

## 学位論文の内容の要旨

半田 正 印

Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer

(カルボキシペプチダーゼA4の蓄積は、トリプルネガティブ乳癌における進行や予後不良に関連する)

### [背景]

乳癌は病理学的組織診断による形態学的な分類が主流であったが、2000年に PerouらはcDNA microarray法を用いた網羅的遺伝子発現解析により乳癌が estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)などのホルモンレセプターやhuman epidermal growth factor receptor2 (HER2)の発現特徴により Intrinsic subtype (Luminal A, Luminal B, HER2増幅, Basal like)という新たな概念で分類できると報告した (*Nature*, 2000, 406:747-752.)。この分類を利用することで乳癌の悪性度・予後予測、ホルモン療法や HER2阻害抗体などの分子標的治療の効果予測が可能となった。しかし、実臨床では全乳癌症例にcDNA microarrayが実施されているわけではなく、コストや簡便さなどから従来頻用されてきた免疫染色により乳癌をIntrinsic subtype別に分類する手法が主流である。免疫染色を用いたIntrinsic subtype分類では、乳癌はLuminal A (ER、PgRのどちらか一方が陽性、HER2陰性)、Luminal B (ER、PgRのどちらか一方が陽性、HER2陽性)、HER2 (ER、PgR陰性、HER2陽性)、Triple negative breast cancer (TNBC) (ER、PgR、HER2陰性)に分類され、それぞれのtypeに応じた治療法が選択される。このなかで乳癌の約15-20%を占めるTNBCは若年発症し、予後が不良なケースも多く、さらにホルモン治療や分子標的薬治療も効果をしめさないことから新規治療アームの開発が切望されている。本研究ではTNBCに注目し、RNAシーケンス法、shRNAスクリーニング法、免疫染色法を用いて新規TNBC特異的治療標的分子の同定、検証を試みた。

### [方法]

TNBC細胞株3株 (MDA-MB468, HCC70, HCC1143)、non-TNBC細胞株3株 (MCF7, T-47D, BT474)を用いてTNBCに特異的高発現かつTNBC細胞株生存に寄与する遺伝子群をRNAシーケンス法、shRNAスクリーニング法で選定した。さらに公共データベースを用いて選定遺伝子群の正常組織での発現プロファイルを検証し、腫瘍特異性の高い遺伝子群をさらに選別した。そのTNBC特異的高発現治療標的候補か

ら、本研究ではCarboxypeptidase A4 (CPA4)に注目した。CPA4はゲノムインプリンティング遺伝子の1つであり、種々の癌で発現が認められている (*Genomics*, 2004, Mar;83(3):402-12., *Am J Transl Res*, 2016, Nov15;8(11):5071-5075., *J Cancer*, 2016, Jun18;7(10):1197-204.)。本研究において、乳癌221症例 (TNBC 68症例を含む)でのCPA4発現を免疫染色法で評価し、その発現と臨床病理学的因子、予後、既存の乳癌マーカー発現との関連を検証した。さらにTNBC細胞株 (MDA-MB468, MDA-MB231)を用いてCPA4機能解析を施行した。

#### [結果]

1. CPA4は非癌部と比較して癌部で高発現しており、主に乳癌細胞の細胞質で発現していた。
2. 乳癌221症例における検討では、CPA4発現と臨床病理学的諸因子との関連は認めなかったが、CPA4高発現症例は有意に乳癌幹細胞マーカーであるALDH1発現陽性例が多かった。
3. TNBC 68症例における検討では、CPA4高発現症例は増殖マーカーKi67 labeling index低値、乳癌幹細胞マーカー (CD44 high/CD24 low)高発現、上皮マーカーE-cadherin発現が有意に低かった。
4. 乳癌221症例では乳癌CPA4発現症例は患者予後と有意な関連を認めなかった。
5. TNBC 68症例ではCPA4高発現症例はOverall survival (OS)、Disease free survival (DFS)解析において有意に予後不良であった。TNBC症例における癌部CPA4高発現は独立予後因子であった。
6. また高核異型度TNBC症例、リンパ節転移陽性TNBC症例でのCPA4発現と予後の関係を解析した結果、CPA4高発現症例は有意に予後不良であった。
7. CPA4特異的siRNAを用いてCPA4機能解析を施行した結果、CPA4抑制TNBC細胞はE-cadherin発現が亢進し、増殖能・遊走能が有意に抑制された。

#### [考察]

近年、本研究で注目したTNBCはLehmannらのcDNA microarray解析により、basal-like1、basal-like2、immunomodulatory、luminal androgen receptor、mesenchymal、mesenchymal stem-like (MSL)というようにさらに細分類された。本研究でのCPA4高発現TNBCの特徴は、E-cadherin発現と逆相関し、乳癌幹細胞マーカー発現と相関し、さらにCPA4抑制TNBC細胞の増殖能・遊走能が有意に抑制されたことから、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) 及び増殖因子経路、成長因子シグナル経路、血管新生、免疫シグナルの増幅を特徴とするMSLタイプに関連することが示唆された。

#### [結語]

乳癌におけるCPA4高発現はTNBCの予後不良マーカー、新規治療標的分子として有望である。