ductal carcinoma 135 例，invasive lobular carcinoma 7 例，metaplastic carcinoma (squamous cell carcinoma) 1 例，invasive micropapillary carcinoma 1 例）このうち臨床病理学的因子に関する情報が得られた 124 例，生存期間に関する情報を入手できた 118 例を解析に用いた（表 1）。

表1 検討した浸潤性乳癌症例の臨床病理学的特徴

Clinicopathological parameter	N
Age	
≤55/55<	68/56
pT	
1/2/3/4	91/30/3/0
pN ^{*1}	
negative/positive	49/67
WHO grade	
1/2/3	47/62/15
Subtype ^{*2}	
HR+/HER2-/low proliferation/low grade; luminal A-like	72
HR+/HER2-/high proliferation/high grade; luminal B-like	13
HR+/HER2+	15
HR-/HER2+	9
HR-/HER2-; triple negative	15
Histology	
IDC/ILC/MC(SCC)	117/6/1

^{*1} pN 因子が評価された症例について検討した

^{*2} ザンクトガレンコンセンサス会議 2017 で提示された「サブタイプ分類」に従って分類した。 HR; Hormone receptor

3. Multi-lesion 解析のための症例選択

2015～2016年の乳癌切除材料の183例から、術前治療未施行で、同一FFPEブロック内に非腫瘍、前癌病変(FEA)、非浸潤癌(DCIS)、浸潤性乳管癌(IDC)を含み、本研究に使用可能と判断した26例の代表的ブロック1個を選び、そのwhole sectionを検討対象とした。

4. 抗体

TA-MC1を認識する抗体として、Tn-MUC1抗体(SN102)、STn-MUC1抗体(clone SN121, 以下SN121)については医化学創薬研究所より供与された。その他、複数の市販MUC1抗体ならびに、乳腺の分子診断マーカーとして日常診断で汎用されるER, PGR, HER2, 細胞増殖マーカーであるKi-67についても検討を行った(表2)。

表 2 使用した抗体

Antigen (IHC)	Antibody(clone)	Source		Dilution
Tn-MUC1	Monoclonal (SN102)	MCP	Sapporo, Japan	1:500
STn-MUC1	Monoclonal (SN121)	MCP	Sapporo, Japan	1:100000
MUC1	Monoclonal (Ma552)	Novocastra	Newcastle, UK	1:100
MUC1	Monoclonal (DFS)	Toray-Fuji Bionics	Tokyo, Japan	1:200
MUC1	Monoclonal (E29)	Dako	Glostrup, Denmark	1:1600
ER	Monoclonal (6F11)	Ventana	Arizona, USA	RTU
PgR	Monoclonal (1A6)	Ventana	Arizona, USA	RTU
HER2	Monoclonal (4B5)	Ventana	Arizona, USA	RTU
Ki-67	Monoclonal (MIB-1)	Dako	Glostrup, Denmark	1:200
Antigen (IF)	Antibody(clone)	Source		Dilution
Rab11	Monoclonal (D4F5)	CST	Danvers, USA	1:50
Tn-MUC1	Monoclonal (SN102)	MCP	Sapporo, Japan	1:500
MUC1	Monoclonal (Ma552)	Novocastra	Newcastle, UK	1:100
EpCAM	Monoclonal (HEA125)	Abcam	Cambridge, UK	RTU

免疫組織化学染色 (IHC; immunohistochemical staining) , 免疫蛍光染色 (IF; immunofluorescence staining) , 希釈済み抗体 (RTU; Ready to use)

5. 免疫組織化学 (IHC) 染色法

TMA および Whole section の FFPE ブロックはいずれも厚さ 5 μ m に薄切した。薄切切片を脱パラフィンし、水洗後、抗原賦活化処理装置 (PTLink Dako) により EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (Dako, pH9.0) もしくは LOW pH (Dako, pH6.1) 中で 97°C にて 20 分間加熱し、抗原を賦活化した。その後、抗体 (表 2) と下記の濃度で 30 分間反応させ、Envision Flex System (Dako) のポリマー試薬にて抗原を検出した。免疫染色には自動免疫染色装置 (Autostainer Link, Dako) を使用した。

6. 免疫組織化学 (IHC) 評価法

TMA および Whole section を用いた免疫組織化学法による染色標本は、2 名の病理医によって判定し、陽性反応を次のように評価した。Tn-MUC1 抗体、

MUC1 抗体, STn-MUC1 抗体は, 光学顕微鏡下にて染色強度をスコア 0 (陰性), スコア 1 (弱陽性), スコア 2 (強陽性) の 3 段階にスコア化し(図 5), 各強度の腫瘍細胞全体に占める占有率 (%) を乗算した和 (スコア 0 × a % + スコア 1 × b % + スコア 2 × c %) を総スコア (H スコア) として判定した. ER および PGR は, 日常診断にて使用している基準 (カットオフ値 1 %) を用いて陽性・陰性の 2 段階で評価した. HER2 は, 日常診断に使用している HER2 検査判定基準 (スコア 0~スコア 3) に準じ判定し, スコア 2 以上を陽性とした. Ki-67 は画像解析システム Tissue Studio (CTC Laboratory System Corporation, Japan) にて定量評価し, 2011 年のザンクトガレン会議で示された 14 % をカットオフ値として用いた.

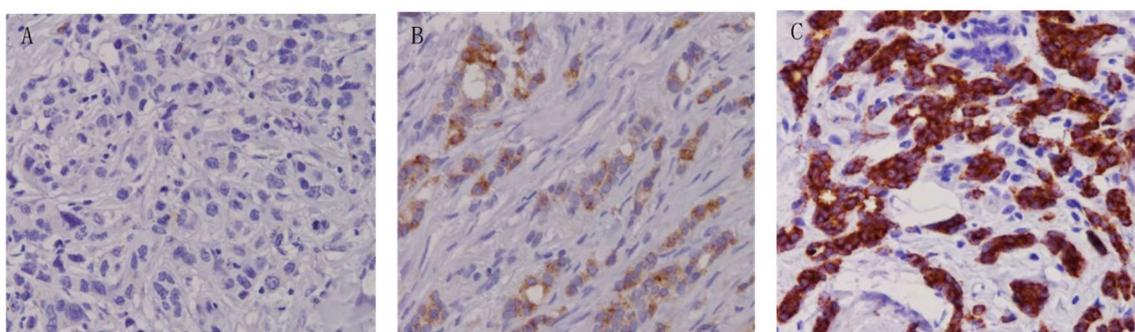


図 5 免疫組織化学法による染色強度の評価

A: Score 0, B: Score 1, C: Score 2

7. 免疫蛍光二重染色法

FFPE ブロックから厚さ 5 μ m に薄切した切片に対し, Opal™ 4-7-color Manual IHC Kit による蛍光二重染色を施行した. 脱パラフィン, 再水和の後, 抗原賦活化処理装置 (PTLink Dako) により EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (Dako, pH6.1) 中で 97°C にて 20 分間加熱し, 抗原を賦活化した. 1 次抗体として, EpCAM あるいは Rab11 を用い, 下記の濃度で 30 分間反応させた (表 2). Envision Flex System (Dako) を用いたポリマー試薬と反応させたのち, Opal Fluorophore (red) Working Solution で発色させた. 引き続き EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (Dako, pH9.0) で再賦活後, 2 種目の 1 次抗体として Tn-MUC1, MUC1 (Ma552) を用い, 下記の濃度で 30 分間反応させた (表 2). 上記同様にポリマー試薬と反応させたのち, Opal Fluorophore (green) Working Solution で発色させた. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核の対比染色を行った後, 蛍光顕微鏡で画像の取得を行った.

8. FCMによるMUC1発現細胞の細胞表面におけるSN-102の発現

乳癌細胞株 MCF-7 と MDA-MB-231 を 10%FBS を含む D-MEM 中で、5% CO₂ 下、37°C で培養した。細胞を Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-based (Gibco) を用いて回収した後に、 $0.1-1.0 \times 10^6$ 個に調整し、Tn-MUC1 抗体 (5 μ g/mL) を反応させた。陽性コントロールとして MUC1 抗体 (DF3)、陰性コントロールとして Purified Mouse IgG1 κ Isotype Control (BD Biosciences) を用い、氷上にて、各々 1 時間反応させた。抗体溶液を除き、PBS で洗浄した後に、蛍光色素で標識した 2 次抗体 Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment, Alexa Fluor® 488 Conjugate (Cell Signaling) を反応させた。DPBS (-) で洗浄後、FACS Verse (BD Biosciences) により解析した。

9. ノードマウスへの乳癌細胞株移植腫瘍を用いた抗腫瘍効果評価

ヒト乳癌細胞株をノードマウスへ移植し、異種移植モデルを作製した。移植細胞株として MDA-MB-231 を用い、細胞は腫瘍移植時まで 15% FBS Certified One Shot™ 含有 RPMI-1640 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 2 回/週継代培養を行った。4 週齢 BALB/c-nu/nu (SPF) 雌性マウスは、日本チャールスリバー (株) より入手した。MDA-MB-231 を必要数まで拡大培養した後、細胞を回収し、細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液を遠心し、上清を捨てた細胞沈渣を PBS (-) で遠心洗浄後、再度 PBS (-) に懸濁し、細胞数を所定の濃度に調製した。調製した細胞懸濁液を注射針及びディスポーザブルシリンジを用いて 5 週齢に達したマウスの皮下組織に 5×10^6 cells/100 L の割合で移植した。

Tn-MUC1 抗体 (SN102) は秤量後に生理食塩水に溶解した。Docetaxel はエタノール Tween80 混液に溶解し、5% グルコース溶液を用いて終濃度がエタノール : Tween80 : 5% グルコース溶液 = 5 : 5 : 90 になるように調製した。Control 群用には、エタノール Tween80 混液 (エタノール : Tween80 = 1 : 1) となるように混合した。担癌マウスは、移植後の腫瘍体積が 50~130 mm³ に達した個体を用いて、1 群 15 匹で 4 群 (Control 群, Tn-MUC1 抗体単独群, Docetaxel 単独群, Tn-MUC1 抗体+Docetaxel 併用群) として一定期間投与した (投与スケジュールおよび投与量については、特許出願予定のためデータ示さず)。本マウス実験は「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、外部委託機関 (新薬リサーチセンター 中央研究所社) において、動物実験に関する基本指針その他関係法令等に基づいていることを確認し実施した。

10. 統計学的解析

各因子の発現と各臨床病理学的因子との関係について、Pearson's χ^2 検定を用いて検証した。多群間の差は分散分析を用い、Tukey HSD 検定で多重比較を行った。各因子の発現と生存期間の解析は、全生存期間 (overall survival;

OS) と無再発生存期間 (disease-free survival; DFS) を Kaplan-Meier 法で算出し, log-rank 検定を用いて生存曲線の比較を行った. 担癌マウスに対する被験物質投与実験において, Control 群に対する SN102 単独, Docetaxel 単独, 及び SN102 と Docetaxel 併用群の比較は, Bartlett 法により等分散性の検定を行い, 等分散の場合は更に一元配置分散分析を行い, 有意な場合は Dunnett 法により平均値の比較を行った. 不等分散の場合は Kruskal-Wallis の H 検定を行い, 有意な場合は Dunnett 法により平均順位の比較を行った. Dunnett 法については有意水準を危険率 5%及び 1%, その他の検定は危険率 5%として判定した. 統計学的検討は統計ソフト JMP Pro Statistical Software (Version 13.0.0, © SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いて行った.

結果

1. 抗体のバリデーション

パイロット研究として、数コアの TMA を用いて検討した (図 6) . 市販の MUC1 抗体 (clone DF3, E29, Ma552) は非腫瘍への染色性を示すのに対し (図 6 b-d), TA-MUC1 を認識する新規の Tn-MUC1 抗体は, 正常組織への反応性が極めて低いことが明らかとなった (図 6 e) . 既存の MUC1 抗体間の比較で, いずれも同様の染色性を示したことから, これ以降の Tn-MUC1 抗体との検討には, 3 抗体のうち日常病理診断において汎用されている Ma552 を選択し既存 MUC1 抗体として使用した.

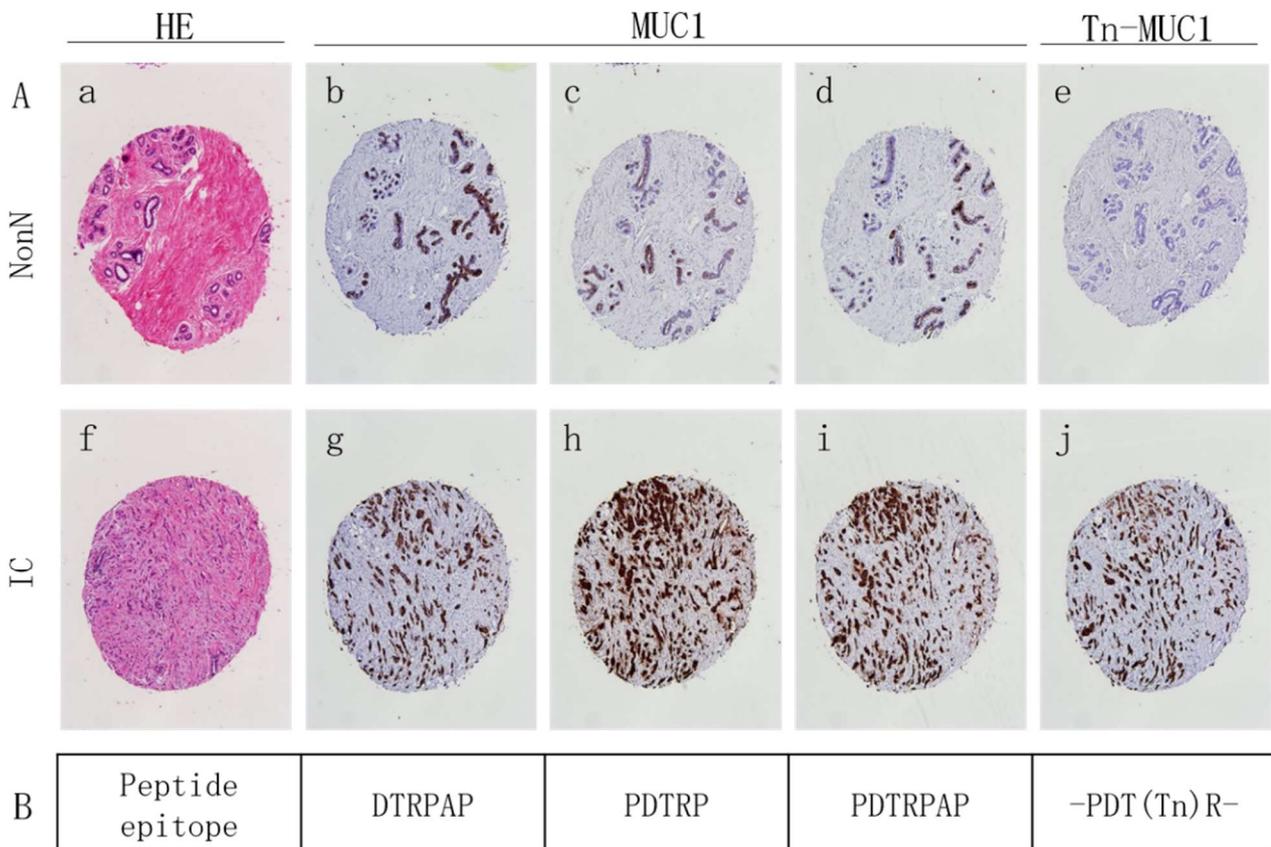


図 6 Tn-MUC1 と, 代表的な市販 MUC1 抗体の比較

A. 非腫瘍と浸潤癌に対する陽性反応 a, f: HE, b, g: DF3, c, h: E29, d, i: Ma552, e, j: SN102, b-d, g-i: MUC1, e, j: Tn-MUC1 NonN; Non-neoplastic area, IC; Invasive carcinoma) B. 各抗体のエピトープ, アミノ酸略号 D; Aspartic acid, T; Threonine, R; Arginine, P; Proline, A; Alanine

2. TMA 解析による Tn-MUC1 および MUC1 の免疫組織化学的定量評価

TMA コアの H スコアを検討したところ、Tn-MUC1 抗体と MUC1 抗体を用いた陽性反応の H スコアは非腫瘍より浸潤癌が有意に高かった (いずれも $P < 0.0001$)。ただし Tn-MUC1 抗体の非腫瘍における H スコアは極めて低かった (平均 4.7), MUC1 抗体の非腫瘍における H スコアはより高値であった (平均 63.9)。 (図 7B)。

H スコアによる評価を行う中で、Tn-MUC1 抗体と MUC1 抗体の陽性反応では、その染色パターンが明らかに異なることがわかった。すなわち、Tn-MUC1 抗体は細胞質への陽性像がみられる一方で明瞭な細胞膜への陽性像が乏しいのに対し、MUC1 抗体では細胞質と細胞膜が共に陽性となる例が多かった (図 7A)。

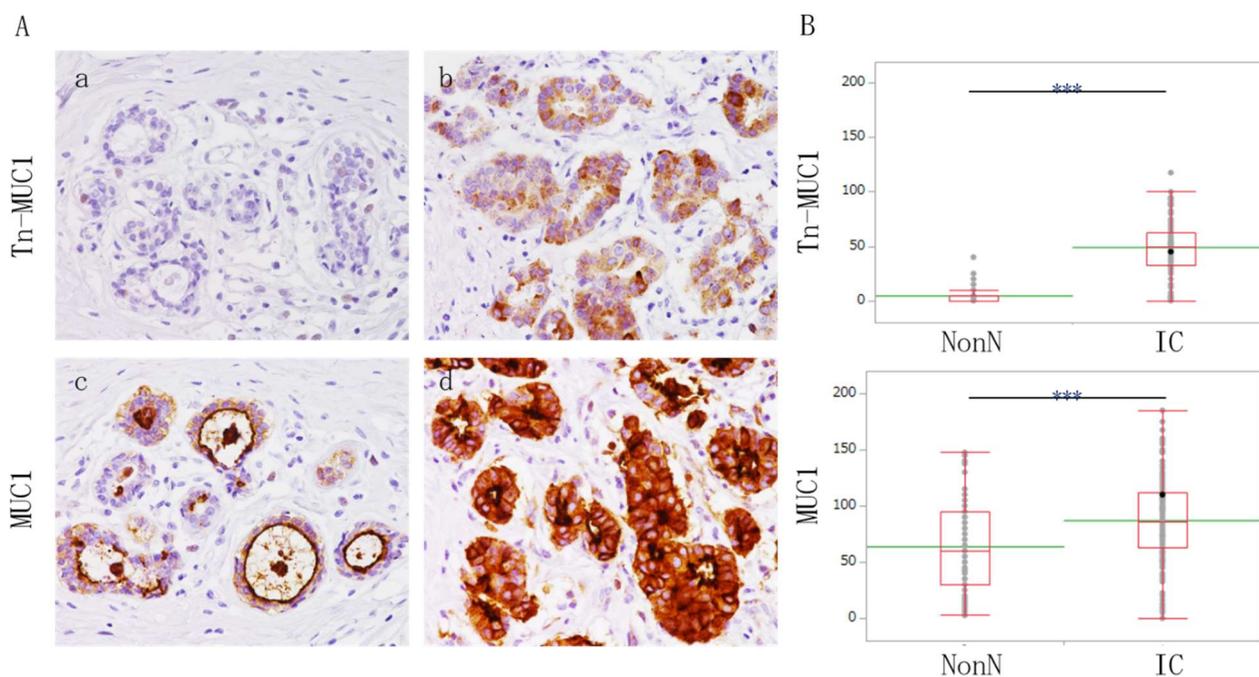


図 7 Tn-MUC1 および MUC1 の免疫組織化学的定量評価

Tn-MUC1 と MUC1 の代表的な発現パターン a, c: NonN, b, d: IC B. Tn-MUC1 と MUC1 の H スコア ***: $p < 0.0001$

3. Tn-MUC1 および MUC1 の細胞内局在間の発現状態の比較

次に、陽性反応を細胞質と細胞膜、すなわち細胞内局在別に H スコア化して定量評価を試みた。その結果、Tn-MUC1 抗体と MUC1 抗体の細胞質への陽性反応は、それぞれ全陽性反応（細胞質と細胞膜の反応）における H スコア（図 7）と同様の傾向を示したが、非腫瘍と浸潤癌の差がより顕著になった。特に細胞質における Tn-MUC1 抗体の H スコアは低く（平均 8.8）、浸潤癌で高かった（平均 97.1）。一方、Tn-MUC1 抗体による細胞膜の H スコアは非腫瘍、浸潤癌ともに低値なのに対し（平均 0.6, 1.4）、MUC1 抗体による細胞膜の H スコアは、非腫瘍が浸潤癌より高かった（平均 85.7, 57.8）（図 8A）。Tn-MUC1 の細胞内局在についてより詳細に検討するため、免疫蛍光二重染色を施行した。浸潤癌において、Tn-MUC1 抗体に対する陽性反応は主として細胞質内に認められ（図 8B-a）、細胞膜（EpCAM 陽性；図 8B-b）に一致した陽性反応は僅かであった。非腫瘍においては、同抗体での陽性反応は殆どみられなかった（データ示さず）。

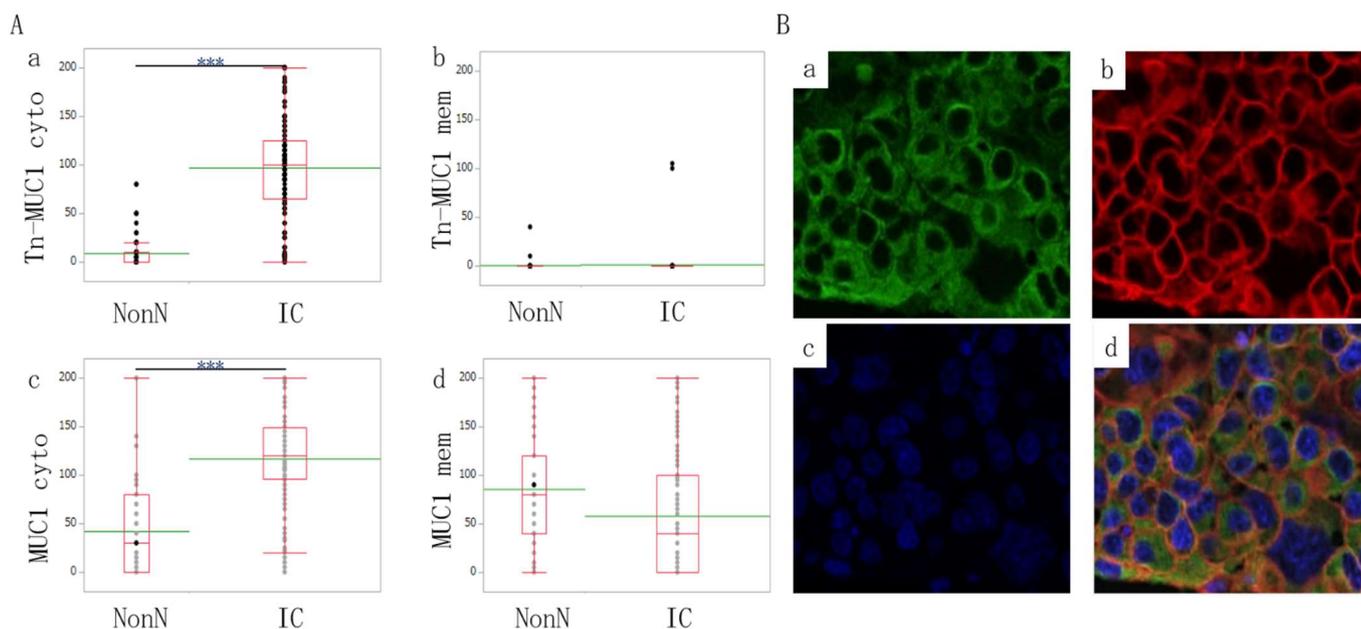


図 8 Tn-MUC1 および MUC1 の細胞内局在間の発現状態の比較

A. Tn-MUC1 と MUC1 の細胞内局在別 H スコア a, c: 細胞質 (cyto; cytoplasm), b, d: 細胞膜 (mem; membrane), ***: $p < 0.0001$ B. 免疫蛍光抗体法による Tn-MUC1 の代表的な発現パターン a: Tn-MUC1 b; EpCAM, c: DAPI, d: Merge

4. Tn-MUC1 発現乳癌症例における Rab11 の分布

浸潤癌において、MUC1 の発現が細胞膜と細胞質に観察されるのに対し、Tn-MUC1 の発現は極端に細胞質優位であった。その原因として膜輸送動態の変化を候補に挙げ、タンパク質のリサイクリングシステムを調節する因子の発現に差がみられるかどうかを検討した。代表的なリサイクリングエンドソームマーカである Rab11 と、Tn-MUC1 の発現状態を免疫蛍光二重染色により検討した。Tn-MUC1 高発現細胞と低発現細胞が混在する不均一性を示す乳癌組織において検討を行ったところ(図 9b, e), Tn-MUC1 と Rab11 の発現に逆相関傾向が観察された。すなわち Tn-MUC1 高発現細胞では Rab11 蛍光シグナルが低く(図 9d, e, f 白矢印)、逆に Tn-MUC1 低発現細胞では Rab11 蛍光シグナルが高くなる傾向(図 9d, e, f 黄色矢印)が見出された。同一視野における MUC1 の発現は均一で(図 9a), Rab11 との二重染色で逆相関傾向は明らかではなかった(データ示さず)。

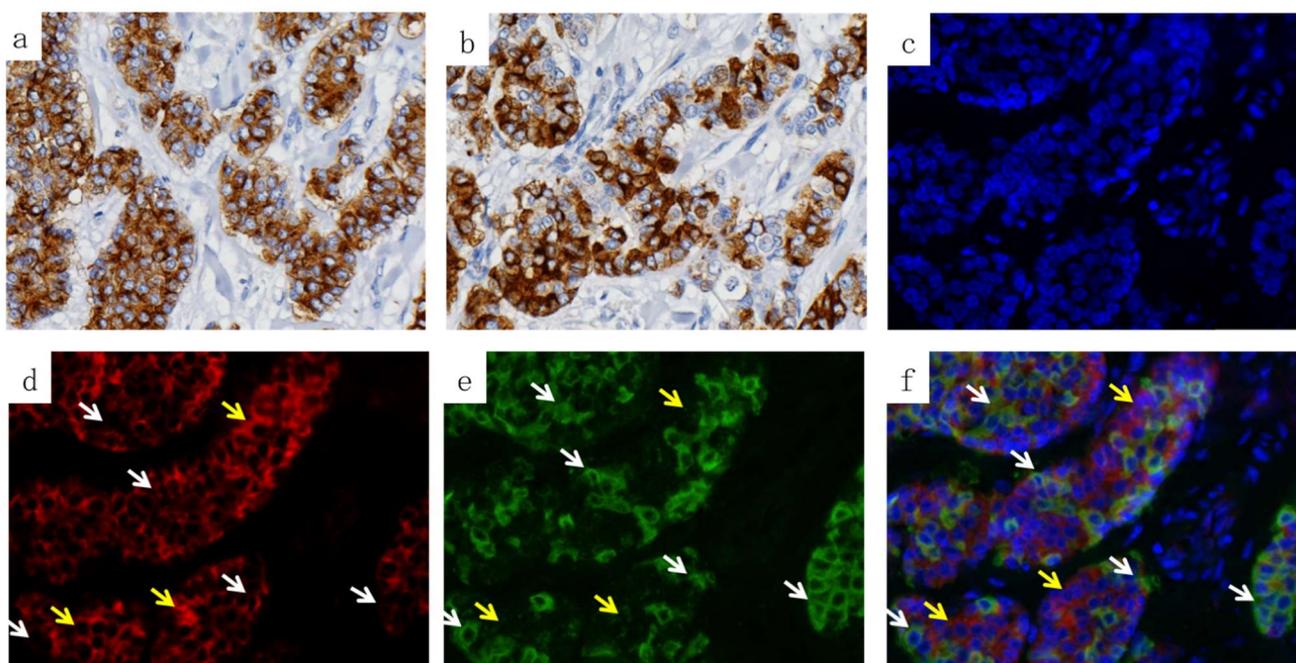


図9 腫瘍内不均一性を伴う Tn-MUC1 発現乳癌症例における Rab11 の免疫組織化学的分布

a-b: IHC, c-f: IF, a: MUC1, b: Tn-MUC1, c: DAPI, d: Rab11, e: Tn-MUC1, f: Merge (Rab11+Tn-MUC1+DAPI), 白矢印は Tn-MUC1 高発現かつ Rab11 蛍光シグナルが低い細胞, 黄矢印は Tn-MUC1 低発現かつ Rab11 蛍光シグナルが高い細胞を示す。

5. Tn-MUC1 および MUC1 発現状態と臨床病理学的因子との関係

上記検討により，細胞質主体の Tn-MUC1 の発現を，有意な所見であると判断した．そこで次に，ROC 曲線を用いて両者の H スコアのカットオフ値，感度，特異度を検討した(図 10)．Area of under curve (AUC) 値は，Tn-MUC1 の全陽性反応と細胞質陽性反応を対象とした評価結果で最も高く (AUC=0.95) 精度の高さが確認された(表 3)．また MUC1 の特異度が 45.6 であるのに対し，Tn-MUC1 の特異度は 97.5 と高値であり，Tn-MUC1 と他の clone を比較したパイロット研究の結果を支持するものだった．

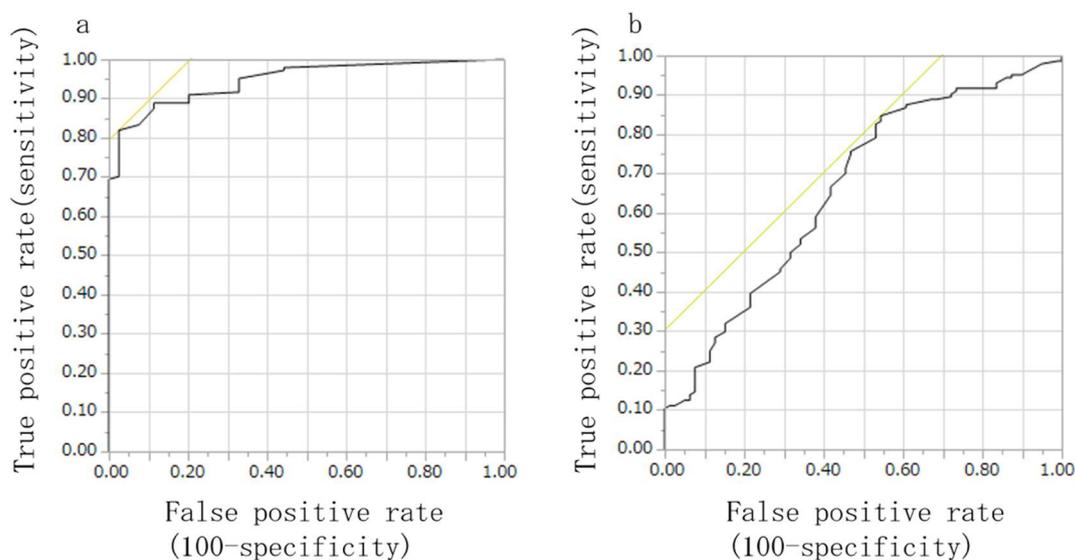


図 10 各抗体における H スコアの ROC 曲線 a: Tn-MUC1, b: MUC1

表 3 ROC 解析による，Tn-MUC1 と MUC1 の診断マーカーとしての精度比較

	Tn-MUC1	MUC1	Tn-MUC1 cyto	MUC1 cyto	Tn-MUC1 mem	MUC1 mem
AUC	0.95	0.66	0.95	0.88	0.5	0.66
Cut off value	27.5	51.25	25	105	100	15
Sensitivity	81.9	84.7	88.9	68.8	1.4	41.7
Specificity	97.5	45.6	89.9	96.2	100	88.6

TMA を作製した症例のうち 124 例を用い、Tn-MUC1 抗体と MUC1 抗体における陽性反応と、臨床病理学的因子との関連を検討した (表 4-6) . Tn-MUC1 抗体による全陽性反応は、WHO grade ($p=0.0226$) , ER 発現 ($p=0.0009$) , PGR 発現 ($p=0.0003$) , Ki-67 標識率 ($p<0.0001$) との間に有意な相関を認めた. WHO grade 1-2, ER 陽性, PGR 陽性, Ki-67 低標識率の場合に陽性率が高かった. 一方, MUC1 抗体における全陽性反応は, ER 発現 ($p=0.0003$) , PGR 発現 ($p=0.0009$) , Ki-67 標識率 ($p=0.0175$) との間に有意な相関を認め, ER 陽性, PGR 陽性, Ki-67 低標識率の場合に陽性率が高かった (表 4).

細胞内局在別に検討したところ, Tn-MUC1 抗体での細胞質への陽性反応は, 年齢 ($p=0.0141$) , pT 因子 ($p=0.0192$) , ER 陽性 ($p=0.0029$) , PGR 陽性 ($p=0.0021$) , Ki-67 標識率 ($p=0.0003$) との間に有意な相関を認めた. 年齢高値 (>55 歳) , pT1-pT2, ER 陽性, PGR 陽性, Ki-67 低標識率の場合に陽性率が高かった (表 5). MUC1 抗体を用いた細胞質での陽性反応は, ER 陽性 ($p<0.0001$) , PGR 陽性 ($p=0.0036$) , Ki-67 標識率 ($p=0.0088$) との間に有意な相関を認め, ER 陽性, PGR 陽性, Ki-67 低標識率の場合に陽性率が高く, 同抗体を用いた全陽性反応と類似した傾向を示した (表 5). いずれの抗体でも, 膜陽性反応と有意な相関を示す因子はみられなかった (表 6).

表 4 Tn-MUC1 および MUC1 の発現状態と、臨床病理学的因子との関係

Characteristics		n	Tn- MUC1	%	p	MUC1	%	p
histology	IC	144	115	79.9		121	84.0	
	NonN	79	2	2.5		43	54.4	
age	≤55	68	51	75.0	0.1389	55	80.9	0.3187
	>55	56	48	85.7		49	87.5	
pT	T1	91	72	79.1	0.0851	79	86.8	0.0373
	T2	30	26	86.7		24	80.0	
	T3	3	1	33.3		1	33.3	
	T4	0	0	0.0		0	0.0	
pN	positive	49	37	75.5	0.5848	40	81.6	0.8474
	negative	67	55	82.1		57	85.1	
WHO grade	G1	47	40	85.1	<u>0.0226</u>	39	83.0	0.8551
	G2	62	51	82.3		53	85.5	
	G3	15	8	53.3		12	80.0	
ER	positive	99	85	85.9	<u>0.0009</u>	89	89.9	<u>0.0003</u>
	negative	25	14	56.0		15	60.0	
PGR	positive	78	70	89.7	<u>0.0003</u>	72	92.3	<u>0.0009</u>
	negative	46	29	63.0		32	69.6	
HER2	score 0/1	100	82	82.0	0.2208	85	85.0	0.4853
	score 2/3	24	17	70.8		19	79.2	
Ki-67	≤14	84	77	91.7	<u><0.0001</u>	75	89.3	<u>0.0175</u>
	>14	40	22	55.0		29	72.5	

表 5 Tn-MUC1 および MUC1 の細胞質への発現状態と、臨床病理学的因子との関係

Characteristics		n	Tn-MUC1 cyto	%	p	MUC1 cyto	%	p
histology	IC	144	128	88.9		99	68.8	
	NonN	79	8	10.1		3	3.8	
age	≤55	68	54	79.4	<u>0.0141</u>	44	64.7	0.7121
	>55	56	53	94.6		38	67.9	
pT	T1	91	81	89.0	<u>0.0192</u>	60	65.9	0.4398
	T2	30	25	83.3		21	70.0	
	T3	3	1	33.3		1	33.3	
	T4	0	0	0.0		0	0.0	
pN	positive	49	40	81.6	0.2218	30	61.2	0.4055
	negative	67	60	89.6		46	68.7	
WHO grade	G1	47	40	85.1	0.6492	32	68.1	0.5356
	G2	62	55	88.7		42	67.7	
	G3	15	12	80.0		8	53.3	
ER	positive	99	90	90.9	<u>0.0029</u>	75	75.8	<u><0.0001</u>
	negative	25	17	68.0		7	28.0	
PGR	positive	78	73	93.6	<u>0.0021</u>	59	75.6	<u>0.0036</u>
	negative	46	34	73.9		23	50.0	
HER2	score 0/1	100	85	85.0	0.3938	69	69.0	0.1679
	score 2/3	24	22	91.7		13	54.2	
Ki-67	≤14	84	79	94.0	<u>0.0003</u>	62	73.8	<u>0.0088</u>
	>14	40	28	70.0		20	50.0	

表 6 Tn-MUC1 および MUC1 の細胞膜への発現状態と、臨床病理学的因子との関係

Characteristics		n	Tn-MUC1 mem	%	p	MUC1 mem	%	p
histology	IC	144	2	1.4		60	41.7	
	NonN	79	0	0.0		9	11.4	
age	≤55	68	1	1.5	0.3622	38	55.9	0.7329
	>55	56	0	0.0		33	58.9	
pT	T1	91	0	0.0	0.2061	54	59.3	0.6327
	T2	30	1	3.3		15	50.0	
	T3	3	0	0.0		2	66.7	
	T4	0	0	0.0		0	0.0	
pN	positive	49	1	2.0	0.2402	31	63.3	0.5824
	negative	67	0	0.0		39	58.2	
WHO grade	G1	47	0	0.0	0.6041	24	51.1	0.4898
	G2	62	1	1.6		37	59.7	
	G3	15	0	0.0		10	66.7	
ER	positive	99	1	1.0	0.6139	58	58.6	0.5520
	negative	25	0	0.0		13	52.0	
PGR	positive	78	1	1.3	0.4407	46	59.0	0.6149
	negative	46	0	0.0		25	54.3	
HER2	score 0/1	100	1	1.0	0.6228	56	56.0	0.5632
	score 2/3	24	0	0.0		15	62.5	
Ki-67	≤14	84	1	1.2	0.4884	48	57.1	0.9700
	>14	40	0	0.0		23	57.5	

6. サブタイプ別の Tn-MUC1 および MUC1 発現状態の比較

乳癌では腫瘍細胞のホルモン受容体への感受性や HER2 遺伝子増幅を加味したサブタイプが治療において重要である。そこでサブタイプに基づく解析を個行った。TMA を用い、まずは非腫瘍の陽性反応がサブタイプごとに有意差を示さないことを確認した。次に浸潤癌に対する H スコアを、サブタイプ別に検討した (図 11)。Tn-MUC1 抗体での陽性反応は、HR+/HER2-/低増殖能 (luminal A-like; lum A-like) タイプと、トリプルネガティブ (TN) タイプにおいて有意差がみられ、lum A-like タイプで陽性率が高かった。その有意差は全陽性反応での解析より ($p=0.0277$)、細胞質への陽性反応の検討で ($p=0.0011$) より強調された (図 11a, b)。一方、MUC1 抗体を用いた全陽性反応の解析ではサブタイプ別の有意差は検出されなかったが、細胞質での解析では、Tn-MUC1 抗体と同様に lum A-like タイプ と TN タイプに有意差が認められた ($p<0.0001$)。加えて、HR+/HER2-/高増殖能 (luminal B-like; lum B-like) タイプと TN タイプ、HR+/HER2+タイプと TN タイプにも有意差が認められた ($p=0.0419$, $p=0.0351$) (図 11e)。

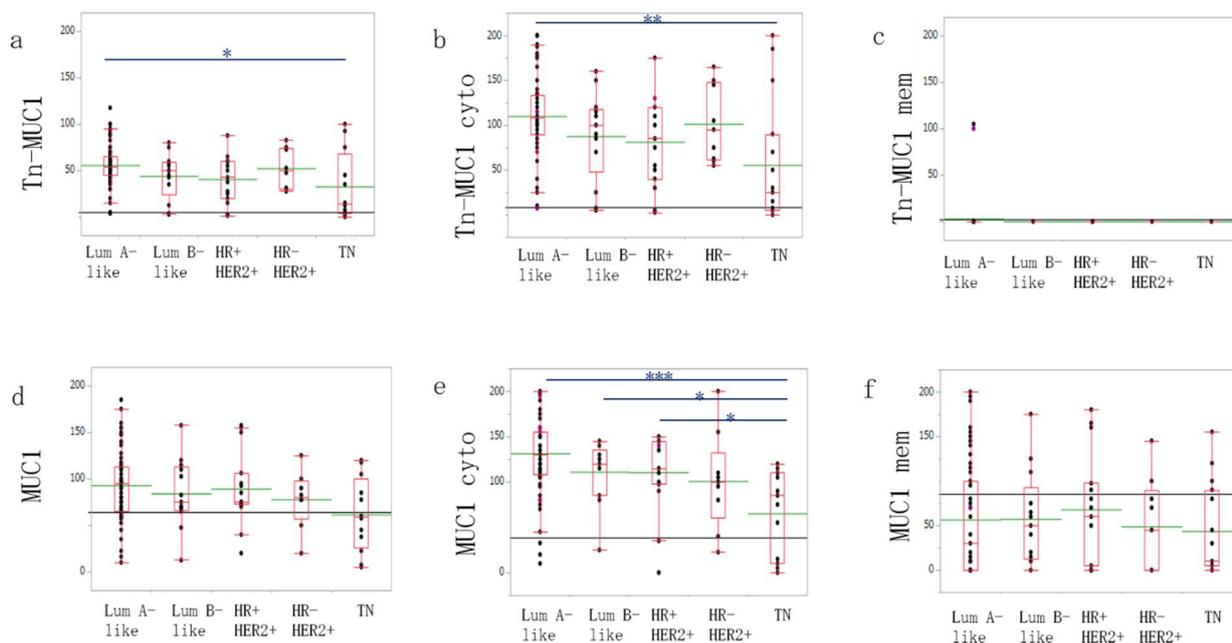


図 11 サブタイプ別の Tn-MUC1 および MUC1 発現状態の比較

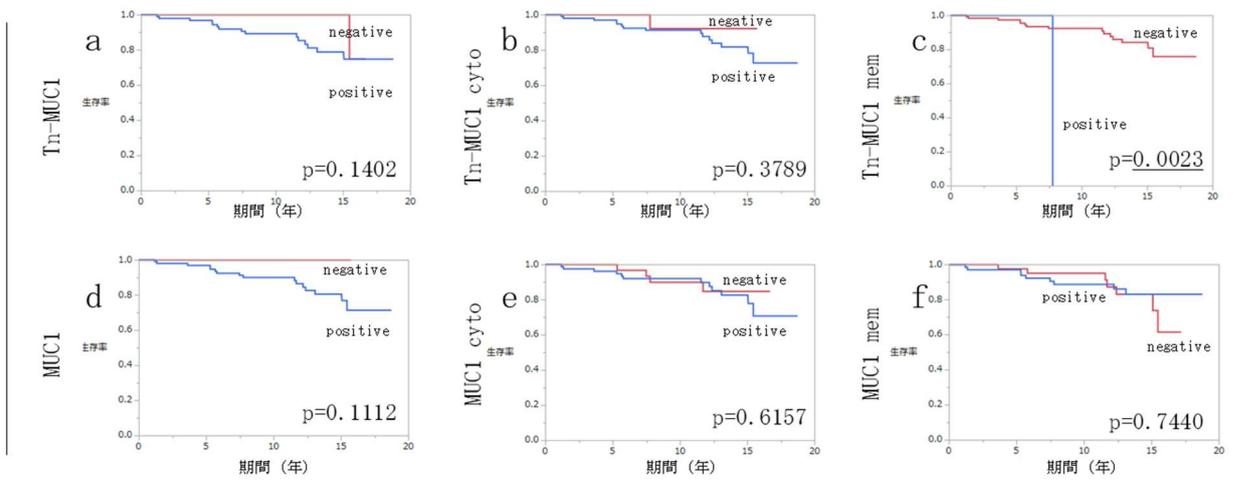
a-c: Tn-MUC1, d-f: MUC1, a, d: all, b, e: cyto, c, f: mem, Lum A-like; Luminal A-like, Lum B-like; Luminal B-like, TN; triple negative, ***: $p<0.0001$, **: $p<0.01$, *: $p<0.05$ 抗体・局在ごとの非腫瘍 (NonN) の平均 H スコアを黒線で示す。

7. Tn-MUC1 および MUC1 発現状態と予後の関係

TMA を用いた検討のうち臨床情報が得られた 118 例について生存分析を施行した。他病死および追跡不能症例については、死亡日あるいは最終生存確認日までを観察期間とし、打ち切り症例とした。全生存期間 (OS) , 無再発生存期間 (DFS) とともに Kaplan-Meier 曲線を示す。Tn-MUC1 の細胞膜への染色結果を解析すると、数値上は陽性例が OS, DFS の有意な短縮を示したが ($p=0.0023$, $p=0.0148$) , 陽性症例数は 118 例中 2 例と少なかった (図 12c, i) . それらを除くといずれにも OS や DFS との有意差はみられなかったが、全陽性反応では Tn-MUC1 もしくは MUC-1 陽性例が予後不良の傾向を示した。

次にサブタイプ毎の検討を行った。陽性症例が少ない Tn-MUC1 の膜陽性症例以外では、統計学的有意差は認められなかった。しかし HR+乳癌に限定すると、そのうち lum A-like タイプでのみ、Tn-MUC1 ないし MUC1 陽性症例が予後良好な傾向を示した。それに対し lum B-like と HR+/HER2+タイプでは、有意差はないものの Tn-MUC1 ないし MUC1 陽性症例が予後不良な傾向を示すことが多く、対称的な結果であった (図 13, 14)。

OS



DFS

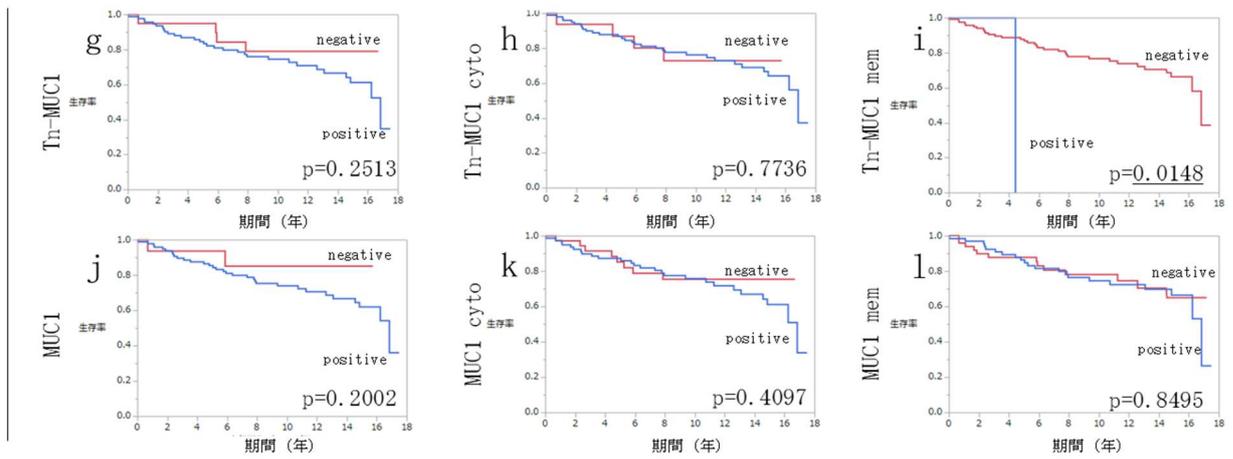


図 12 Tn-MUC1 および MUC1 発現状態と予後の関係 (全生存期間と無再発生存期間) 全生存期間 (OS; overall survival) 無再発生存期間 (DFS; disease free survival)

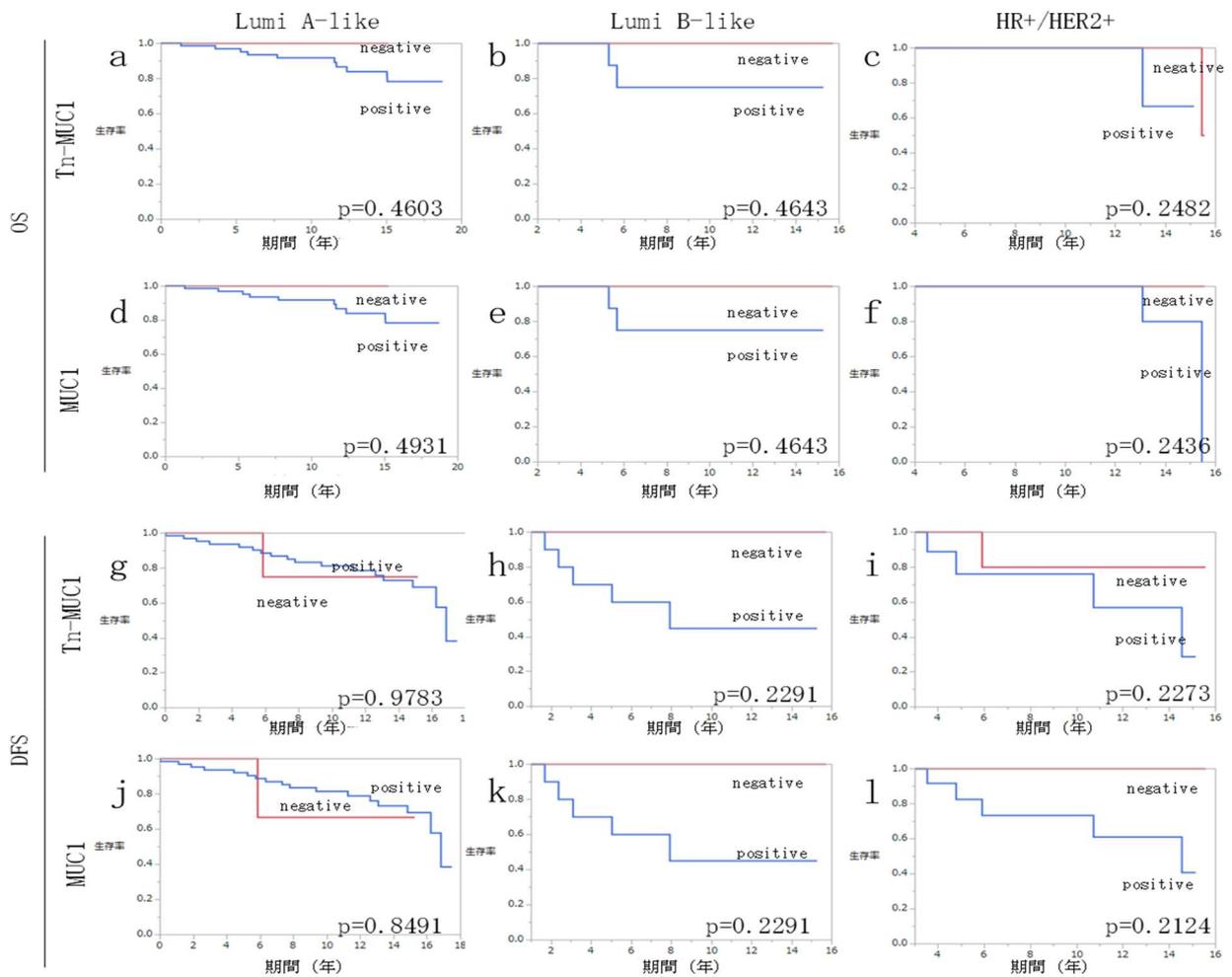


図 13 ホルモン受容体陽性サブタイプにおける，Tn-MUC1 および MUC1 発現状態と予後の関係（全生存期間と無再発生存期間） a, d, g, j: Lum A-like, b, e, h, k: Lum B-like, c, f, I, l: HR+/HER2+

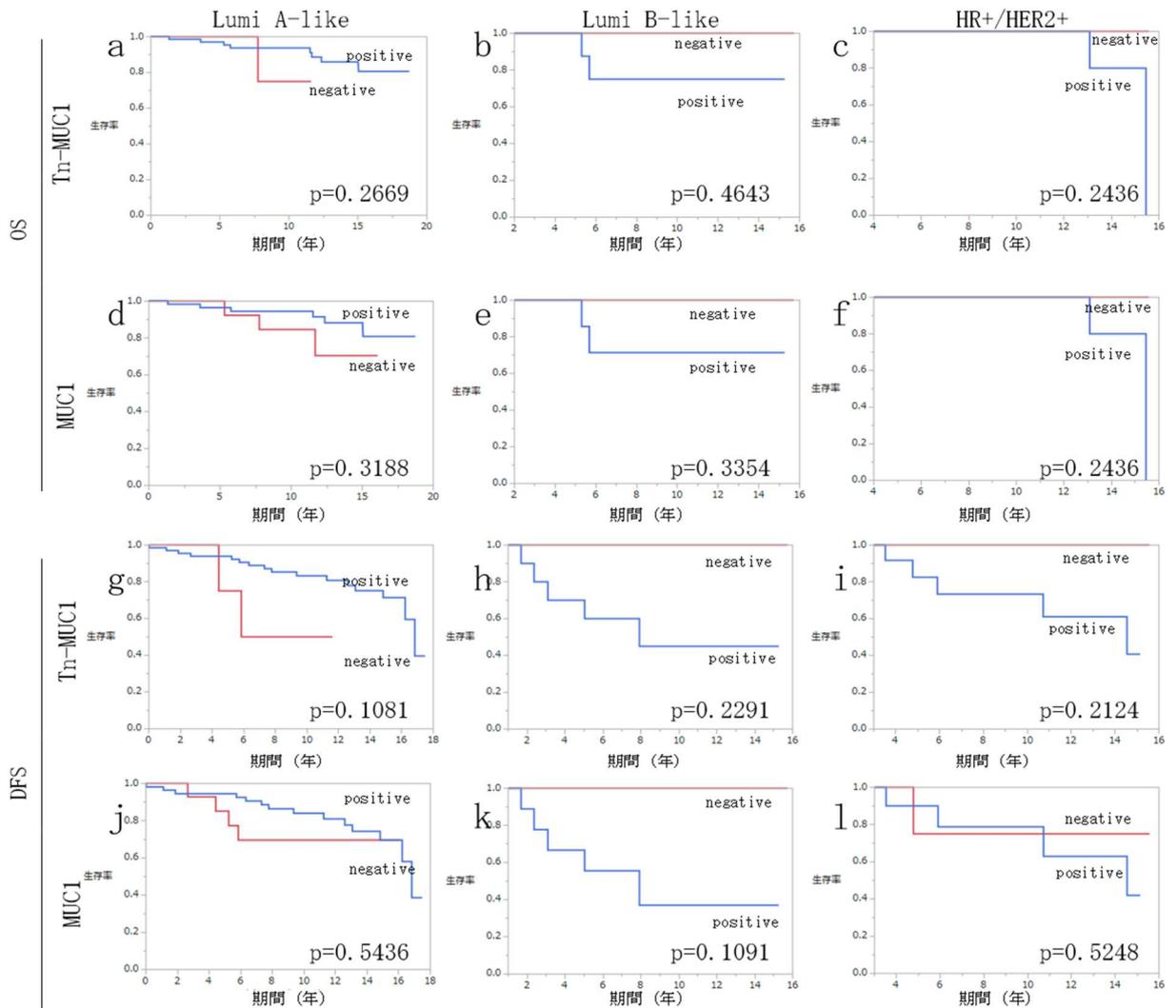


図 14 ホルモン受容体陽性サブタイプにおける，Tn-MUC1 および MUC1 の，細胞質への発現状態と予後の関係（全生存期間と無再発生存期間） a, d, g, j: Lum A-like, b, e, h, k: Lum B-like, c, f, i, l: HR+/HER2+

Tn-MUC1 および MUC1 陽性症例の予後が、サブタイプ間で異なっていたことを受け、サブタイプ分類に使用する因子ごとに解析症例を細分化し、複数のカットオフ値 (ROC 曲線から求めた至適値と、中央値) を使用することで、予後因子としての傾向が明らかになるかどうか検証した。

まず ER 陽性, Grade 1, Grade 1-2, Ki-67 低値の各群において, Tn-MUC1 および MUC1 陽性例に予後良好傾向がみられるかどうかを検討したが, 明らかな傾向や有意差は見出せなかった (データ示さず)。

次に ER 陰性, Grade 3 の各群で解析したところ, Tn-MUC1 や MUC1 陽性例が予後不良な傾向を示したが有意差はみられなかった (データ示さず)。一方, Ki-67 高値群では, H スコアの中央値である 100 をカットオフにすると, Tn-MUC1 が細胞質へ陽性となる症例は有意に OS と DFS の短縮を示した ($p=0.0020$, $p=0.0436$) (図 15b, e)。更に Tn-MUC1 陽性例を細胞質への H スコアにより高発現 (H スコア >100 ; positive-high) と低発現 (H スコア >25 かつ ≤ 100 ; positive-low) に分類すると, Tn-MUC1 高発現, Tn-MUC1 低発現, Tn-MUC1 陰性の順に OS の有意な短縮 ($p=0.0077$) と, DFS の短縮傾向 ($p=0.1197$) が認められた (図 15 c, f)。

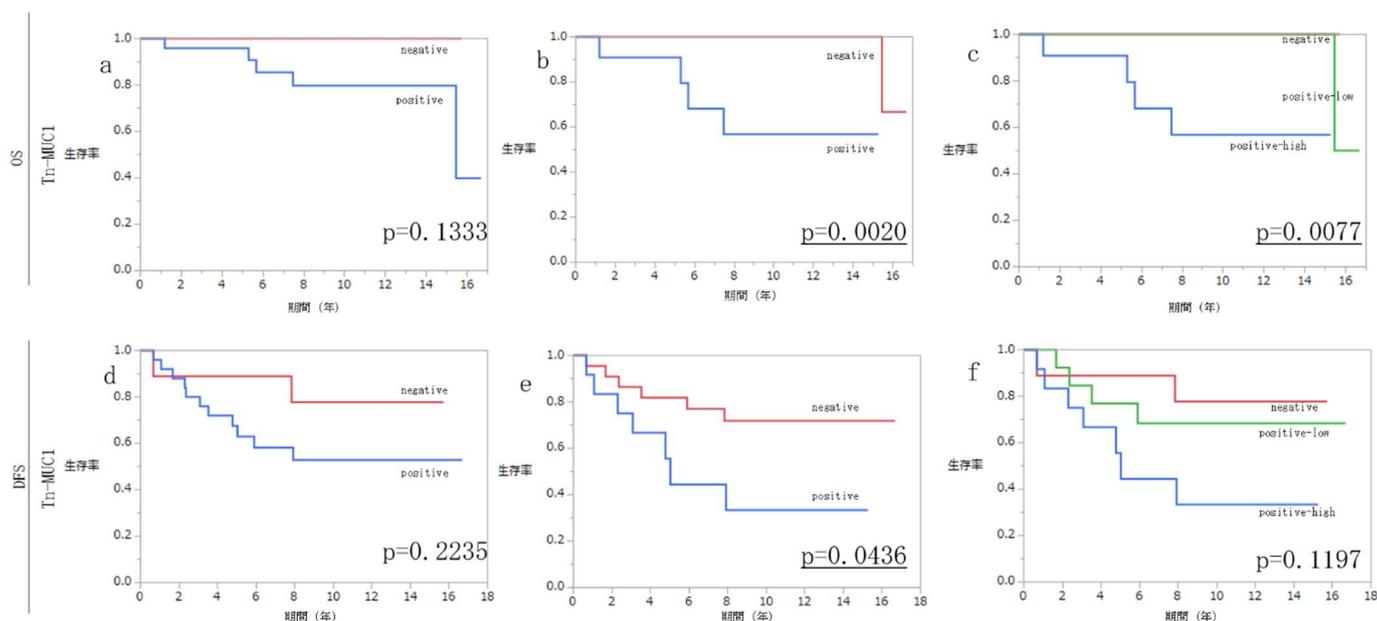


図 15 Ki-67 高値群における, Tn-MUC1 の細胞質への発現状態と予後の関係 (全生存期間と無再発生存期間) a, d: カットオフ値 25 を用いた評価 (ROC 曲線から求めた値), b, e: カットオフ値 100 (中央値) を用いた評価, c, f: 3 段階での評価, negative; H スコア ≤ 25 , positive-low; H スコア >25 かつ ≤ 100 , positive-high; H スコア >100

8. Multi-lesion 解析による乳腺前癌病変-腫瘍性病変移行における Tn-MUC1 発現状態の変化

乳癌の発癌過程における Tn-MUC1 の発現状態の変化を明らかにするため、形態学的に正常と思われる非腫瘍、FEA、非浸潤癌、浸潤癌を含む浸潤性乳管癌の whole section を用いた multi-lesion 解析を行った。本検討では、既存の MUC1 抗体に加え、STn-MUC1 抗体を用いて発現状態の変化を比較検討した(図 16, 17)。Tn-MUC1 と STn-MUC1 の全陽性反応では、非腫瘍の H スコアが低く、FEA、非浸潤癌と漸増する傾向があるのに対し (Tn-MUC1 平均値 ; 非腫瘍 8.2, FEA 38.3, 非浸潤癌 62.2) (STn-MUC1 平均値 ; 正常 10.2, FEA 30.4, 非浸潤癌 50.7) (図 17a, b), MUC1 抗体では H スコアの平均値ほどの病変も 100 以上の高値を示した (平均値 ; 非腫瘍 114.5, FEA 145.7, 非浸潤癌 135.8, 浸潤癌 134.6) (図 17g)。

Tn-MUC1 における細胞質の陽性反応を評価した H スコアは、非腫瘍では低く段階的に増加する傾向を示した (平均値 ; 非腫瘍 12.1, FEA 58.4, 非浸潤癌 平均 94.8, 浸潤癌 102.4) (非腫瘍 vs FEA $p=0.0004$, 非腫瘍 vs 非浸潤癌 $p<0.0001$, 非腫瘍 vs 浸潤癌 $p<0.0001$, FEA vs 非浸潤癌 $p=0.0079$, FEA vs 浸潤癌 $p=0.0054$) (図 17b)。同様の漸増は STn-MUC1 の細胞質での H スコア (非腫瘍 vs 非浸潤癌 $p=0.0003$, 非腫瘍 vs 浸潤癌 $p=0.0048$, FEA vs 非浸潤癌 $p=0.0126$) (図 17e), MUC1 の細胞質での H スコア (非腫瘍 vs FEA $p=0.0001$, 非腫瘍 vs 非浸潤癌 $p<0.0001$, 非腫瘍 vs 浸潤癌 $p<0.0001$, FEA vs 浸潤癌 $p=0.0409$) (図 17h) でも認められた。しかし STn-MUC1 抗体を用いた細胞質の H スコアでは非腫瘍と FEA との間に有意差が認められなかった ($p=0.7070$) (図 17e)。また MUC1 抗体を用いた細胞質の H スコアは、他の抗体に比して非腫瘍における H スコアが高かった (平均 54.5) (図 17h)。興味深いことに、Tn-MUC1 抗体での細胞膜における陽性反応は、浸潤癌では殆どみられないのに対し (平均 9.9), FEA (平均 14.2) や非浸潤癌 (平均 29.6) では一部認められた (非腫瘍 vs 非浸潤癌 $p=0.0121$) (図 16f, g, 図 17c)。

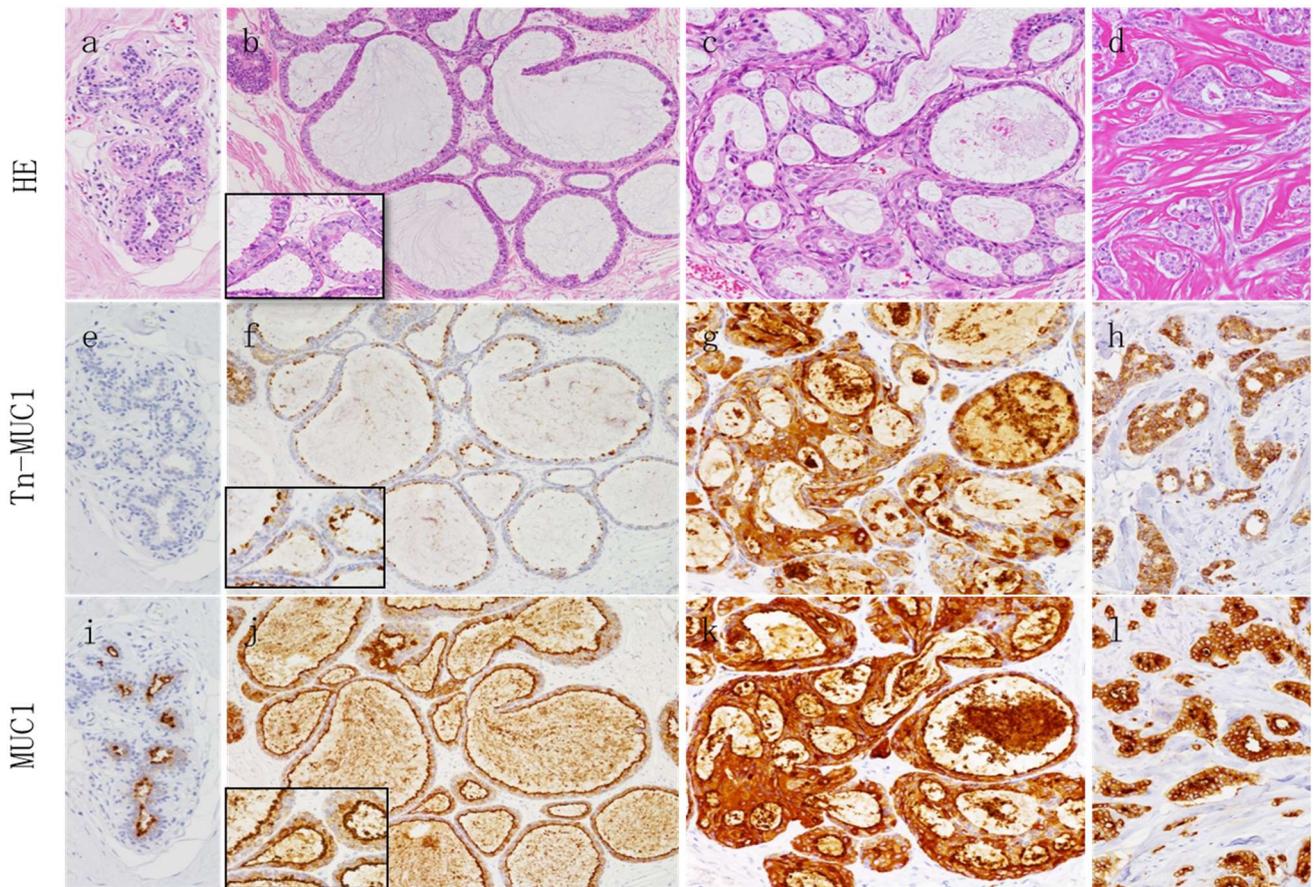


図 16 Multi-lesion 解析による乳腺前癌病変-腫瘍性病変移行における Tn-MUC1 発現状態の変化

a, e, i: NonN, b, f, j: FEA, c, g, k: DCIS, d, h, l: IDC, FEA; Flat epithelial atypia, DCIS; ductal carcinoma *in situ*, IDC; invasive ductal carcinoma

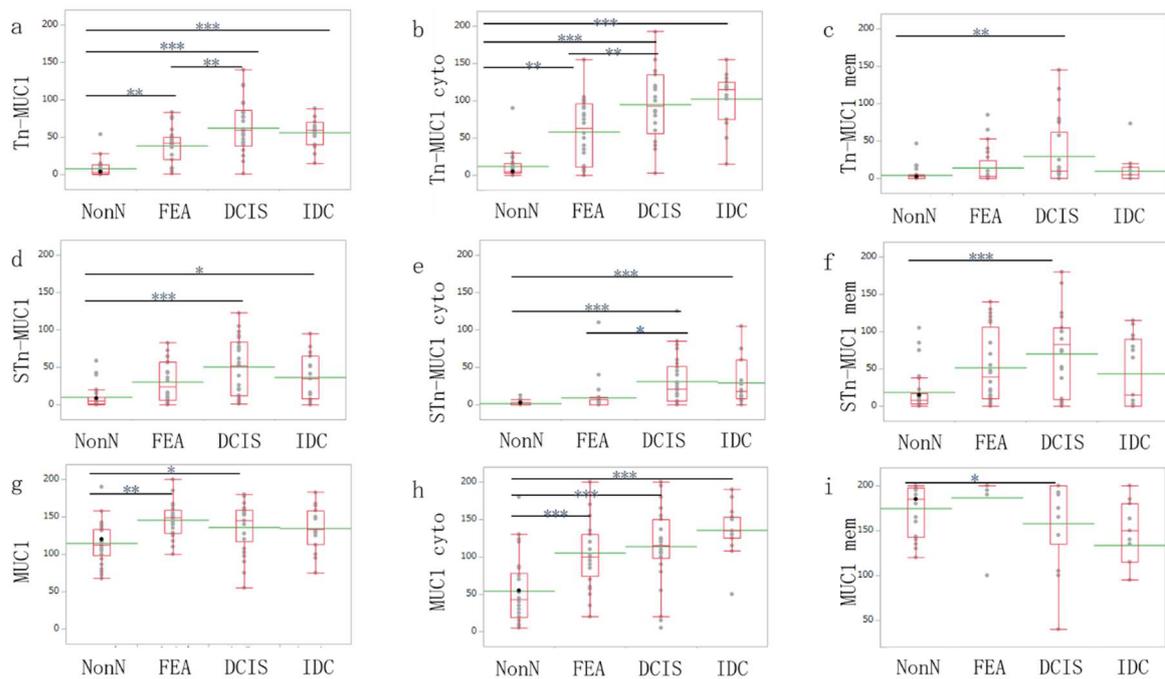


図 17 乳腺前癌病変-腫瘍性病変移行における Tn-MUC1, STn-MUC1, MUC1 の免疫組織化学的定量評価

a, d, g: all, b, e, h: cytoplasm, c, f, i: membrane ***:P<0.0001, **:P<0.01, *:P<0.05

9. 担癌マウスに対する Tn-MUC1 抗体の腫瘍増殖の抑制効果

新規に開発された Tn-MUC1 に対する特異的抗体の治療応用のフィージビリティを検討するため、ヌードマウスを用いた乳癌細胞株の移植腫瘍モデルを用いた。使用する細胞株を決定するため、代表的な MUC1 陽性乳癌細胞株である MCF-7 (lum A-like 由来) および MDA-MB-231 (TN 由来) を用い、FCM 解析にて、細胞表面における Tn-MUC1 の抗原量を確認した。MCF-7 では、MUC1 抗体 (DF3) で認識される MUC1 が膜表面に観察されるのに対し (図 18A c), Tn-MUC1 発現は殆ど認められなかった (図 18A d)。一方、MDA-MB-231 では、MUC1 の発現量に比べ低レベルではあるものの Tn-MUC1 の細胞膜における発現が認められた (図 18A b)。この結果を踏まえ、担癌マウスに対する Tn-MUC1 抗体 (SN102) の腫瘍増殖の抑制効果の評価には、MBA-MD-231 細胞株を用いることとした。

MDA-MB-231 細胞移植腫瘍における各群の湿重量 (g) は、それぞれ 1.3081 ± 0.1510 , 1.1595 ± 0.1133 , 1.0704 ± 0.0959 及び 0.8411 ± 0.0727 を示し、Control 群と比較し、Tn-MUC1 抗体+Docetaxel 群に有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 18B, 図 18C, 詳細データは特許出願予定のためデータ示さず)。

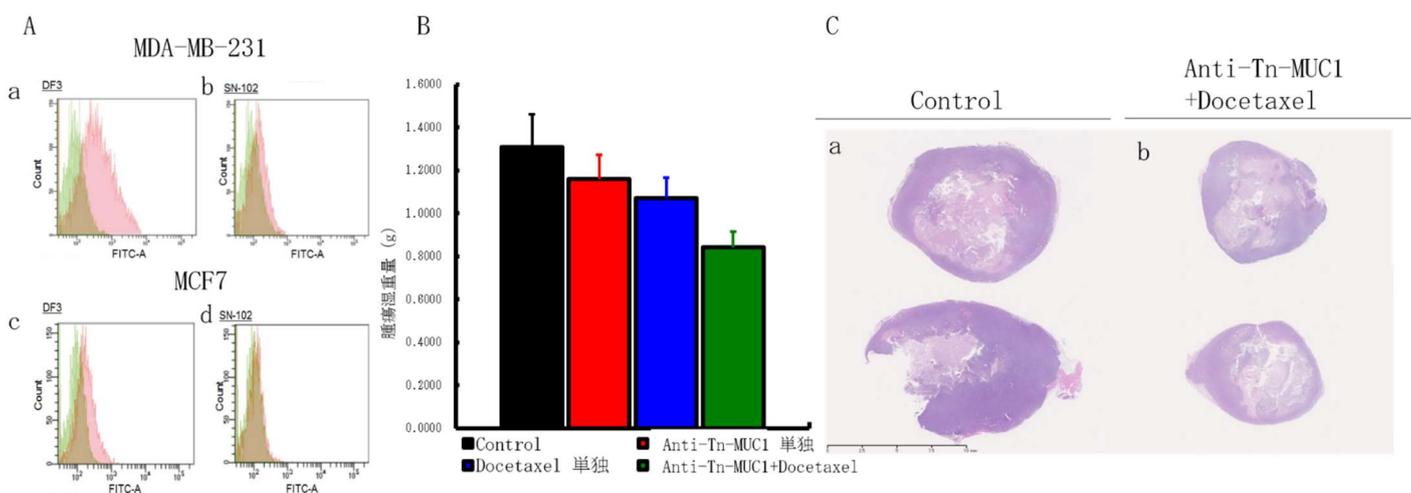


図 18 担癌マウスに対する Tn-MUC1 抗体 (SN102) の腫瘍増殖の抑制効果

A. フローサイトメトリーによる各種乳癌細胞株の細胞表面における MUC1 と Tn-MUC1 発現 a: MDA-MB-231 における MUC1 (DF3) 発現 b: MDA-MB-231 における Tn-MUC1 発現 c: MCF7 における MUC1 (DF3) 発現 d: MCF7 における Tn-MUC1 発現.

B. 投薬終了後の Control 群, Tn-MUC1 抗体 (SN102) 単独群, Docetaxel 単独群及び, Tn-MUC1 抗体+Docetaxel 群の腫瘍湿重量

C. 投薬終了後の Control 群及び Tn-MUC1 抗体+Docetaxel 群の試験終了後の代表的な腫瘍ルーペ像 a: Control 群 b: Tn-MUC1 抗体+Docetaxel 群

考 察

本研究は、癌細胞が発現する MUC1 コアタンパクにおいて認められる Tn 抗原をエピトープとし、Tn-MUC1 を特異的に認識する新規抗体 (SN102) を用い、乳腺組織における TA-MUC1 発現をはじめて検討したものである。今回の検討で、Tn-MUC1 の診断マーカーとしての有用性が明らかとなった。TMA 解析の結果より、従来から用いられている MUC1 抗体と比較し、Tn-MUC1 抗体は正常組織における反応性が低く、浸潤癌を検出する抗体としての特異性の高さが明らかとなった。この結果は、Tn-MUC1 の浸潤性乳癌診断マーカーとしての臨床病理学的価値を免疫組織学的手法により示したものと考えられる。また既存の MUC1 抗体を用いた MUC1 陽性反応についても、細胞質局在に注目することで、Tn-MUC1 抗体に近似した結果を導き出せることが示された。更に whole section を用いた multi-lesion 解析により、非腫瘍性乳腺組織から浸潤癌への段階的悪性化を反映するとされる各病変を検討した結果、各段階を追って Tn-MUC1 の H スコアが漸増することが明らかとなった。したがって本研究により、Tn-MUC1 抗体が乳癌の発生進展過程における TA-MUC1 発現の意義を解析するためにも、また前癌病変の病理組織学的鑑別の補助診断ツールとしても有用な抗体であることが示された。

非浸潤癌や非腫瘍を検討に含めた過去の少数例の報告では、乳癌発生早期から MUC1 が発現することが示唆されていた (Ghosh et al., 2013; van der Vegt et al., 2007)。本研究では Tn-MUC1 に特異的な抗体を用いることで、それを実証することができた。近年の画像診断技術の向上により、FEA, ADH, ALH などの、上皮に異型を伴うが癌の基準をみたさない病変が採取される機会が増えている。前癌病変として認識されつつあるそれらの病変は、組織診検査において病理診断が困難な場合がある。特に採取量が少ない生検検体では、過小診断と過大診断の両方の原因となり得る。中でも FEA は、種々の大きさに拡張した乳管小葉構造を、軽度異型を示す 1~3 層の上皮が裏打ちするものを指し、低異型度非浸潤癌の前駆病変の中で、最も早期の組織学的変化をみていると考えられている。それだけに病理医にとっては、FEA を病変として認識すること自体がしばしば困難で、観察者間差が大きい。今回の検討で、FEA における Tn-MUC1 抗体の陽性反応が、非腫瘍に比して僅かに増加していたことから、Tn-MUC1 抗体は FEA を含めた前癌病変に対しても有用な診断マーカーとなる可能性がある。

本研究において、乳癌における Tn-MUC1 発現の臨床病理学的意義の一端を検討することが可能となった。これまで膀胱癌、大腸癌、胆嚢癌など他臓器での免疫組織化学的検討で、MUC1 の発現は予後不良因子とされてきた (Kashiwagi et

al., 2000; Lüttges et al., 2002; Nakamori et al., 1994). しかし本研究では, Tn-MUC1 抗体で標識される Tn-MUC1 の発現は, ER 陽性, PGR 陽性, 低 Grade, Ki-67 低値など, 一般に良好な予後と関わる複数の因子との正の相関を示した. これは過去の乳癌における MUC1 の発現態度と同様の結果であると同時に, 他癌腫における臨床病理学的研究や基礎研究から推定される MUC1 の悪性形質とは乖離した所見であった (Rahn et al., 2001). 一方, 本研究における興味深い知見として, 今回集積した乳癌 TMA 症例全体でみると, 統計学的有意差は示さないものの Tn-MUC1 陽性例が予後不良な傾向があるのに対し, HR+/HER2-/低増殖能 (luminal A-like) タイプに限ると, Tn-MUC1 の発現が予後良好な傾向を示すことがわかった. さらに Ki-67 標識率高値群を抽出すると, Tn-MUC1 発現例が有意に生存期間, 無再発生存期間の短縮を示した. これらの結果のみから乳癌における Tn-MUC1 発現の意義を理解することは困難だが, 敢えて試みると, ①Tn-MUC1 は増殖能の高い腫瘍においてその生物学的な悪性形質を示し, ②増殖能が低いサブタイプが優勢を占める乳癌ではその特性が発揮されない (抑制される) のかもしれない. 今回の検討では症例数, 観察期間が十分ではない可能性があるため, 臨床データを増やし, Tn-MUC1 の発現意義に対する上の仮説を検証する予定である.

本研究では Tn-MUC1 抗体を利用することで, Tn-MUC1 の局在変化を簡便に評価できた. これまで可視化することが難しいとされてきた糖鎖修飾プロセス中の MUC1 の糖鎖構造変化の一部を観察可能にしたとも言える. Tn-MUC1 の局在と腫瘍発生過程を検討することにより, Tn-MUC1 の発現が, 前癌病変的な乳管内病変や非浸潤癌では腺管の内腔や細胞膜, 細胞質にみられるものの, 浸潤癌においては細胞質に局在し, 細胞膜への発現が殆どみられなくなる傾向を明らかにした. これは, 癌性変化に伴い MUC1 の局在の変化を細胞質や膜全周への発現と定義されてきた既存の報告から踏み込んだ, 新たな知見である. 更にこの局在変化傾向は, Tn-MUC1 抗体のみならず, 別の TA-MUC1 特異的抗体である STn-MUC1 抗体においても観察された. 今後は他種類の TA-MUC1 の局在について検討予定である.

本来は膜タンパク質である TA-MUC1 が細胞内に蓄積する原因として, エンドソームによるタンパク質の膜輸送動態の変化に起因するという報告がある (Altschuler et al., 2000). 通常, 膜タンパク質は, 恒常的には膜に発現しておらず, エンドサイトーシスで小胞内に取り込まれた後に細胞内を循環する. その過程で不要なものは分解され, 再利用可能と判断されたタンパク質は種々のリサイクリング経路を経て, 細胞膜へと再輸送される. 本研究で使用した Rab11 は, 低分子 G 蛋白である Rab ファミリーの 1 つで, リサイクリング経路を司る調節因子としての重要な機能を果たすといわれる (Chen et al., 1998; Kinlough et al., 2006; Ullrich et al., 1996; Welz et al.,

2014). これまでの報告で, 正常な細胞では MUC1 が細胞質と細胞膜を循環するが (Litvinov and Hilkens, 1993), TA-MUC1 は急速にエンドサイトーシスされ, 細胞膜へ再輸送されず細胞質内に蓄積する現象が細胞レベルで観察されている (Altschuler et al., 2000). 今回の検討で, 浸潤癌組織の Tn-MUC1 高発現細胞では Rab11 蛍光シグナルが低く, Tn-MUC1 低発現細胞では Rab11 蛍光シグナルが高くなる傾向が認められ, 両者の発現は逆相関関係にあった. この関係は MUC1 では認められなかったことから, 浸潤癌における Tn-MUC1 と MUC1 の細胞局在の差には, 直接ないし間接的に Rab11 が関与する可能性が示唆された. 一方で, 前癌病変や非浸潤癌においては, 同じ Tn-MUC1 の apical surface への発現が部分的に保たれていた. このことから Tn-MUC1 の細胞膜輸送は, 糖ペプチド構造のみで規定されるのではなく, 乳癌発生過程の段階に応じて輸送システムが変化する可能性があると考えられた.

MUC1 の細胞内での機能解析については, MUC1 C terminal subunit を中心に進んできた経緯がある. 悪性形質転化に伴って, MUC1 C terminal subunit は MAPK (Mitogen-activated protein kinase), P13K/Akt

(phosphatidylinositol 3-kinase), および Wnt (Wingless type) などの下流の細胞シグナル伝達経路を活性化すると考えられている (Hollingsworth and Swanson, 2004). 実際に MUC1 陽性腺癌, 乳癌, 肺癌, および大腸癌で, これらのシグナル伝達経路の過剰な活性化がみられる. 更に, MUC1 C terminal subunit は β catenin や STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), NF- κ B (nuclear factor- κ B), p53 などの転写因子と相互作用し, 標的遺伝子のプロモーター領域と結合しそれらの発現を促す (Ahmad et al., 2009; Ahmad et al., 2011; Yamamoto et al., 1997). また細胞質内領域中の特定のアミノ酸配列が, MUC1 のホモ 2 量体化および核移行関連タンパクの importin や nucleoporin p62 との相互作用に重要であることなどがわかってきている (Leng et al., 2007; Raina et al., 2012). これまでの基礎研究で, MUC1 が細胞の増殖, 形質転換, 接着, 浸潤および免疫細胞の応答性および治療抵抗性などに関連する遺伝子の転写調節に関与していることが報告されている (Beatson et al., 2015; Julien et al., 2006; Julien et al., 2011; Julien et al., 2005; Kufe, 2013; Murugaesu et al., 2014; Singh and Bandyopadhyay, 2007). 一方, MUC1 N terminal subunit の作用としては, 低グリコシル化状態の TA-MUC1 ではペプチドコアが露出することで細胞外プロテアーゼによる MUC1-N terminal subunit の切断および放出が起りやすくなり, その放出が MUC1-C terminal subunit のリガンド状態を変化させるといった, シグナル伝達経路活性化の起点としての意義が想定されている

(Hollingsworth and Swanson, 2004; Nath and Mukherjee, 2014). また TA-MUC1 のエンドサイトーシスが細胞内蓄積量を増加させることで MUC1 の発癌性シグナル伝達を増強する可能性があるともいわれる (Altschuler et al.,

2000). このように MUC1 C terminal subunit に関わる機序が挙げられているものの、TA-MUC1 の糖鎖構造の変化の本質的な意義については不明な点が多い。

また本研究で、Tn-MUC1 抗体によって認識される Tn-MUC1 の治療標的候補分子としての有用性も明らかとなった。乳癌では、2000 年に Perou らが行った遺伝子発現プロファイル (Gene expression profiling; GEP) に基づく、intrinsic subtype が注目されている (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001)。GEP により乳癌を luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, normal breast like 等に分類すると、タイプ毎に予後や薬物感受性が異なることから治療選択の指標となり得る。しかし GEP を全例に行うことは現実的ではないため、2011 年のザンクトガレン会議でコンセンサスが得られて以来、一般的な病理検査で施行される ER, HER2, Ki-67 などの免疫組織化学法の結果に基づくサブタイプ分類が、GEP による分類を概ね代替するものとして、日常診断に組み込まれることとなった (Curigliano et al., 2017; Goldhirsch et al., 2013; Goldhirsch et al., 2011)。これらの分類により、腫瘍の特性にあわせた個別化治療が標準治療として提供されてきたが、依然として TN タイプでは、他のサブタイプに比して治療選択肢が限られる上に、治療抵抗性が問題となる (Siroy et al., 2013)。今回の検討で、Tn-MUC1 抗体の投与による腫瘍縮小効果が TN タイプの乳癌細胞株 (MDA-MB-231) で得られたことは、臨床的意義が大きく、現行の標準治療抵抗性である患者の、新規治療薬としての利用可能性が期待される。

これまで、MUC1 は癌免疫療法の標的として検討されてきた。TA-MUC1 では糖鎖が短縮することで、本来隠れている免疫原性のタグ、つまり MUC1 抗体ばかりか細胞傷害性 T 細胞にまで認識されるコアタンパクの VNTR が、露出すると考えられている (Tarp and Clausen, 2008; Yang et al., 2007)。MUC1 を標的とする複数のワクチンが開発され、すでに一部は第Ⅲ相試験まで完了している (Mitchell et al., 2015)。しかし現在のワクチンでは細胞の免疫応答を誘導しにくく、腫瘍微小環境内で免疫抑制機構が働くことが課題であり、腫瘍誘発性免疫抑制のアンタゴニストを組み合わせた新しい戦略が検討されている (Nath and Mukherjee, 2014)。抗体医薬としては、MUC1 の発癌特性の多くが MUC1 C terminal subunit に存在することが基礎実験で明らかとなって以来、MUC1 C terminal subunit が薬剤標的として重要視されるようになり、細胞透過性ペプチド MUC1 cytoplasmic tale 阻害剤 GO-203 が乳癌治療の第Ⅰ相臨床試験中である (Nath and Mukherjee, 2014; Yin and Kufe, 2011)。更に注目すべきは、キメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T) 療法である。患者から採取した T 細胞に遺伝子操作を加え、抗原特異的な免疫能を増強させたキメラ抗原受容体 (CAR) を発現させた状態で体内に戻し、T 細胞の抗腫瘍活性を高める治療法のこと、近年、Tn-MUC1 抗原を標的とした CAR-T の有効性が検討され、細

胞実験で腫瘍縮小効果が示された (Posey et al., 2016a; Posey et al., 2016b). 本研究のゼノグラフトマウスを用いた実験では, Tn-MUC1 抗体 (SN102) の投与により部分的な腫瘍増殖抑制効果が認められた. しかし抗体医薬では抗体依存性細胞性傷害活性が主であるため, 細胞表面への発現量の低い Tn-MUC1 を抗原とする Tn-MUC1 抗体の治療効果は, 現時点では十分なものではないと考えられる. Tn-MUC1 抗体の特性を考慮すると, 抗体薬としてよりも特異性の高さを生かすことのできる CAR-T 療法への応用が期待できるかもしれない.

今後, Tn-MUC1 抗体を用いることで field cancerization を評価できるかどうかを検証する予定である. Field cancerization は当初, 共通の癌誘発因子に長期的に暴露された領域から癌が多発するといういわゆる発癌の素地の概念として, 1953 年に口腔扁平上皮癌領域から提唱された (Slaughter, D. P. 1953). その後の分子生物学的検討により, 近年では, 癌の近傍では組織学的に正常と思われる領域においても遺伝子異常やエピジェネティックな変化が蓄積される事象として理解されている. 頭頸部, 結腸, 前立腺, 肺, 食道, 皮膚など複数の癌腫, および乳癌で同様の報告がある (Chai and Brown, 2009; Spitzwieser et al., 2015). 過去の報告で, 癌患者の乳腺組織は, 健常女性乳腺組織のそれと比較して, MUC1 の発現と糖転移酵素の活性が高いことが報告されている (Ghosh et al., 2013). その結果は既存の MUC1 抗体を使用したものではあるが, TA-MUC1 が field cancerization を反映し得る可能性を想起させる. 今回の検討では健常女性の乳腺組織との比較を施行していないが, 癌患者の正常乳腺組織の方が, Tn-MUC1 抗体での陽性反応が高い, あるいは両者の染色パターンに差があることがわかれば, field cancerization を, Tn-MUC1 抗体を用いた免疫組織化学で評価することができるかもしれない.

Tn-MUC1 抗体は, その抗原への特異性を生かすことで, 乳癌の病理診断における新規診断マーカーや治療戦略上で, 重要な役割を果たすと思われる. 更に従来は困難とされてきた MUC1 の糖鎖構造の変化を可視化することで, 癌関連糖鎖を発現した MUC1 の生物学的特性の理解に寄与する可能性がある.

結論

癌関連糖鎖の Tn 抗原と MUC1 のコアタンパクをエピトープとして厳密に定義した新規抗体, Tn-MUC1 抗体を用いた本研究から, 以下の新知見を得た.

- (1) TMAを用いた免疫組織化学的手法により, Tn-MUC1抗体の診断マーカーとしての有用性が明らかとなった. 既存MUC1抗体に比し, Tn-MUC1抗体は明らかに, 乳癌に対する特異性が高かった.
- (2) Whole sectionを用いた詳細な形態学的検討と免疫組織化学的手法により, Tn-MUC1抗体の陽性反応はcarcinogenesisの早期から出現することが明らかとなった. Tn-MUC1抗体が, 診断困難なことが多い前癌病変の評価に有用である可能性が示された.
- (3) ヒト乳癌細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて, Tn-MUC1抗体の投与により腫瘍増殖抑制効果が得られた. Tn-MUC1の治療標的としての有用性, Tn-MUC1抗体を用いた治療応用の可能性が示された.
- (4) Tn-MUC1抗体は, Tn-MUC1の局在変化や性質を評価する上で有用なツールであることがわかった.
- (5) Tn-MUC1が, 現在推定されている乳癌発生過程の早期では細胞膜と細胞質に発現し, 浸潤癌の段階では細胞質内に蓄積する現象が明らかとなった.
- (6) 臨床病理学的因子との検討により, 乳癌は, Tn-MUC1発現意義が異なるヘテロな集団である可能性が示唆された. Tn-MUC1陽性は, HR+/HER2-/低増殖能タイプでは予後良好な傾向を示し, 高増殖能の乳癌において有意な予後不良因子であった.

これらの結果から, 本研究では, TA-MUC1 の一種で, Tn-MUC1 抗体によって認識される Tn-MUC1 が, 乳癌の診断や治療への有用性が期待される有望な分子であることを明確に示した. 加えて, これまで難しいとされてきた MUC1 上の糖鎖構造変化が可視化できることを初めて明らかにした.

謝 辞

稿を終えるにあたり本研究の機会を与えていただいた北海道大学大学院医学院 分子診断病理学教室 松野吉宏教授に深く感謝致します。研究において直接ご指導頂いた北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門 畑中豊先生，北海道大学病院 臨床研究開発センター 生体試料管理室 畑中佳奈子先生，北海道大学病院 病理診断科 三橋智子先生に心から感謝致します。臨床データを提供して下さった北海道大学大学院医学院 外科学講座 乳腺外科学教室 山下啓子先生，抗体 (SN102, SN121) を供与して下さった医化学創薬株式会社 加瀬廣博士，佐藤正治博士，成地健太郎博士，研究内容についてご助言下さった北海道大学大学院医学研究院 生化学分野 分子生物学教室 小野寺康仁先生，本研究を支えて下さった北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門および北海道大学大学院医学院 分子診断病理学教室の皆様，心よりお礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Ahmad, R., Raina, D., Joshi, M.D., Kawano, T., Ren, J., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2009). MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. *Cancer Res* *69*, 7013-7021.
- Ahmad, R., Rajabi, H., Kosugi, M., Joshi, M.D., Alam, M., Vasir, B., Kawano, T., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2011). MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. *Sci Signal* *4*, ra9.
- Altschuler, Y., Kinlough, C.L., Poland, P.A., Bruns, J.B., Apodaca, G., Weisz, O.A., and Hughey, R.P. (2000). Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell* *11*, 819-831.
- Avichezer, D., Taylor-Papadimitriou, J., and Arnon, R. (1998). A short synthetic peptide (DTRPAP) induces anti-mucin (MUC-1) antibody, which is reactive with human ovarian and breast cancer cells. *Cancer Biochem Biophys* *16*, 113-128.
- Beatson, R., Maurstad, G., Picco, G., Arulappu, A., Coleman, J., Wandell, H.H., Clausen, H., Mandel, U., Taylor-Papadimitriou, J., Sletmoen, M., *et al.* (2015). The Breast Cancer-Associated Glycoforms of MUC1, MUC1-Tn and sialyl-Tn, Are Expressed in COSMC Wild-Type Cells and Bind the C-Type Lectin MGL. *PLoS One* *10*, e0125994.
- Beatson, R.E., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2010). MUC1 immunotherapy. *Immunotherapy* *2*, 305-327.
- Blockzijl, A., Nilsson, K., and Nilsson, O. (1998). Epitope characterization of MUC1 antibodies. *Tumour Biol* *19 Suppl 1*, 46-56.
- Brayman, M., Thathiah, A., and Carson, D.D. (2004). MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* *2*, 4.

Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grünebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Bühring, H.J., and Brugger, W. (2001). The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* *61*, 6846–6850.

Burdick, M.D., Harris, A., Reid, C.J., Iwamura, T., and Hollingsworth, M.A. (1997). Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem* *272*, 24198–24202.

Burton, J., Mishina, D., Cardillo, T., Lew, K., Rubin, A., Goldenberg, D.M., and Gold, D.V. (1999). Epithelial mucin-1 (MUC1) expression and MA5 anti-MUC1 monoclonal antibody targeting in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* *5*, 3065s–3072s.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res* *345*, 1377–1383.

Ceriani, R.L., Chan, C.M., Baratta, F.S., Ozzello, L., DeRosa, C.M., and Habif, D.V. (1992). Levels of expression of breast epithelial mucin detected by monoclonal antibody BrE-3 in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer* *51*, 343–354.

Chai, H., and Brown, R.E. (2009). Field effect in cancer—an update. *Ann Clin Lab Sci* *39*, 331–337.

Chen, W., Feng, Y., Chen, D., and Wandinger-Ness, A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* *9*, 3241–3257.

Cho, S.H., Sahin, A., Hortobagyi, G.N., Hittelman, W.N., and Dhingra, K. (1994). Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy. *Cancer Res* *54*, 6302–6305.

Chung, Y.C., Wei, W.C., Hung, C.N., Kuo, J.F., Hsu, C.P., Chang, K.J., and Chao, W.T. (2016). Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. *Eur J Clin Invest* *46*, 1002-1011.

Curigliano, G., Burstein, H.J., P Winer, E., Gnant, M., Dubsy, P., Loibl, S., Colleoni, M., Regan, M.M., Piccart-Gebhart, M., Senn, H.J., *et al.* (2017). De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol* *28*, 1700-1712.

Duffy, M.J. (1999). CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Ann Clin Biochem* *36 (Pt 5)*, 579-586.

Duffy, M.J., Shering, S., Sherry, F., McDermott, E., and O'Higgins, N. (2000). CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *Int J Biol Markers* *15*, 330-333.

Dyomin, V.G., Palanisamy, N., Lloyd, K.O., Dyomina, K., Jhanwar, S.C., Houldsworth, J., and Chaganti, R.S. (2000). MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets. *Blood* *95*, 2666-2671.

Fu, C., Zhao, H., Wang, Y., Cai, H., Xiao, Y., Zeng, Y., and Chen, H. (2016). Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *Hla* *88*, 275-286.

Gendler, S.J. (2001). MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *6*, 339-353.

Ghosh, S.K., Pantazopoulos, P., Medarova, Z., and Moore, A. (2013). Expression of underglycosylated MUC1 antigen in cancerous and adjacent normal breast tissues. *Clin Breast Cancer* *13*, 109-118.

Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.J., and members, P. (2013). 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* *24*, 2206–2223.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.J., and members, P. (2011). 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. *Ann Oncol* *22*, 1736–1747.

Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P.A. (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* *50*, 7–33.

Hattrup, C.L., and Gendler, S.J. (2006). MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* *8*, R37.

Hayes, D.F., Mesa-Tejada, R., Papsidero, L.D., Croghan, G.A., Korzun, A.H., Norton, L., Wood, W., Strauchen, J.A., Grimes, M., and Weiss, R.B. (1991). Prediction of prognosis in primary breast cancer by detection of a high molecular weight mucin-like antigen using monoclonal antibodies DF3, F36/22, and CU18: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* *9*, 1113–1123.

He, Y., Ye, M., Zhou, L., Shan, Y., Lu, G., Zhou, Y., Zhong, J., Zheng, J., Xue, Z., and Cai, Z. (2017). High Rab11-FIP4 expression predicts poor prognosis and exhibits tumor promotion in pancreatic cancer. *Int J Oncol* *50*, 396–404.

Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* *4*, 45–60.

Ibrahim, N.K., Yariz, K.O., Bondarenko, I., Manikhas, A., Semiglazov, V., Alyasova, A., Komisarenko, V., Shparyk, Y., Murray, J.L., Jones, D., *et al.* (2011). Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* *17*, 6822–6830.

Julien, S., Adriaenssens, E., Ottenberg, K., Furlan, A., Courtand, G., Vercoutter-Edouart, A.S., Hanisch, F.G., Delannoy, P., and Le Bourhis, X. (2006). ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology* *16*, 54-64.

Julien, S., Ivetic, A., Grigoriadis, A., QiZe, D., Burford, B., Sproviero, D., Picco, G., Gillett, C., Papp, S.L., Schaffer, L., *et al.* (2011). Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res* *71*, 7683-7693.

Julien, S., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M.A., Courtand, G., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2005). Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* *90*, 77-84.

Kashiwagi, H., Kijima, H., Dowaki, S., Ohtani, Y., Tobita, K., Tsukui, M., Tanaka, Y., Matsubayashi, H., Tsuchida, T., Yamazaki, H., *et al.* (2000). DF3 expression in human gallbladder carcinoma: significance for lymphatic invasion. *Int J Oncol* *16*, 455-459.

Kimura, T., and Finn, O.J. (2013). MUC1 immunotherapy is here to stay. *Expert Opin Biol Ther* *13*, 35-49.

Kimura, T., McKolanis, J.R., Dzubinski, L.A., Islam, K., Potter, D.M., Salazar, A.M., Schoen, R.E., and Finn, O.J. (2013). MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study. *Cancer Prev Res (Phila)* *6*, 18-26.

Kinlough, C.L., McMahan, R.J., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L., Stremple, R.J., Kashlan, O.B., Weixel, K.M., Weisz, O.A., and Hughey, R.P. (2006). Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation. *J Biol Chem* *281*, 12112-12122.

Kohlgraf, K.G., Gawron, A.J., Higashi, M., Meza, J.L., Burdick, M.D., Kitajima, S., Kelly, D.L., Caffrey, T.C., and Hollingsworth, M.A. (2003). Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to

invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line. *Cancer Res* 63, 5011-5020.

Kufe, D., Inghirami, G., Abe, M., Hayes, D., Justi-Wheeler, H., and Schlom, J. (1984). Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* 3, 223-232.

Kufe, D.W. (2013). MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* 32, 1073-1081.

Leng, Y., Cao, C., Ren, J., Huang, L., Chen, D., Ito, M., and Kufe, D. (2007). Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *J Biol Chem* 282, 19321-19330.

Litvinov, S.V., and Hilkens, J. (1993). The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* 268, 21364-21371.

Lloyd, K.O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B.W., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem* 271, 33325-33334.

Lüttges, J., Feyerabend, B., Buchelt, T., Pacena, M., and Klöppel, G. (2002). The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 26, 466-471.

Maeshima, A., Miyagi, A., Hirai, T., and Nakajima, T. (1997). Mucin-producing adenocarcinoma of the lung, with special reference to goblet cell type adenocarcinoma: immunohistochemical observation and Ki-ras gene mutation. *Pathol Int* 47, 454-460.

Matsushita, T., Takada, W., Igarashi, K., Naruchi, K., Miyoshi, R., Garcia-Martin, F., Amano, M., Hinou, H., and Nishimura, S. (2014). A straightforward protocol for the preparation of high performance

microarray displaying synthetic MUC1 glycopeptides. *Biochim Biophys Acta* *1840*, 1105–1116.

McGuckin, M.A., Walsh, M.D., Hohn, B.G., Ward, B.G., and Wright, R.G. (1995). Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol* *26*, 432–439.

Medina, M., Vélez, D., Asenjo, J.A., Egea, G., Real, F.X., Gil, J., and Subiza, J.L. (1999). Human colon adenocarcinomas express a MUC1-associated novel carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine Ehrlich tumor cells. *Cancer Res* *59*, 1061–1070.

Mitchell, P., Thatcher, N., Socinski, M.A., Wasilewska-Tesluk, E., Horwood, K., Szczesna, A., Martín, C., Ragulin, Y., Zukin, M., Helwig, C., *et al.* (2015). Tecemotide in unresectable stage III non-small-cell lung cancer in the phase III START study: updated overall survival and biomarker analyses. *Ann Oncol* *26*, 1134–1142.

Murugaesu, N., Iravani, M., van Weverwijk, A., Ivetic, A., Johnson, D.A., Antonopoulos, A., Fearn, A., Jamal-Hanjani, M., Sims, D., Fenwick, K., *et al.* (2014). An in vivo functional screen identifies ST6GalNAc2 sialyltransferase as a breast cancer metastasis suppressor. *Cancer Discov* *4*, 304–317.

Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., *et al.* (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* *59*, 5464–5470.

Nakamori, S., Ota, D.M., Cleary, K.R., Shirotani, K., and Irimura, T. (1994). MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* *106*, 353–361.

Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* *20*, 332–342.

Oosterkamp, H.M., Scheiner, L., Stefanova, M.C., Lloyd, K.O., and Finstad, C.L. (1997). Comparison of MUC-1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z). *Int J Cancer* *72*, 87-94.

Patton, S., Gendler, S.J., and Spicer, A.P. (1995). The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta* *1241*, 407-423.

Perey, L., Hayes, D.F., and Kufe, D. (1992). Effects of differentiating agents on cell surface expression of the breast carcinoma-associated DF3-P epitope. *Cancer Res* *52*, 6365-6370.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747-752.

Posey, A.D., Jr., Clausen, H., and June, C.H. (2016a). Distinguishing Truncated and Normal MUC1 Glycoform Targeting from Tn-MUC1-Specific CAR T Cells: Specificity Is the Key to Safety. *Immunity* *45*, 947-948.

Posey, A.D., Jr., Schwab, R.D., Boesteanu, A.C., Steentoft, C., Mandel, U., Engels, B., Stone, J.D., Madsen, T.D., Schreiber, K., Haines, K.M., *et al.* (2016b). Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* *44*, 1444-1454.

Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Lüders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sørlie, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., and Børresen-Dale, A.L. (2010). Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol* *4*, 98-118.

Rahn, J.J., Dabbagh, L., Pasdar, M., and Hugh, J.C. (2001). The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast

carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer* *91*, 1973-1982.

Raina, D., Ahmad, R., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2012). Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int J Oncol* *40*, 1643-1649.

Recchi, M.A., Hebbar, M., Hornez, L., Harduin-Lepers, A., Peyrat, J.P., and Delannoy, P. (1998). Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res* *58*, 4066-4070.

Robert, M.E., Washington, M.K., Lee, J.R., Goldenring, J.R., Bronner, M.P., Goldblum, J.R., Greenson, J.K., Haber, M.M., Hart, J.A., Lamps, L.W., *et al.* (2005). Rab11a immunohistochemical analysis does not distinguish indefinite, low-, and high-grade dysplasia in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* *124*, 519-527.

Safi, F., Kohler, I., Röttinger, E., and Beger, H. (1991). The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer* *68*, 574-582.

Sewell, R., Bäckström, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gätgens, J., Clausen, H., Hansson, G.C., Burchell, J., *et al.* (2006). The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* *281*, 3586-3594.

Singh, R., and Bandyopadhyay, D. (2007). MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* *6*, 481-486.

Siroy, A., Abdul-Karim, F.W., Miedler, J., Fong, N., Fu, P., Gilmore, H., and Baar, J. (2013). MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* *44*, 2159-2166.

Spitzwieser, M., Holzweber, E., Pfeiler, G., Hacker, S., and Cichna-Markl, M. (2015). Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer. *Breast Cancer Res* 17, 125.

Strous, G.J., and Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27, 57-92.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.

Tarp, M.A., and Clausen, H. (2008). Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim Biophys Acta* 1780, 546-563.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M., and Parton, R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135, 913-924.

van der Vegt, B., de Roos, M.A., Peterse, J.L., Patriarca, C., Hilkens, J., de Bock, G.H., and Wesseling, J. (2007). The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* 51, 322-335.

Welinder, C., Baldetorp, B., Blixt, O., Grabau, D., and Jansson, B. (2013). Primary breast cancer tumours contain high amounts of IgA1 immunoglobulin: an immunohistochemical analysis of a possible carrier of the tumour-associated Tn antigen. *PLoS One* 8, e61749.

Welz, T., Wellbourne-Wood, J., and Kerkhoff, E. (2014). Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol* 24, 407-415.

Wesseling, J., van der Valk, S.W., and Hilkens, J. (1996). A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell* 7, 565-577.

Wesseling, J., van der Valk, S.W., Vos, H.L., Sonnenberg, A., and Hilkens, J. (1995). Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 129, 255-265.

Willsher, P.C., Xing, P.X., Clarke, C.P., Ho, D.W., and McKenzie, I.F. (1993). Mucin 1 antigens in the serum and bronchial lavage fluid of patients with lung cancer. *Cancer* 72, 2936-2942.

Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., and Kufe, D. (1997). Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 272, 12492-12494.

Yang, E., Hu, X.F., and Xing, P.X. (2007). Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histol Histopathol* 22, 905-922.

Yin, L., and Kufe, D. (2011). MUC1-C Oncoprotein Blocks Terminal Differentiation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by a ROS-Mediated Mechanism. *Genes Cancer* 2, 56-64.

Zhang, S., Zhang, H.S., Reuter, V.E., Slovin, S.F., Scher, H.I., and Livingston, P.O. (1998). Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin Cancer Res* 4, 295-302.