

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

(片山 彩香) 印

(学位論文のタイトル)

Expression patterns of claudins in patients with triple-negative breast cancer are associated with nodal metastasis and worse outcome

(クローディングの発現パターンはトリプルネガティブ乳癌におけるリンパ節転移や予後不良に関連している)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

Claudins (CLDNs) は、細胞接着因子の一つで、Tight junction (TJ) を構成する主要な膜蛋白である。組織特異的に発現調節され、少なくとも27種類が報告されている。バリア機能やイオン透過性、細胞極性や増殖などに重要で、最近では、各種悪性腫瘍におけるCLDNsの発現が評価され、癌の予後や悪性度との関連が指摘されている。しかし、癌細胞によって発現パターンが変化するため、その発現解析に統一的な見解は示されていない。乳癌、特にTriple-negative乳癌 (TNBC) の中には、CLDN3, 4, 7とE-cadherinの発現低下を特徴とする一群、claudin-lowサブタイプが遺伝子発現プロファイリングで同定されており、CLDNsの発現意義の解明は重要である。今回、乳癌、特にTNBCにおいてCLDNs (CLDN1, 3, 4, 7) の発現を、単独あるいは乳癌幹細胞 (Breast Cancer Stem Cell: BCSC) マーカーやEMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 関連因子などとの組み合わせで評価し、臨床病理学的な因子との関連を検討した。

対象は1999年-2002年と2008年-2010年に群馬大学附属病院で手術を施行した原発性浸潤性乳癌222例で、術前治療後や検体不良の症例は除外した。ホルマリン固定された組織からTMAs (tissue microarrays) を作成し、免疫染色による発現解析を行った。全222症例をER、PR、HER2、Ki67でLuminal A, B HER2, TNBCの4型にサブタイプ分類し、CLDNs (CLDN1, 3, 4, 7)、BCSCマーカー (CD44, CD24, ALDH1)、EMT関連因子 (E-cadherin, Snail, Twist, ZEB1) の発現を調べた。さらに、TNBCを4つのsubgroupとして、basal-like (CK5/6 + and/or EGFR+)、claudin-low (low CLDN3, 4, and 7 or E-cadherin negative, or both)、mixed (basal-likeとclaudin-lowの2つの染色性を合わせもつ)、null (どれにも属さない) に分類した。また、腫瘍の浸潤形式を3つ (expanding、intermediate、infiltrating) に分けた。

結果、全222症例をintrinsic subtype分類で4つに分けると、TNBC 68症例 (30.6%)、Luminal A 104症例 (46.8%)、Luminal B 27症例 (12.2%)、HER2 23症例 (10.4%)であった。TNBCのsubgroupは、basal-like 23症例 (34.3%)、claudin-low 22症例 (32.8%)、mixed 12症例 (17.9%)、null 10症例 (14.9%)であった。染色結果をintrinsic subtypeで見ると、TNBCにおいてCLDNs ( $p < 0.001$ )、ZEB1 ( $p < 0.001$ )、BCSCマーカー (CD44+CD24-  $p < 0.001$ , ALDH1+  $p = 0.026$ , CD44+CD24-ALDH1+  $p < 0.001$ ) の陽性率が有意に高かった。TNBCにおけるCLDNsの発現では、CLDN3, 4はBCSCマーカー、CLDN3, 7はEGFR、CLDN4はZEB1との相関があった。CLDN4 highは、高Ki67 LI ( $p = 0.004$ )と高核グレード ( $p = 0.02$ )といった悪性度の高い性質と相関していた。CLDN7は腫瘍の浸潤形式と相関しており、CLDN7 lowはinfiltratingが有意に多かった ( $p = 0.01$ )。リンパ節転移と関連するCLDNsは、単独ではCLDN4 ( $p = 0.021$ )のみ、組み合わせでは、CLDN4 high/CLDN1 low (CLDN4H1L) ( $p = 0.040$ )、CLDN4 high/CLDN7 low (CLDN4H7L) ( $p = 0.005$ )、CLDN4 high/CLDN1 low/CLDN7 low (CLDN4H1L7L) ( $p = 0.018$ )だった。他に、高Ki67 LI ( $p = 0.005$ )、高核グレード ( $p = 0.025$ )、脈管侵襲 ( $p = 0.001$ ) がリンパ節転移と関連し、多変量解析ではCLDN4H7Lと高Ki67LIが独立した因子であった。TNBCにおける予後解析では、平均観察期間は88.7ヶ月で、無再発生存率 (RFS)、乳癌特異的生存率 (BCSS)、全生存率 (OS) について検討した。Kaplan-Meier法にて、claudin-low phenotype (claudin-lowとmixedをあわせたもの) はRFS ( $p = 0.042$ )とBCSS ( $p = 0.038$ )が不良で、同様にE-cadherin発現や浸潤形式もRFSとBCSSに関連していた。さらに、CLDN1 low/CLDN7 low/E-cadherin negative (CLDN1L7LEcad-)の組み合わせもRFSとBCSSの不良因子であった。また、CLDN1L7LEcad-は、OSの不良因子としての傾向を示した ( $p = 0.051$ )。多変量解析では、CLDN1L7LEcad-がRFS、浸潤様式がBCSSの独立した予後規定因子であった。

以上より、TNBCにおいて、CLDNsやE-cadherinなどの発現を組み合わせることで、リンパ節転移や再発予測因子のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。