

乳腺アポクリン癌における PGC1 $\alpha$  と p62 発現に  
関する研究

日本大学医学部 病態病理学系 病理学分野

淵之上 史

申請年 2014 年

指導教員 増田 しのぶ

乳腺アポクリン癌における PGC1 $\alpha$  と p62 発現に  
関する研究

日本大学医学部 病態病理学系 病理学分野

淵之上 史

申請年 2014 年

指導教員 増田 しのぶ

## 目次

第1章 概要	1
第2章 緒言	4
2-1 癌と代謝	4
2-2 乳癌と代謝異常	4
2-3 乳癌における乳腺アポクリン癌の位置づけ	5
2-4 ミトコンドリア合成、脂質代謝と乳腺アポクリン癌	5
2-5 オートファジーと乳腺アポクリン癌	6
第3章 研究の目的	7
第4章 研究計画	8
第5章 対象と方法	9
5-1 検討 I: ミトコンドリア、脂質代謝関連分子の探索的検討	9
5-2 検討 II: 免疫組織化学的手法による PGC1 $\alpha$ 、p62 蛋白の解析	11
5-3 検討 III: PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA の遺伝子発現定量解析	13
5-4 検討 IV: siRNA を用いた p62 ノックダウンによる腫瘍増殖抑制実験	15
5-5 統計学的解析	18
第6章 結果	19
6-1 検討 I	19
6-2 検討 II	19
6-3 検討 III	20
6-4 検討 IV	21
第7章 考察	22
第8章 結語	26
第9章 謝辞	27
第10章 図表	28
第11章 引用文献	51
第12章 研究業績目録	55

## 第1章 概要

### 背景：

近年、癌細胞独自の代謝形式が新たな治療につながる領域として注目を集めている。その理由は、癌遺伝子変異によって多くのシグナル伝達経路が変化しているにも関わらず、癌細胞の代謝はほぼ一定であるからである<sup>1</sup>。

代謝機構の一つであるオートファジーは、余剰副産物の分解代謝機構である<sup>2</sup>。多くの癌細胞においてはオートファジー機能が亢進しているが<sup>3</sup>、肝細胞癌など一部の癌細胞や神経変性疾患ではオートファジー不全状態に陥っている<sup>4</sup>。また、オートファジー不全は癌化や腫瘍増殖促進の原因となる可能性があり、癌や神経変性疾患の治療標的として注目されている<sup>2</sup>。

アポクリン癌は乳癌特殊型に分類されており、細胞質に多量のミトコンドリアや脂肪滴を含むことが特徴である<sup>5-7</sup>。乳癌の約4%と頻度は少ない組織型であるが、ほとんどの症例はandrogen receptor (AR)陽性を示すことより、新たな治療対象群として着目されている<sup>8,9</sup>。近年、DNA マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現のクラスター解析により、アポクリン癌では、脂質代謝など代謝関連分子遺伝子が高発現していることが解明された<sup>10</sup>。また、アポクリン癌の細胞質にはミトコンドリアや脂肪滴を豊富に含むことと、肝細胞癌などに見られる、オートファジー不全状態を反映する細胞質内封入体に類似した構造を有することより、通常の癌とは異なった代謝機構、すなわち、1)ミトコンドリア、脂質の産生増加、2)オートファジー不全、が生じていることが推察されるが、詳細な検討報告はない。

### 目的：

本研究の目的は、乳腺アポクリン癌においてミトコンドリア新生・脂質代謝関連因子であるPGC1 $\alpha$ 発現状況と、オートファジー・細胞増殖関連因子であるp62発現状況を明らかにすること、またp62発現抑制による腫瘍細胞増殖抑制効果を検証することである。最終的には、乳腺アポクリン癌の形態に寄与する原因物質の特定と、個別化治療のための新たな標的分子を探索することを目標とする。

## 対象と方法：

まず、探索的検討として、2005-2010年に当院において乳癌切除手術された、初発未治療女性群1,015例より、無作為に選択したアポクリン癌12例、非アポクリン癌10例を抽出した。手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、マイクロダイセクション法とリアルタイムPCR法を用い、ミトコンドリア関連分子5種類（PGC1 $\alpha$ 、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4）についてのmRNA発現を定量し、乳腺アポクリン癌と非アポクリン癌とで発現差のある分子を検索した。

次に、2000-2012年に当院において乳癌切除手術された、初発未治療女性群1,895例より、アポクリン癌47例、非アポクリン癌62例を対象として検討を行った。探索的検討で抽出されたミトコンドリア新生・脂質代謝関連分子であるPGC1 $\alpha$ 、加えてオートファジー・細胞増殖関連因子であるp62について、免疫組織化学的発現検討を行った。また、アポクリン癌47例、非アポクリン癌44例について、マイクロダイセクション法とリアルタイムPCR法を用いたPGC1 $\alpha$ とp62のmRNA発現の検討を行った。

さらに、乳腺アポクリン癌培養細胞（MDA-MB-453、MFM223）をもちい、p62ノックダウンによる細胞増殖抑制の有無をBrdU法で検討した。

## 結果：

探索的検討の結果、アポクリン癌は非アポクリン癌と比して、5つのミトコンドリア関連分子のうち、PGC1 $\alpha$ mRNAの発現量が高い傾向を示した。

免疫組織化学的検討では、アポクリン癌は非アポクリン癌に対して、PGC1 $\alpha$ 、p62ともに、陽性率が有意に高かった。アポクリン癌と非アポクリン癌における、PGC1 $\alpha$ とp62との関連性について検討した結果、アポクリン癌と非アポクリン癌ともに、PGC1 $\alpha$ 陽性群と陰性群との間には、p62の陽性率に有意差は認められなかった。

遺伝子学的検討では、アポクリン癌は非アポクリン癌に比べ、PGC1 $\alpha$ mRNA発現量が有意に高かった。しかし、p62mRNA発現量には差が見られなかった。

アポクリン癌モデルの乳癌培養細胞（MDA-MB-453、MFM223）において、p62のノックダウン実験を行った結果、腫瘍増殖抑制効果が認められた。

考察：

乳腺アポクリン癌組織において、PGC1 $\alpha$  蛋白陽性率が高く、mRNA 高発現が明らかとなり、乳腺アポクリン癌におけるミトコンドリアや脂肪滴の貯留には、PGC1 $\alpha$  発現が関与する可能性が示された。

アポクリン癌組織において、p62 蛋白陽性率は高いが、mRNA の高発現は伴っていなかったことより、アポクリン癌ではオートファジー不全が存在する可能性が示された。すなわち、アポクリン癌で貯留するミトコンドリアや脂肪滴は、産生能亢進のみでなく、オートファジー不全による貯留である可能性が見いだされた。しかし、非アポクリン癌においても p62 陽性症例を 21.0%に認め、したがって、他のオートファジー関連因子を検索し、よりアポクリン癌に特異的な分子の検索が今後の研究課題と考えられた。

アポクリン癌モデルの乳癌培養細胞を用い、p62 のノックダウンによる腫瘍増殖抑制効果を示し、p62 は治療標的となる可能性があることを見いだした。

まとめ：

乳腺アポクリン癌手術切除検体における PGC1 $\alpha$  と p62 の蛋白陽性率、mRNA 定量解析、アポクリン癌培養細胞における、p62 発現抑制がもたらす細胞増殖抑制効果について検討した。アポクリン癌細胞において、PGC1 $\alpha$  発現亢進が明らかとなったことより、アポクリン癌におけるミトコンドリアや脂肪滴の貯留には、PGC1 $\alpha$  発現が関与する可能性が示された。また、アポクリン癌細胞において、p62 蛋白の貯留が明らかとなったことより、アポクリン癌の特殊な細胞形態は、オートファジー不全状態による、という仮説が導かれた。さらに、p62 が新たな乳癌治療標的となる可能性が示された。

## 第2章 緒言

### 2-1 癌と代謝

現在の癌薬物治療は、限られた分子を阻害する、化学療法や分子標的治療が主流である。しかし複雑な癌細胞シグナル伝達経路の中で、一部の分子を阻害するのみでは、治療適用や効果が限られることが問題となっており、癌治療の新たなパラダイムが求められている。そこで、癌細胞独自の代謝形式が新たな治療につながる領域として注目を集めている<sup>1</sup>。なぜならば、癌遺伝子変異によって多くのシグナル伝達経路が変化しているにも関わらず、癌細胞の代謝はほぼ一定であるからである<sup>1</sup>。

図 1a に正常細胞の代謝を示す。グルコースが解糖系で異化され、ミトコンドリア内の TCA 回路でエネルギー分子である ATP が産生される。解糖系の副産物として核酸・アミノ酸・脂質が、TCA 回路の副産物としてアミノ酸・脂質が合成される<sup>11</sup>。余剰副産物は、オートファジー（自己物質分解・再利用機構）で調整される<sup>2</sup>。図 1b に多くの癌細胞に共通する代謝を示す。特徴は、解糖系の亢進であり（ワーブルグ効果）、これにより核酸・アミノ酸・脂質が多量に合成され、癌細胞自身の複製、増殖に使用される<sup>12</sup>。オートファジーは正常細胞よりも亢進しており、これは異常蛋白等を再利用し、細胞増殖を効率化するためと考えられている<sup>3</sup>。近年、癌細胞の解糖系亢進状態を利用した PET 検査の普及など、癌細胞の代謝様式を応用した技術が医療に貢献している。また、オートファジー不全は癌化や腫瘍増殖促進の原因となる可能性があり、癌や神経変性疾患の治療標的として注目されている<sup>13</sup>。

### 2-2 乳癌と代謝異常

乳癌発症リスク因子の一つとして肥満があり、そのメカニズムは脂肪組織内でのエストロゲン過剰産生と考えられている。しかし、この発症メカニズムはエストロゲン過剰産生のみでは説明ができないことより、代謝異常に着目した研究がなされており、脂質代謝関連分子の増加が乳癌発生のリスクとなる可能性が報告されている<sup>14-16</sup>。

### 2-3 乳癌における乳腺アポクリン癌の位置づけ

乳癌は形態学的分類による診断と同時に、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor; PgR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 発現による分類が行われ、これにより全身療法(内分泌療法、分子標的療法、化学療法)が選択される。ER が陽性であれば内分泌療法、HER2 が陽性であれば抗 HER2 療法を施行するが、いずれも陰性の場合には、生物学的特徴を欠くため化学療法が唯一の手段となっている。

アポクリン癌は乳癌特殊型に分類されており、光顕的にアポクリン腺への分化(断頭分泌を有する好酸性細胞質、大型核、明瞭な核小体)を癌全体の90%以上に認めるもの、と定義されている<sup>8</sup>。細胞質に多量のミトコンドリアや脂肪滴を含むことが特徴である<sup>5-7</sup>。乳癌の約4%と頻度は少ない組織型であるが、ほとんどの症例はER陰性、androgen receptor (AR) 陽性を示すことより、新たな治療対象群として着目されている<sup>8,9</sup>。近年、DNAマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現のクラスター解析により、アポクリン癌では、脂質代謝など代謝関連分子遺伝子が高発現していることが解明された<sup>10</sup>。以上より、アポクリン癌では代謝異常が生じている可能性が考えられるが、病理組織を用いた詳細な検討報告はない。

### 2-4 ミトコンドリア合成、脂質代謝と乳腺アポクリン癌

そこで、ミトコンドリア合成や脂質代謝に関わる分子に着目した。peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ )は核内に存在する転写補助因子であり、ミトコンドリア合成のみならず、脂肪滴合成に関わる分子である<sup>17-20</sup>。主に褐色脂肪細胞や肝細胞に発現するが、乳腺上皮や乳癌細胞にも発現する。癌細胞では、PGC1 $\alpha$ の腫瘍増殖効果と抗腫瘍効果の相反する報告がある<sup>21</sup>。興味深いことに、PGC1 $\alpha$ はAR陽性前立腺癌細胞の増殖を活性化する<sup>22</sup>。アポクリン癌では、ミトコンドリアが増生し、脂肪滴沈着があり、AR陽性例が多いことから、PGC1 $\alpha$ との関連が推察されるが詳細な検討報告はない。さらに、ミトコンドリアの機能に関わる分子である、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4は、ミトコンドリアにおける電子伝達系関連分子産生に関連する因子であるが<sup>23</sup>、アポクリン癌における検討報告はない。



## 2-5 オートファジーと乳腺アポクリン癌

次に、ミトコンドリア・脂質・蛋白質を分解する代謝様式である、オートファジーに注目した。オートファジーの不全が起こると、オートファジーのアダプター蛋白質である p62 (図 2) や、異常ミトコンドリアが分解されずに蓄積する。p62 は NF- $\kappa$ B を介した腫瘍形成促進にも関与する。このため、オートファジー不全は癌化<sup>24</sup>や腫瘍増殖促進<sup>25, 26</sup>の原因である可能性があり、癌や神経変性疾患の治療標的として注目されている<sup>2</sup>。肝細胞癌やアルコール性肝障害の肝細胞質内封入体 (マロリー体) や神経変性疾患の神経細胞質内封入体は、オートファジー不全による p62 蛋白質の異常蓄積である (図 3a, b)<sup>4</sup>。すなわち、p62 貯留はオートファジー不全の状態を意味する。アポクリン癌ではミトコンドリアが豊富であることと、細胞質内封入体があることより (図 3c)、通常の癌とは異なりオートファジー不全が生じていることが推察されるが、詳細な検討報告はない。

### 第3章 研究の目的

本研究の目的は、乳腺アポクリン癌においてミトコンドリア新生・脂質代謝関連因子である PGC1 $\alpha$  発現状況と、オートファジー・細胞増殖関連因子である p62 発現状況を明らかにすること、また p62 発現抑制による腫瘍細胞増殖抑制効果を検証することである。最終的には、乳腺アポクリン癌の形態に寄与する原因物質の特定と、個別化治療のための新たな標的分子を探索することを目標とする。

## 第4章 研究計画

本研究の目的である「乳腺アポクリン癌においてミトコンドリア新生・脂質代謝関連因子である PGC1 $\alpha$  発現状況と、オートファジー・細胞増殖関連因子である p62 発現状況を明らかにすること、また p62 発現抑制による腫瘍細胞増殖抑制効果を検証する」を達成するために、以下にあげる研究計画をたて検討を行った。

### 4-1 検討 I: ミトコンドリア、脂質代謝関連分子の探索的検討

探索的検討として、ミトコンドリア新生・脂質代謝関連分子である PGC1 $\alpha$ 、またミトコンドリア関連分子 4 種類 (Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4) についての mRNA 発現を real-time PCR 法で定量し、乳腺アポクリン癌と非アポクリン癌とで発現差のある分子を検索した。

### 4-2 検討 II: 免疫組織化学的手法による PGC1 $\alpha$ 、p62 蛋白の解析

4-1 の探索的検討で抽出されたミトコンドリア新生・脂質代謝関連分子である PGC1 $\alpha$  について、免疫組織化学的検討を行い、アポクリン癌と非アポクリン癌とで比較検討した。また、オートファジー・細胞増殖関連因子である、p62 も同時に検討を行った。

### 4-3 検討 III: PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA の遺伝子発現定量解析

マイクロダイセクション法により採取した乳癌腫瘍細胞を用いて、PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA 発現を real-time PCR 法で定量し、アポクリン癌と非アポクリン癌とで比較検討した。

### 4-4 検討 IV: siRNA を用いた p62 ノックダウンによる腫瘍増殖抑制実験

p62 siRNA を乳腺アポクリン癌培養細胞 (MDA-MB-453、MFM223) に導入して p62 発現をノックダウンし、これによる細胞増殖抑制の有無を BrdU 法で検討した。

## 第5章 対象と方法

### 5-1 検討 I: ミトコンドリア、脂質代謝関連分子の探索的検討

#### 5-1-1 対象

2005-2010年に当院において乳癌切除手術された乳癌患者症例1,015例のうち、初発未治療、女性、研究に組織の一部を用いる旨 informed consent を得られた症例のうち、無作為に選択したアポクリン癌12例、非アポクリン癌10例を対象とした。本検討を行うにあたり、当院倫理委員会の承認を受けた(147-1)。

#### 5-1-2 方法

##### 5-1-2-1 レーザーマイクロダイセクション法による乳癌標的細胞の切削・回収

対象症例のパラフィンブロックより8  $\mu\text{m}$ の切片を3枚ずつ作成し、メンブレンフィルムを密着させたスライドガラス上に貼付した後、室温で一晩静置し乾燥させた。キシレン、100%エタノールにて脱パラフィン後、トルイジンブルー染色を行った。PALM-MBIII-N (Carl Zeiss, Germany)を用いて腫瘍細胞集塊をマイクロダイセクションし、チューブに回収した。

##### 5-1-2-2 Total RNAの抽出

5-1-2-1で回収した腫瘍細胞をRNA extraction buffer (2% SDS, 0.1mM EDTA, 10mM Tris-HCl) 200  $\mu\text{l}$ とproteinase K 5  $\mu\text{l}$ と混和し、切片が完全に溶解するまで55°Cで1昼夜反応させた。Chloroform-isoamylalcohol (1:24) 60  $\mu\text{l}$ 、クエン酸飽和フェノール (pH 4.0) 220  $\mu\text{l}$ 、2M 酢酸ナトリウム 20  $\mu\text{l}$ を添加し攪拌後、2分間静置した。室温、15000rpmで15分間遠心分離し、上清200  $\mu\text{l}$ を新しいエッペンドルフチューブに移した。Isopropanol 200  $\mu\text{l}$ 、glycogen 2  $\mu\text{l}$ を添加し転倒混和後、-80°Cに30分間以上静置した。遠心分離を4°C、15000 rpmで15分間行い上清を除去した。さらに1000  $\mu\text{l}$ の70%エタノールを添加後、遠心分離を4°C、15000 rpmで5分間行い上清を除去し、沈渣として得られたtotal RNAを氷中乾燥させた後にRNaseフリー水6  $\mu\text{l}$ で再融解し、1  $\mu\text{l}$ はNanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific inc. MA, USA)を用いて吸光度による濃度測定を行った。

### 5-1-2-3 cDNA 合成

cDNA 合成は Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いた。表 1 に従い、氷上でテンプレート RNA を含んだゲノム DNA (gDNA) 除去反応液を調整し、42°C で 2 分間インキュベートし、直ちに氷上に静置した。表 2 に従い氷上で逆転写反応マスターミックスを調整し、逆転写反応マスターミックスを含んだ各チューブに gDNA 除去後のテンプレート RNA 液 (7  $\mu$ l) を添加し、42°C で 15 分間インキュベートした。Quantiscript reverse transcriptase を不活化するために 95°C で 3 分間インキュベートし、使用まで 4°C で保存した。

### 5-1-2-4 real-time RT-PCR 法による PGC1 $\alpha$ 、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4 遺伝子発現定量解析

5-1-2-3 で得られた cDNA 1  $\mu$ l を template とし、real-time RT-PCR 法による遺伝子発現定量解析をおこなった。PGC1 $\alpha$ 、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4、内因性コントロール遺伝子である GAPDH それぞれについて、隣接する exon 領域を含むように RT-PCR 用の primer を設計した(表 3)。設計には Primer 3 ソフトウェアを用いた。Power SYBER Green PCR Master Mix (Life Technologies, Tokyo, Japan) を用い、表 4 の通りマスターミックスを調節した。反応液を 96 ウェルプレートに分注し、シールした後に、ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて RT-PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、95°C 10 分間の酵素活性反応の後、95°C 15 秒、60°C 1 分間を 45 サイクルとした。mRNA の定量は相対定量解析法を用いて行った。まず、増幅曲線を閾値 (Threshold) の交点から Cycle time (Ct) 値を求め、標的 mRNA の Ct 値と内因性コントロールである GAPDH mRNA の Ct 値の差を発現レベルの差に換算する  $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて、各サンプルにおける PGC1 $\alpha$ 、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4 mRNA 発現量を定量した。

## 5-2 検討 II: 免疫組織化学的手法による PGC1 $\alpha$ 、p62 蛋白の解析

### 5-2-1 対象

2000-2012年に当院において乳癌切除手術された乳癌患者症例 1,895 例のうち、初発未治療、女性、研究に組織の一部を用いる旨 informed consent を得られた、アポクリン癌 47 例、非アポクリン癌 62 例、計 109 症例を対象とした。対象症例のサブタイプ分類、臨床病期、腫瘍径、リンパ節転移状況を表 5 に示した。また、正常乳腺上皮、正常乳腺アポクリン化生上皮を含む非乳癌症例 2 例も癌の対照としてもちいた。

### 5-2-2 方法

DAB 単染色: 抗原抗体反応、間接ポリマー法、DAB 発色

#### 1) 使用抗体

PGC1 $\alpha$  の発現検索のために抗 PGC1 $\alpha$  抗体 (polyclonal, Abcam, England)、p62 の発現検索のために抗 SQSTM1/p62 抗体 (2C11, Abcam)、ER の発現検索のために抗 ER 抗体 (clone 1D5, DAKO)、HER2 の発現検索のために Hercep Test II Kit (DAKO, Germany)、AR の発現検索のために抗 AR 抗体 (clone AR441, DAKO)、gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP15) の発現検索のために抗 GCDFP15 抗体 (clone 23A3, Abcam) を実験に用いた。一次抗体詳細と希釈濃度、賦活方法を表 6 に示す。

#### 2) 染色プロトコール

- ① テッシューマイクロアレイヤー (KIN-1, Azumaya, Tokyo, Japan) を用い、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの癌充実包巣部より 2 mm 径の組織片を抜き出し、Tissue microarray (TMA) ブロックを作成した。
- ② TMA ブロックより 4  $\mu$ m の切片を作成し、シランコーティングしたスライドグラスに貼布したのち、脱パラフィン、脱キシロールを行った。
- ③ ホルマリン色素除去を 5% アンモニア・95% エタノール溶液で室温 30 分間行い、蒸留水にて洗浄した。
- ④ PGC1 $\alpha$  に対する抗原性賦活化は、トリス EDTA バッファー (pH9.0) に浸漬し、オートクレーブによる加熱処理 (105 $^{\circ}$ C、10 分)、p62、GCDFP15 に対する抗原性賦活化は、クエン酸バッファー (pH6.0) に浸漬し、オートクレーブによる加熱処理 (105 $^{\circ}$ C、10 分)、AR に対する抗原性賦活化は、トリス EDTA バッファー (pH9.0) に浸漬し、ウォーターバスによる加熱処理 (95 $^{\circ}$ C、40 分)、を行い、室温に冷却、洗浄した。
- ⑤ 非特異反応のブロックを目的に 2% ブロックエース溶液 (Yukijirushi, Tokyo, Japan) を

室温 10 分間反応させた。

⑥ PBS 洗浄後、一次抗体を湿潤箱内で室温 30 分間反応させた。使用抗体は、表 6 に記載した。陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに PBS を反応させた。

⑦ PBS 洗浄後、PGC1 $\alpha$  に対する二次抗体として EnVision+ System HRP (Dako)、p62 に対する二次抗体として Histofine LSAB-PO Multi (Nichirei, Tokyo, Japan)、ER、AR、GCDFP15 に対する二次抗体として Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei) を用い、室温にて 30 分間反応させた。HER2 は Hercep Test II Kit (DAKO) に含まれる二次抗体を使用し、室温にて 30 分間反応させた。

⑧ PBS 洗浄し、過酸化水素加 DAB 水溶液中で反応物を可視化し、ヘマトキシリンによる対比染色を行い封入した。

### 3) 腫瘍組織における各抗体分子発現の判定基準

PGC1 $\alpha$ 、ER、AR は、染色陽性細胞比率と染色強度の総和による基準である Allred score and total score (染色陽性細胞比率を、Score 0: 陽性細胞なし、Score 1: 1/100 未満、Score 2: 1/100-1/10、Score 3: 1/10-1/3、Score 4: 1/3-2/3、Score 5: 2/3 以上、染色強度を、Score 0: 陰性、Score 1: 弱、Score 2: 中、Score 3: 強、に分類した後、染色陽性細胞比率と染色強度それぞれの score を合計して total score を算出し、0、2-8 の 8 段階に分類) を用いて評価し、total score が 3 以上を示すものを陽性と判定した<sup>27</sup>。p62 は細胞質と核がともに中等度陽性を示す細胞が 30% 以上存在するものを陽性とした。GCDFP15 は細胞質が軽度陽性を示す細胞が 10% 以上存在するものを陽性とした。HER2 は ASCO/CAP ガイドライン (score 0: 陽性細胞数 10% 未満、score 1+: ほとんど識別できないほどかすかな陽性細胞数 10% 以上、score 2+: 弱-中等度陽性細胞数 10% 以上、又は高度陽性細胞 10-30%、score 3+: 高度陽性細胞数 30% を超える) を用いて評価し、score 3+ を示すものを陽性とした<sup>28</sup>。PGC1 $\alpha$ 、p62 の対照として、正常乳腺上皮、正常乳腺アポクリン化生上皮を含む非乳癌症例 2 例をもちいた。

### 4) アポクリン癌、非アポクリン癌組織の評価

臨床・病理 乳癌取扱い規約 (第 17 版) の定義にもとづいた形態を示し、かつ GCDFP-15 陽性を示した浸潤癌をアポクリン癌とした。アポクリン癌の形態を示さず、かつ GCDFP-15 陰性を示した浸潤癌を非アポクリン癌とした。

### 5-3 検討 III: PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA の遺伝子発現定量解析

#### 5-3-1 対象

免疫組織化学的手法で用いた症例のうち、アポクリン癌全 47 例、無作為抽出した非アポクリン癌 44 例、計 91 症例を対象とした。

#### 5-3-2 PGC1 $\alpha$ 、p62、 $\beta$ -actin プライマーの設計

Nested PCR を施行するために、PGC1 $\alpha$ 、p62、 $\beta$ -actin とともに、first primer と second primer を用意した。First primer は、primer 3 ソフトウェアを用い、second primer の増幅領域を内包するように設計した。Second primer は、Taq Man primer/probe (PGC1 $\alpha$ : Hs01016730\_g1, p62: Hs00177654\_m1,  $\beta$ -actin: Hs01060665\_g1, Life Technologies) を用いた。first primer と second primer との関係を図 4 に示す。

#### 5-3-3 方法

##### 5-3-3-1 レーザーマイクロダイセクション法による乳癌標的細胞の切削・回収

5-2-2 2)①で作成した TMA ブロックより 8  $\mu$ m の切片を 6 枚ずつ作成し、メンブレンフィルムを密着させたスライドガラス上に貼付した後、室温で一晩静置し乾燥させた。キシレン、100%エタノールにて脱パラフィン後、トルイジンブルー染色を行った。PALM-MBIII-N (Carl Zeiss) を用いて腫瘍細胞集塊をマイクロダイセクションし、チューブに回収した。

##### 5-3-3-2 Total RNA の抽出

5-3-3-1 で回収した腫瘍細胞を RNA extraction buffer (2% SDS, 0.1mM EDTA, 10mM Tris-HCl) 200  $\mu$ l と proteinase K 5  $\mu$ l と混和し、切片が完全に溶解するまで 55°C で 1 昼夜反応させた。Chloroform-isoamylalcohol (1:24) 60  $\mu$ l、フェノール(pH 4.0) 220  $\mu$ l、2M 酢酸ナトリウム 20  $\mu$ l を添加し攪拌後、2 分間静置した。室温、15000rpm で 15 分間遠心分離し、上清 200  $\mu$ l を新しいエッペンドルフチューブに移した。Isopropanol 200  $\mu$ l、glycogen 2  $\mu$ l を添加し転倒混和後、-80°C に 30 分間以上静置した。遠心分離を 4°C、15000 rpm で 15 分間行い上清を除去した。さらに 1000  $\mu$ l の 70%エタノールを添加後、遠心分離を 4°C、15000 rpm で 5 分間行い上清を除去し、沈渣として得られた total RNA を氷中で乾燥させた後に RNase フリー水 6  $\mu$ l で再融解し、1  $\mu$ l は Nanodrop 1000 (Thermo Fisher



Scientific Inc.)を用いて吸光度による濃度測定を行った。

#### 5-3-3-3 cDNA 合成

cDNA 合成は Quantitect Reverse Transcription (Qiagen)を用いた。表 7 に従い、氷上でテンプレート RNA を含んだゲノム DNA (gDNA)除去反応液を調整し、42°Cで2分間インキュベートし、直ちに氷上に静置した。表 8 に従い氷上で逆転写反応マスターミックスを調整し、逆転写反応マスターミックスを含んだ各チューブに gDNA 除去後のテンプレート RNA 液 (7  $\mu$ l)を添加し、42°Cで15分間インキュベートした。Quantiscript reverse transcriptase を不活化するために95°Cで3分間インキュベートし、使用まで4°Cで保存した。

#### 5-3-3-4 real-time RT-PCR 法による PGC1 $\alpha$ 、p62 遺伝子発現定量解析

TMA ブロックを用いたパラフィン切片より回収できる total RNA は微量のため、標的遺伝子配列の pre-amplification を real-time RT-PCR 施行前に行った。Pre-amplification は AmpliTaq 360 Master Mix (Life Technologies)を用いて行った。表 9 の通りにマスターミックスを調整した。Pre-amplification 用の first primer 詳細は表 10 に示した。PCR 反応条件は 95°C 10 分、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクルとした。Pre-amplification で得られた反応産物 1  $\mu$ l を template とし、real-time RT-PCR 法による遺伝子発現定量解析をおこなった。TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies)を用い、表 11 の通りマスターミックスを調節した。TaqMan primer/probe は PGC1 $\alpha$ : Hs01016730\_g1、p62: Hs00177654\_m1 (Life Technologies)、内因性コントロールとして  $\beta$ -actin: Hs01060665\_g1 (Life Technologies)を用いた。反応液を 96 ウェルプレートに分注し、シールした後に、ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Life Technologies)を用いて RT-PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、95°C・10 分間の酵素活性反応の後、95°C・1 秒、60°C・20 秒を 45 サイクルとした。PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA の定量は相対定量解析法を用いて行った。まず、増幅曲線を閾値 (Threshold)の交点から Cycle time (Ct)値を求め、p62 mRNA の Ct 値と内因性コントロールである  $\beta$ -actin mRNA の Ct 値の差を発現レベルの差に換算する  $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて、各サンプルにおける PGC1 $\alpha$ 、p62 mRNA 発現量を定量した。

## 5-4 検討 IV: siRNA を用いた p62 ノックダウンによる腫瘍増殖抑制実験

### 5-4-1 使用細胞株

遺伝子クラスター解析によりアポクリン癌として報告された培養細胞のうち、MDA-MB-453 と MFM223 をもちいた<sup>29, 30</sup>。ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 は日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野の増田しのぶ教授より供与いただいた。MFM223 は European Collection of Cell Cultures (ECACC) より購入した。MDA-MB-453、MFM223 とともに、HE 染色で形態を確認し、脂肪染色で脂肪滴の有無を確認し、さらに免疫組織化学染色法で、ER、HER2、AR 発現の有無を確認した。

### 5-4-2 方法

#### 5-4-2-1 培養法

MDA-MB-453 は牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を 10%、penicillin 10 U/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を添加した L-15 培養液にて、37°C のインキュベーター内で培養、継代したものを使用した。

MFM223 は牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を 10%、penicillin 10 U/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を添加した MEM 培養液にて、37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養、継代したものを使用した。

#### 5-4-2-2 p62 siRNA 導入

① siRNA 導入の 24 時間前に、10% FBS を含む L-15 培養液中に MDA-MB-453 細胞、MEM 培養液中に MFM223 細胞を懸濁し、24 well ディッシュの 1 well あたり  $4 \times 10^4$  個、96 well ディッシュの 1 well あたり  $6 \times 10^3$  個となるようにそれぞれの細胞を播種した。MDA-MB-453 細胞は 37°C のインキュベーター内、MFM223 は 37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。

② p62 siRNA (siGENOME SMART pool, M-010230-00-0005, Life Technologies) を蒸留水で希釈し、2  $\mu$ M の siRNA 溶液を作成した。siRNA のネガティブコントロールとして、Non-Targeting (NTC) siRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA, D-001210-01-05, Life Technologies) を同様に蒸留水で希釈し、2  $\mu$ M の siRNA 溶液を作成した。

③ 2  $\mu$ M の p62 siRNA、NTC siRNA 溶液 100  $\mu$ l をそれぞれ 1900  $\mu$ l の OPTI-MEM 培地で希釈し、100 nM の siRNA 溶液希釈液 2000  $\mu$ l を作成した。

④ 48  $\mu$ l の Dharmafect4 試薬 (Life Technologies) を 3952  $\mu$ l の OPTI-MEM 培地で希釈した。これを③の p62 siRNA、NTC siRNA 溶液希釈液に 2000  $\mu$ l ずつ添加し、20 分間室温に静置した。

⑤ ④で作成した siRNA-Dharmafect4 混合液 2000  $\mu$ l に 10%FBS 添加 L-15 を 8000  $\mu$ l、また siRNA-Dharmafect4 混合液 2000  $\mu$ l に 10%FBS 添加 MEM を 8000  $\mu$ l 添加し、20 分間室温に静置し、siRNA 導入溶液を作成した。

⑥ MDA-MB-453、MFM223 それぞれのディッシュより培地を吸引除去し、⑤の siRNA 導入溶液を 24 well ディッシュの 1 well あたり 500  $\mu$ l、96 well ディッシュの 1 well あたり 100  $\mu$ l ずつ細胞に添加し、37°C で 24 時間培養した。

⑦ siRNA 導入溶液を除去し、MDA-MB-453 細胞には 10%FBS、penicillin 10 U/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を添加した L-15 培養液、MFM223 には 10%FBS、penicillin 10 U/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を添加した MEM 培養液を添加し、37°C で 48 時間培養した。

#### 5-4-2-3 p62 siRNA 導入によるノックダウンの測定

##### 1) RT-PCR 法による p62 mRNA の発現定量解析

###### ① total RNA の抽出

5-4-2-2 ⑦で作成した 24 well ディッシュで培養した細胞を PBS で 2 回洗浄し、1000  $\mu$ l の Trizol reagent (Life Technologies) を用いてそれぞれ 2 well 分の細胞を溶解し、エッペンドルフチューブに回収した。200  $\mu$ l の chloroform を添加し攪拌後、2 分間静置した。遠心分離を室温、15000 rpm で 15 分間行い、上清 500  $\mu$ l を新しいエッペンドルフチューブに移した。500  $\mu$ l の isopropanol を添加し攪拌後、10 分間静置した。遠心分離を室温、15000 rpm で 15 分間行い、上清を除去した。400  $\mu$ l の RNase フリー水、40  $\mu$ l の 2M 酢酸ナトリウム、800  $\mu$ l の 100%エタノールを添加し転倒混和後、-80°C に 30 分間以上静置した。遠心分離を 4°C、15000 rpm で 15 分間行い上清を除去した。さらに 1000  $\mu$ l の 70%エタノールを添加後、遠心分離を 4°C、15000rpm で 5 分間行い上清を除去し、沈渣として得られた total RNA を 55°C で 5 分間乾燥させた後に RNase フリー水で再融解し、1  $\mu$ l は Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて吸光度による濃度測定を行った。RNase フリー水で 500 ng/6  $\mu$ l の濃度に調整した。

###### ② cDNA の合成

cDNA 合成は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Tokyo,

Japan)を用いた。500 ng/6  $\mu$ l に調整したテンプレート RNA 6  $\mu$ l を 65°C で 5 分間インキュベートし、直ちに氷上に置いた。2  $\mu$ l の 4xDN Master Mix を加え、37°C で 5 分間インキュベートしてゲノム DNA を除去し、直ちに氷上に置いた。2  $\mu$ l の 5xRT Master Mix を加え、37°C・15 分間、50°C・5 分間インキュベートし、逆転写反応を行った。さらに 98°C・3 分間のインキュベートを行い、逆転写酵素を不活化した。得られた cDNA を RNase フリー水を用いて 10 ng/ $\mu$ l に希釈し、使用まで 4°C で保存した。

### ③ real-time RT-PCR 法による p62 遺伝子発現定量解析

real-time RT-PCR 法による遺伝子発現定量解析は、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies) を用い、表 12 の通りマスターミックスを調節した。TaqMan primer/probe は p62: Hs00177654\_m1,  $\beta$ -actin: Hs01060665\_g1 (Life Technologies) を用いた。反応液を 96 ウェルプレートに分注し、シールした後に、ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて RT-PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、95°C・10 分間の酵素活性反応の後、95°C・1 秒、60°C・20 秒を 45 サイクルとした。p62 mRNA の定量は相対定量解析法を用いて行った。まず、増幅曲線を閾値 (Threshold) の交点から Cycle time (Ct) 値を求め、p62 mRNA の Ct 値と内因性コントロールである  $\beta$ -actin mRNA の Ct 値の差を発現レベルの差に換算する  $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて、各サンプルにおける p62 mRNA 発現量を定量した。

### 2) ウェスタンブロッティング法による p62 の蛋白定量解析

5-4-2-2 ⑦で作成した 24 well ディッシュで培養した細胞を PBS で 2 回洗浄し、100  $\mu$ l の SDS を用いてそれぞれ 3 well 分の細胞をエッペンドルフチューブに回収し、超音波破碎した。遠心分離を室温、15000rpm で 5 分間行い、上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。BCA 法による蛋白定量を行い、SDS で 1  $\mu$ g/1  $\mu$ l となるように SDS で希釈した。SDS-10% polyacrylamide gel を用い蛋白質を電気泳動し、iBlot Dry Blotting System (Life Technologies) を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。蛋白検出には、マウスモノクローナル抗 p62 抗体 (clone 2C11, Abcam)、マウスモノクローナル抗  $\beta$ -actin 抗体 (clone 8226, Abcam) を 1 次抗体として使用した。HRP 標識抗マウス抗体 (ab131368, abcam) を 2 次抗体として使用した。Light-Capture (ATTO) を用いて化学発光を撮影し、CS Analyzer (ATTO) で p62 の発光量を  $\beta$ -actin の発光量で標準化した。

#### 5-4-2-4 細胞増殖能の測定 (BrdU assay)

細胞増殖能の測定には Cell Proliferation ELISA, BrdU, chemiluminescence (Roche, Switzerland) を用いた。細胞増殖能の測定 5-3-2-2 ⑦で作成した 96 well ディッシュの培養液を除去し、BrdU labeling reagent : 細胞培養液 (MDA-MB-453: L15、MFM223: MEM)=1:100 で混和した溶液 10  $\mu$ l/well を加えて 37°C 2 時間インキュベートした後、溶液を除去し風乾した。FixDenat 200  $\mu$ l/well を加えて室温で 30 分間インキュベートし、溶液を除去した後、100 倍希釈した POD 標識抗 BrdU 抗体を 100  $\mu$ l/well 加え、室温で 90 分間インキュベートし、溶液を除去後、PBS で 3 回洗浄した。基質を 100  $\mu$ l/well 加え、マイクロプレートリーダーで発光量を測定した。コントロール細胞、p62 siRNA 導入細胞それぞれ 10 well 分についての発光量を比較した。

#### 5-5 統計学的解析

SAS 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いて統計解析を行った。

検討 I では、apocrine と non-apocrine の 2 群間での棄却検定 (Smirnov test) により、外れ値を除外した後、Mann-Whitney U test を用いて検定を行った。検討 II では、 $\chi^2$  検定法で検定を行った。多重共線性を確認するために相互の相関を Spearman の相関係数で確認した後、PGC1 ならびに  $\alpha$ p62 の陰性、陽性を目的変数とし、癌組織型、ER と HER2 の組み合わせを説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った。ロジスティック回帰分析は単変量解析と多変量解析の双方で行い、説明変数のオッズ比とその 95%信頼区間ならびに p 値を算出した。検討 III、IV では、遺伝子発現解析結果と細胞増殖能試験結果は Mann-Whitney U test を用いて検定を行った。p<0.05 を有意差ありとした。

## 第6章 結果

### 6-1 検討 I の結果<sup>41</sup>

2005年から2010年までの、乳癌手術症例

乳腺アポクリン癌手術検体12例、非アポクリン癌手術検体10例を用いて、ミトコンドリア関連分子である、PGC1 $\alpha$ 、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4のmRNA発現量を測定した。アポクリン癌は非アポクリン癌と比して、PGC1 $\alpha$ mRNA発現量が高い傾向を示した(図5a p=0.06)。Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4のmRNA発現量は、アポクリン癌と非アポクリン癌とでは有意差を認めなかった(Nrf1; p=0.75, Nrf2; p=0.15, mtTFA; p=0.11, COX4; p=0.50)。この結果より、ミトコンドリア新生と脂質代謝の両者を調節する分子であるPGC1 $\alpha$ に着目し、検討II、IIIで多数の症例を対象として検討した。また、細胞増殖とオートファジー関連因子であるp62に着目し、併せて検討した。

### 6-2 検討 II の結果<sup>41</sup>

#### 6-2-1 免疫組織化学的手法によるPGC1 $\alpha$ 蛋白結果

乳腺アポクリン癌手術検体47例、非アポクリン癌手術検体62例を用いて、PGC1 $\alpha$ を免疫組織化学的手法で検索した(図6)。PGC1 $\alpha$ は正常乳腺上皮や正常乳腺アポクリン化生細胞では認めなかった(図6 a, b)。

アポクリン癌では21.3% (10/47)の症例、非アポクリン癌では3.2% (2/62)の症例においてPGC1 $\alpha$ の核陽性を認め、アポクリン癌は非アポクリン癌に対して、PGC1 $\alpha$ 陽性率が有意に高かった(表13、p=0.008)。

AR陽性乳癌では16.2% (11/68)の症例、AR陰性乳癌では2.4% (1/41)の症例においてPGC1 $\alpha$ の核陽性を認め、AR陽性乳癌はAR陰性乳癌に対して、PGC1 $\alpha$ の陽性率が高い傾向であった(表13、p=0.057)。

PGC1 $\alpha$ 陽性/陰性を目的変数、癌組織型、ERとHER2の組み合わせを説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った結果、癌組織型で有意差が認められ、アポクリン癌は非アポクリン癌に比して7.507倍PGC1 $\alpha$ が陽性となる割合が高いことが示された(表14)。

#### 6-2-2 免疫組織化学的手法によるp62蛋白結果

乳腺アポクリン癌手術検体47例、非アポクリン癌手術検体62例を用いて、p62の発現を免疫組織化学的手法で検索した。p62は正常乳腺上皮の細胞質に弱陽性を示し、正常乳腺ア

ポクリン化生細胞では、細胞質の弱陽性像と核の中等度陽性像を示した(図7 a, b)。

アポクリン癌では44.7% (21/47)の症例、非アポクリン癌では21.0% (13/62)の症例においてp62の陽性像を認め、アポクリン癌は非アポクリン癌に対して、p62の陽性率が有意に高かった(表15、 $p=0.015$ )。

AR陽性乳癌では39.7% (27/68)の症例、AR陰性乳癌では17.1% (7/41)の症例においてp62の陽性を認め、AR陽性乳癌はAR陰性乳癌に対して、p62の陽性率が有意に高かった(表15、 $p=0.024$ )。

p62陽性/陰性を目的変数、癌組織型、ERとHER2の組み合わせを説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った結果、癌組織型で有意差が認められ、アポクリン癌は非アポクリン癌に比して3.045倍p62が陽性となる割合が高いことが示された(表16)。

### 6-2-3 免疫組織化学的手法によるPGC1 $\alpha$ とp62蛋白発現結果の関連

アポクリン癌において、PGC1 $\alpha$ 陽性群と陰性群との間で、p62の陽性率に有意差は認められなかった(表17、 $p=0.74$ )。非アポクリン癌においても、PGC1 $\alpha$ 陽性群と陰性群との間で、p62の陽性率に有意差は認められなかった(表17、 $p=0.46$ )。

## 6-3 検討IIIの結果<sup>41</sup>

### 6-3-1 PGC1 $\alpha$ mRNAの遺伝子発現定量解析

アポクリン癌群と非アポクリン癌群におけるPGC1 $\alpha$  mRNA発現量の比較では、アポクリン癌群は非アポクリン癌群に比べ、PGC1 $\alpha$  mRNA発現量が有意に高かった(図8a、 $p=0.007$ )。AR陽性群とAR陰性群におけるPGC1 $\alpha$  mRNA発現量の比較では、AR陽性群はAR陰性群に比べ、PGC1 $\alpha$  mRNA発現量が高い傾向を示した(図8d、 $p=0.062$ )。

ER陽性群とER陰性群(図8b)、HER2陽性群とHER2陰性群(図8c)の比較では、PGC1 $\alpha$  mRNA発現量には有意差は認められなかった。

### 6-3-2 p62 mRNAの遺伝子発現定量解析

アポクリン癌群と非アポクリン癌群(図9a)、ER陽性群とER陰性群(図9b)、AR陽性群とAR陰性群(図9d)におけるp62 mRNA発現量には有意差は認められなかった。

HER2陽性群とHER2陰性群におけるp62 mRNA発現量の比較では、HER2陽性群はHER2陰性群に比べ、p62 mRNA発現量が有意に高かった(図9c、 $p=0.026$ )。

#### 6-4 検討 IV の結果

##### 6-4-1 MDA-MB-453、MFM223 の形態学的、免疫組織化学的検討

MDA-MB-453、MFM223 とともに、形態学的には豊かな細胞質、腫大核、腫大核小体を有し、また細胞質に多量の脂肪滴沈着を認め、乳腺アポクリン癌と類似した形態を呈していた(図 10 a, b, 図 11 a, b)。免疫組織化学染色において、MDA-MB-453 は ER-、HER2+、AR+ (図 10 c, d, e)、MFM223 は ER-、HER2-、AR+ (図 11 c, d, e)を示し、一般的な乳腺アポクリン癌のレセプター発現に合致していた。

##### 6-4-2 p62 siRNA 導入による p62 の発現

p62 ノックダウンによる MDA-MB-453、MFM223 の増殖能への影響について検討した。MDA-MB-453、MFM223 への p62 siRNA 導入により、p62 の mRNA、蛋白発現は抑制された (図 12)。BrdU assay において、p62siRNA 導入群はコントロール群と比べ細胞増殖が有意に抑制された (図 13, MDA-MB-453:p<0.01, MFM223:p=0.018)。



## 第7章 考察

本検討により、①乳腺アポクリン癌組織において、PGC1 $\alpha$  蛋白陽性率および mRNA 発現量が非アポクリン癌に比べて有意に高いこと、②乳腺アポクリン癌組織において、p62 は mRNA の高発現を伴わずに、蛋白陽性率が有意に高いこと、③乳腺アポクリン癌培養細胞において、p62 発現抑制が細胞増殖を低下させることを示した。

### ①乳腺アポクリン癌組織における、PGC1 $\alpha$ 蛋白陽性率高値および mRNA 高発現

PGC1 $\alpha$  はミトコンドリア新生と脂質代謝に関わる分子であり、骨格筋、褐色脂肪細胞、肝細胞、心筋など脂肪酸酸化能力の高い組織に発現している<sup>31</sup>。PGC1 $\alpha$  はミトコンドリア新生を促進するが、脂質代謝に関しては、脂肪酸分解能を有すると同時に、脂肪酸合成能も有することが知られている。PGC1 $\alpha$  による脂肪酸分解の原理は、1) PGC1 $\alpha$  が lipoprotein lipase (LPL) や acyl-CoA oxidase (ACO) といった、脂肪酸酸化酵素の遺伝子発現を誘導すること<sup>32</sup>、2) PGC1 $\alpha$  によるミトコンドリア数の増加が、脂肪酸酸化を促進することによる<sup>33</sup>。一方、PGC1 $\alpha$  による脂肪酸合成の原理は、ミトコンドリア数の増加により、脂肪酸合成の原料となるクエン酸産生が亢進し、さらに、クエン酸から脂肪酸への合成に関わる、ATP citrate lyase (ACLY)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FASN) などの酵素群が誘導されることによる<sup>34</sup>。また、PGC1 $\alpha$  を高発現させると、ヒト、マウス骨格筋組織で脂肪滴発現や脂肪滴形成に関わる遺伝子群を誘導するといった、PGC1 $\alpha$  と脂肪滴産生との関連も報告されている<sup>17-20</sup>。癌組織においては、前立腺癌、乳癌、大腸癌での PGC1 $\alpha$  発現亢進が報告されている<sup>22, 23</sup>。乳腺アポクリン癌は細質内に腫大したミトコンドリアや脂肪滴を多数認めることが特徴であるが<sup>5-7</sup> このメカニズムは不明であり、その機序に関する研究報告はない。本研究では、乳腺アポクリン癌組織において、PGC1 $\alpha$  蛋白陽性率および mRNA 発現量が非アポクリン癌に比べて有意に高くなっていることが明らかとなり、乳腺アポクリン癌におけるミトコンドリアや脂肪滴の貯留には、PGC1 $\alpha$  の発現が関与する可能性が示された (図 14)。アポクリン癌における PGC1 $\alpha$  と脂肪滴形成の直接的な関連については、今後の検討課題といえる。これまでに、乳癌組織を用いた PGC1 $\alpha$  mRNA 発現は報告されているが<sup>35</sup>、組織型で分類した上での詳細な比較検討や免疫組織

染色による検討報告はなく、本研究が初めての報告である。

探索的検討において、ミトコンドリアの機能に関わる分子である、Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4 の mRNA 発現をアポクリン癌と非アポクリン癌との間で比較検討したところ、PGC1 $\alpha$ とは異なり、両者の間で発現量に有意差は認められなかった。Nrf1、Nrf2、mtTFA、COX4 は、ミトコンドリアにおけるミトコンドリアの主な機能である、電子伝達系関連分子産生を調節する因子であり、アポクリン癌と非アポクリン癌との間で発現量に有意差は認められなかった結果より、アポクリン癌においては、ミトコンドリア機能の亢進は伴っていない可能性が示唆された。

②乳腺アポクリン癌組織における、mRNA の高発現を伴わない、p62 蛋白陽性率の増加

p62 は細胞内のさまざまな経路で働く多機能なシグナル分子であり、癌細胞の増殖に関与している。p62 の細胞内蓄積は、NF- $\kappa$ B シグナルの恒常的活性化を引き起こし、腫瘍形成の要因となる<sup>36, 37</sup>。また、p62 蛋白質はオートファジーにより選択的に分解されているため、オートファジーの状態を表す指標としても知られている<sup>38</sup>。すなわち、p62 蛋白の細胞内貯留はオートファジー不全を意味する。今回の検討において、アポクリン癌での p62 蛋白陽性率が有意に高かったことより、アポクリン癌の細胞増殖には p62 が関与している可能性が疑われる(図 14)。また、アポクリン癌において、p62 は mRNA の高発現を伴わずに、蛋白陽性率が増加していたことより、アポクリン癌ではオートファジー不全が存在し、その結果 p62 が貯留している可能性がある(図 14)。

アポクリン癌で貯留するミトコンドリアは、腫大し、不完全なクリスタを有する異常なミトコンドリアであることが、電子顕微鏡学的検索で示されている<sup>5, 6</sup>。Jiang らは前立腺癌の細胞で、AR 発現がオートファジーを抑制する事を示した<sup>39</sup>。アポクリン癌はほとんどの症例で AR+を示すことが特徴であり、アポクリン癌におけるオートファジー不全の原因として、AR 発現が関与している可能性がある。しかし、非アポクリン癌においても p62 は 21.0%の陽性率であったことより、LC3-I、LC3-II など<sup>38</sup>、他のオートファジー関連因子を検索し、よりアポクリン癌に特異的な分子の検索が今後の課題と考えられた。

また、アポクリン癌と非アポクリン癌における、PGC1 $\alpha$  と p62 との関連性について

検討した結果、アポクリン癌と非アポクリン癌ともに、PGC1 $\alpha$ 陽性群と陰性群との間には、p62の陽性率に有意差は認められなかった(表17: アポクリン癌 p=0.74、非アポクリン癌 p=0.46)。従って、アポクリン癌におけるPGC1 $\alpha$ 、p62蛋白陽性率の有意差は、それぞれ独立した事象と考えられた。

### ③乳腺アポクリン癌培養細胞における、p62発現抑制がもたらす細胞増殖抑制効果

アポクリン癌細胞の細胞増殖における、p62の役割を検討するために、乳癌培養細胞を用いた実験を行った。siRNAを用いたp62のノックダウンにより、アポクリン癌モデルの乳癌培養細胞(MDA-MB-453、MFM223)における腫瘍増殖抑制効果が示された。最近、腎癌においてp62遺伝子が癌遺伝子である可能性が示されており<sup>40</sup>、p62は治療標的となる可能性がある。本研究では、p62自身のノックダウンを行ったが、②の結果より、p62の貯留はオートファジー不全により引き起こされている可能性があるため、今後は癌培養細胞においてオートファジー不全を改善し、それによるp62発現抑制、細胞増殖抑制を検討する必要があると考える。乳腺アポクリン癌は、ER陰性、AR陽性を示す癌であり、AR阻害剤の選択など、従来の乳癌治療とは異なったアプローチが模索されているが、現状では特異的な補助療法がなく、一般的な化学療法が補助療法として施行されている<sup>9</sup>。今回の検討により、乳腺アポクリン癌では細胞増殖関連因子であるp62が新たな治療ターゲットとなる可能性が見いだされた。さらに、p62はオートファジー不全の状態を間接的に反映しているため、アポクリン癌においてオートファジー不全を改善できれば、細胞増殖を抑制できる可能性がある。今回の検討では、乳腺アポクリン癌におけるオートファジー不全の存在を直接的に明らかにしていない。今後、LC3-I、LC3-II等の、多数存在するオートファジーマーカーを検索することにより、乳腺アポクリン癌におけるオートファジーの状態を明らかにすることが、重要な検討課題であるといえる。

本研究では、代謝のなかでも脂質代謝とオートファジーに着目して検討を行った。アポクリン癌における脂質代謝亢進とオートファジー不全が生じている可能性、さらにオートファジー不全による細胞増殖関連因子貯留の可能性が導きだされた。よって、

アポクリン癌における代謝異常は、形態学的特徴のみならず、細胞増殖に関連するという可能性が考えられた。

## 第8章 結語

乳腺アポクリン癌手術切除検体における PGC1 $\alpha$  と p62 の蛋白と mRNA 定量解析、乳腺アポクリン癌培養細胞における、p62 発現抑制の細胞増殖を抑制効果について検討した。乳腺アポクリン癌細胞における PGC1 $\alpha$  の発現亢進が明らかとなった。また、p62 の細胞内貯留の結果より、乳腺アポクリン癌細胞ではオートファジー不全が存在するために、特殊な細胞形態を有する、という仮説が導かれた。さらに、p62 が新たな乳癌治療標的となる可能性が示された。

## 第9章 謝辞

本研究に関して、研究および学位論文のご指導を頂きました日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野、増田しのぶ教授に深謝いたします。同分野の中西陽子先生、江角眞理子先生、山口裕美さん、廣谷ゆかりさん、笈川文子さん、伊藤あいさんには本研究の実験に対して直接のご指導、ご協力を頂き御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、ご協力頂きました病理学分野の医局の皆様に深謝いたします。

第10章 図表

表1 cDNA合成時のゲノムDNA除去反応液容量

成分	容量 / 1反応
gDNA wipeout buffer (7x)	1 $\mu$ l
テンプレートRNA	5 $\mu$ l
RNaseフリー水	1 $\mu$ l
total	7 $\mu$ l

表2 逆転写反応液容量

成分	容量 / 1反応
逆転写反応マスターミックス	
Quantiscript reverse transcriptase	0.5 $\mu$ l
Quantiscript RT buffer, 5x	2 $\mu$ l
RT primer mix	0.5 $\mu$ l
テンプレートRNA	
ゲノムDNA除去反応液全量	7 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

表3 real-time RT-PCR用プライマー配列

Target	forward primer	reverse primer	Annealing temperature (°C)	product size (bp)
PGC1 $\alpha$	5' -ccgaaattctcccttgatgtg-3'	5' -tgcgatattcttccctctcag-3'	60	116
Nrf1	5' -ggagtgatgtccgcacaga-3'	5' -tgctgatcttcaaaggcataca-3'	60	127
Nrf2	5' -ttgagcaagtttggaggag-3'	5' -gacttgaacctggtagtctca-3'	60	96
mtTFA	5' -taccgagtggttttcatctg-3'	5' -acgctggcaattcttctaa-3'	60	149
COX4	5' -ctagttggcaagcgagcaa-3'	5' -cagacagtgcttgacatgg-3'	60	145
GAPDH	5' -ggaaggtgaaggtcggagtca-3'	5' -gtcattgatggcaacaatccact-3'	60	100

表4 real-time RT-PCR反応マスターミックス

成分	容量 / 1反応
Power SYBER Green Master Mix	8.5 $\mu$ l
forward primer (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
reverse primer (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
精製水	10.0 $\mu$ l
template cDNA	1 $\mu$ l
total	20 $\mu$ l

表5 検討II 対象症例

	アポクリン癌 n = 47	非アポクリン癌 n = 62	$\chi^2$ test p<0.01**
Subtype			
ER+/HER2-	6 (12.7%)	28 (45.2%)	
ER+/HER2+	1 (2.1%)	2 (3.2%)	
ER-/HER2+	4 (8.5%)	7 (11.3%)	
ER-/HER2-	36 (76.7%)	25 (40.3%)	
Tumor size (cm)			p=0.832
t≤2	28 (59.5%)	38 (61.3%)	
2<t≤5	17 (36.2%)	20 (32.3%)	
t>5	2 (4.3%)	4 (6.4%)	
L/N status			p=0.081
Negative	34 (72.3%)	35 (56.5%)	
Positive	9 (19.2%)	24 (38.7%)	
Not available	4 (8.5%)	3 (4.8%)	
Stage			p=0.773
I	21 (44.7%)	26 (41.9%)	
II	20 (42.5%)	28 (45.2%)	
III	2 (4.3%)	6 (9.7%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	
Not available	4 (8.5%)	2 (3.2%)	

\*\*p<0.01

表6 DAB 単染色使用一次抗体

Antigen	Clone	Animal	Dilution	Antigen retrieval
PGC1 $\alpha$	polyclonal	Rabbit	x100	AC (pH 9.0)
SQSTM1/p62	2C11	Mouse	x2000	AC (CB)
ER	1D5	Mouse	x400	AC (pH 9.0)
HER2	polyclonal	Rabbit	RTU	Boil (CB)
AR	AR441	Mouse	x100	Boil (pH 9.0)
GCDFP15	23A3	Mouse	x400	AC (CB)

AC: autoclave, AR: androgen receptor, CB: citrate buffer (pH 6.0), ER: estrogen receptor, GCDFP15: gross cystic disease fluid protein-15, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, PGC1  $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$ , RTU: ready to use



表7 cDNA 合成時のゲノム DNA 除去反応液容量

成分	容量 / 1 反応
gDNA wipeout buffer (7x)	1 $\mu$ l
テンプレート RNA	5 $\mu$ l
RNase フリー水	1 $\mu$ l
total	7 $\mu$ l

表8 逆転写反応液容量

成分	容量 / 1 反応
逆転写反応マスターミックス	
Quantiscript reverse transcriptase	0.5 $\mu$ l
Quantiscript RT buffer, 5x	2 $\mu$ l
RT primer mix	0.5 $\mu$ l
テンプレート RNA	
ゲノム DNA 除去反応液全量	7 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

表9 pre-amplification 反応マスターミックス

成分	容量 / 1 反応
AmpliTaq 360 Master Mix	10 $\mu$ l
GC enhancer	0.4 $\mu$ l
forward primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
reverse primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
精製水	8.2 $\mu$ l
テンプレート cDNA	1.0 $\mu$ l
total	20 $\mu$ l

表10 pre-amplification に用いた first primer 配列

Target	forward primer	reverse primer	Annealing temperature (°C)	product size (bp)
PGC1 $\alpha$	5' -ccgaattctcccttgatgtg-3'	5' -tgcgatattcttccctcttcag-3'	60	116
p62	5' -acgttggggagagtgtgg-3'	5' -ggtcaggcggcttctttt-3'	60	91
$\beta$ -Actin	5' -cgtcttccctccatcg-3'	5' -gatgggtacttcagggtga-3'	60	127

表11 real-time RT-PCR 反応マスターミックス

成分	容量 / 1 反応
TaqMan Fast Advanced Master Mix	5 $\mu$ l
TaqMan primer/probe	0.5 $\mu$ l
精製水	3.5 $\mu$ l
pre-amplification 反応産物	1 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

表 12 real-time RT-PCR 反应用マスターミックス

成分	容量
TaqMan Fast Advanced Master Mix	5 $\mu$ l / 1 sample
TaqMan primer/probe	0.5 $\mu$ l
精製水	3.5 $\mu$ l
template cDNA	1 $\mu$ l
トータル容量	10 $\mu$ l

表 13 PGC1 $\alpha$  免疫組織化学染色の $\chi^2$  検定解析結果<sup>41</sup>

		n=	PGC1 $\alpha$		$\chi^2$ test
			positive	negative	
癌組織型	アポクリン癌	47	10 (21.3%)	37 (78.7%)	p=0.008**
	非アポクリン癌	62	2 (3.2%)	60 (96.8%)	
ER	positive	37	2 (5.4%)	35 (94.6%)	p=0.309
	negative	72	10 (13.9%)	62 (86.1%)	
HER2	positive	14	1 (7.1%)	13 (92.9%)	p=0.970
	negative	95	11 (11.6%)	84 (88.4%)	
ER&HER2	ER+/HER2-	34	2 (5.9%)	32 (94.1%)	p=0.532
	ER+/HER2+	3	0 (0%)	3 (100%)	
	ER-/HER2+	11	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
	ER-/HER2-	61	9 (14.8%)	52 (85.2%)	
AR	positive	68	11 (16.2%)	57 (83.8%)	p=0.057
	negative	41	1 (2.4%)	40 (97.6%)	

ER: estrogen receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2,  
PGC1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha

\*\* p<0.01

表 14 PGC1 $\alpha$  免疫組織化学染色のロジスティック回帰分析結果<sup>41</sup>

	PGC1 $\alpha$			
	univariate	p 値	multivariate	p 値
アポクリン癌 vs. 非アポクリン癌	8.108 (1.683 - 39.069)	0.009**	7.507 (1.413 - 39.880)	0.018*
ER/HER2 +/- vs. -/-	2.769 (0.562 - 13.635)	0.210	1.224 (0.213 - 7.043)	0.821
ER/HER2 ++ vs. -/-	>999.9 (<0.001 - >999.9)	0.977	>999.9 (<0.001 - >999.9)	0.985
ER/HER2 -/+ vs. -/-	1.731 (0.197 - 15.219)	0.621	1.192 (0.123 - 11.532)	0.880

ER: estrogen receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2

PGC1 $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha

\* p<0.05, \*\*p<0.01

表 15 p62 免疫組織化学染色の  $\chi^2$  検定解析結果<sup>41</sup>

		n=	p62		$\chi^2$ test
			positive	negative	
癌組織型	アポクリン癌	47	21 (44.7%)	26 (55.3%)	p=0.015*
	非アポクリン癌	62	13 (21.0%)	49 (79.0%)	
ER	positive	37	9 (24.3%)	28 (75.7%)	p=0.373
	negative	72	25 (34.7%)	47 (65.3%)	
HER2	positive	14	3 (21.4%)	11 (78.6%)	p=0.592
	negative	95	31 (32.6%)	64 (67.4%)	
ER&HER2	ER+/HER2-	34	9 (26.5%)	25 (73.5%)	p=0.481
	ER+/HER2+	3	0 (0%)	3 (100%)	
	ER-/HER2+	11	3 (27.3%)	8 (72.7%)	
	ER-/HER2-	61	22 (36.1%)	39 (63.9%)	
AR	positive	68	27 (39.7%)	41 (60.3%)	p=0.024*
	negative	41	7 (17.1%)	34 (82.9%)	

AR: androgen receptor, ER: estrogen receptor,

HER2: human epidermal growth factor receptor 2, \* p<0.05

表 16 p62 免疫組織化学染色のロジスティック回帰分析結果<sup>41</sup>

	p62			
	univariate	p 値	multivariate	p 値
アポクリン癌 vs. 非アポクリン癌	3.044 (1.315 - 7.048)	0.009**	3.045 (1.214 - 7.641)	0.018*
ER/HER2 +/- vs. -/-	1.567 (0.622 - 3.947)	0.341	0.979 (0.349 - 2.746)	0.968
ER/HER2 ++ vs. -/-	>999.9 (<0.001 - >999.9)	0.978	>999.9 (<0.001 - >999.9)	0.978
ER/HER2 -/+ vs. -/-	1.504 (0.361 - 6.261)	0.575	1.188 (0.270 - 5.235)	0.820

AR: androgen receptor, ER: estrogen receptor,

HER2: human epidermal growth factor receptor 2, \* p<0.05 \*\*p<0.01

表 17 アポクリン癌、非アポクリン癌における、PGC1 $\alpha$ 、p62 免疫組織化学染色  
発現の $\chi^2$  検定解析結果

		n=	p62		$\chi^2$ test
			positive	negative	
アポクリン癌	PGC1 $\alpha$ positive	10	4 (40%)	6 (60%)	p=0.74
	PGC1 $\alpha$ negative	37	17 (45.9%)	20 (54.1%)	
非アポクリン癌	PGC1 $\alpha$ positive	4	0 (0%)	2 (100%)	p=0.46
	PGC1 $\alpha$ negative	60	13 (21.7%)	47 (78.3%)	

PGC1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha

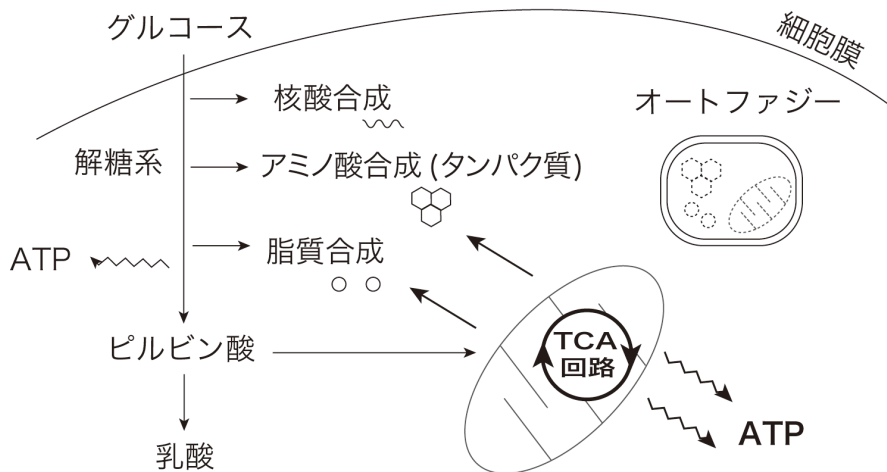


図 1a 正常細胞の代謝様式

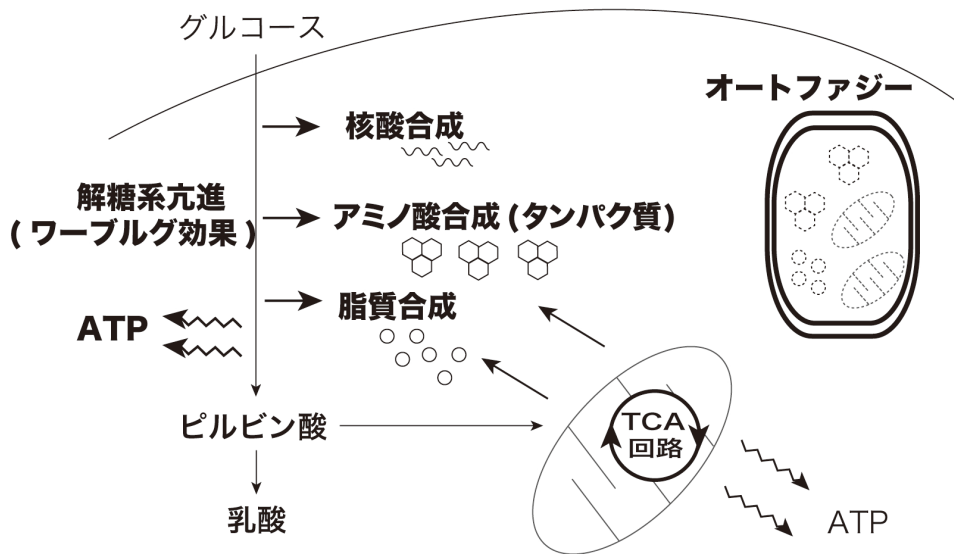
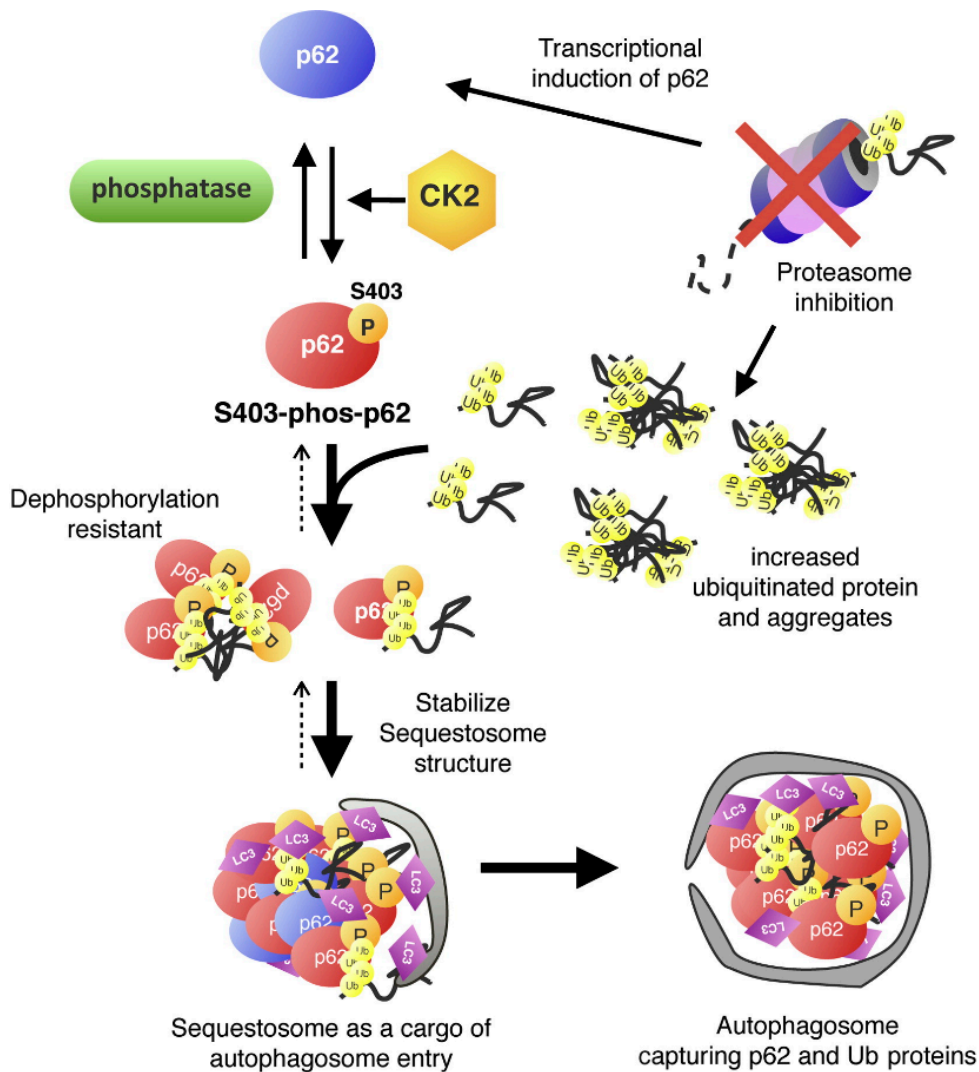


図 1b 癌細胞の代謝様式

図 1a 正常細胞の代謝。グルコースが解糖系で異化され、ミトコンドリア内の TCA 回路でエネルギー分子である ATP が産生される。解糖系の副産物として核酸・アミノ酸・脂質が、TCA 回路の副産物としてアミノ酸・脂質が合成される<sup>11</sup>。余剰副産物は、オートファジー（自己物質分解・再利用機構）で調整される<sup>2</sup>。

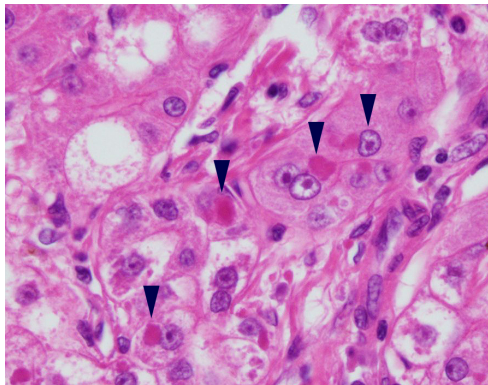
図 1b 一般的な癌細胞の代謝。解糖系の亢進（ワーブルグ効果）を認め、これにより核酸・アミノ酸・脂質が多量に合成され、癌細胞自身の複製、増殖に使用される<sup>12</sup>。オートファジーは亢進している<sup>3</sup>。



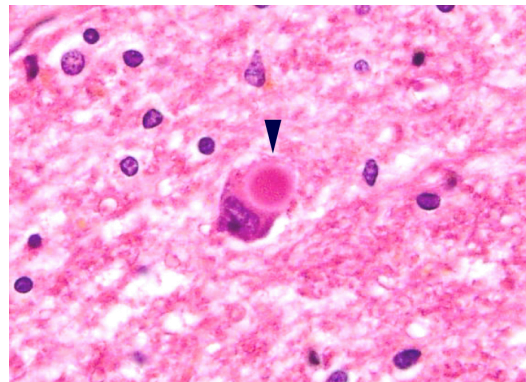
Matsumoto G et al, Mol Cell. 2011 21;44:279-289.

図2 オートファジーにおける p62 の役割

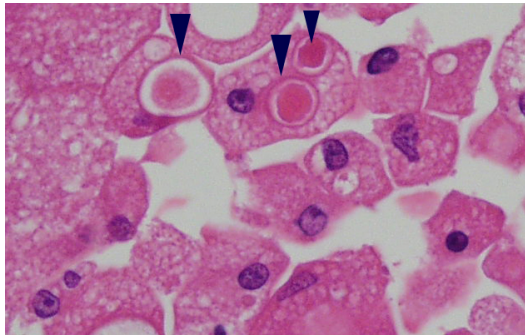
変性蛋白質は、通常はポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される。しかし、変性蛋白質が凝集するとプロテアソームで分解不能となってしまう。このユビキチン化蛋白質はオートファジーで分解されている。このユビキチン化蛋白質をオートファジーにつなぐ分子がアダプター蛋白質の p62 である。リン酸化型 p62 はユビキチン鎖と強く結合し、ユビキチン化蛋白質をオートファゴソームに認識させ結合させる。オートファジー不全状態では、p62 は分解されずに細胞内に貯留する。



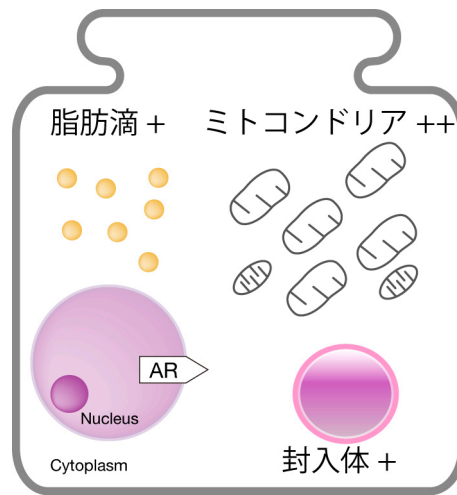
a) 肝細胞癌組織像 (HEx400)



b) Parkinson 病脳神経細胞組織像 (HEx400)



c) 乳腺アポクリン癌組織像 (HEx400)



d) 乳腺アポクリン癌細胞模式図

図3 細胞質内封入体に着目した、様々な細胞像

肝細胞癌には Mallory body と呼ばれる細胞質内封入体 (a)、Parkinson 病脳神経細胞には細胞質内封入体が観察される (b)。この封入体は変性蛋白質と p62 蛋白質の凝集物である。乳腺アポクリン癌は、好酸性で豊かな細胞質を有し、その中に細胞質内封入体や脂質と考えられる空胞が観察される (c, d)。封入体を矢頭で示す。(AR:androgen receptor)



PGC1  $\alpha$

1921 tattactatg agtcaagcca ctacagacac cgcacgcacc gaaattctcc ctgtatgtg

1981 agatcacggt caagatgcc ctacagccgt cggcccagg atgacagcta cgaggaatat

2041 cagcagaga ggctgaagag ggaagaatat cgcagagagt atgagaagcg agagtctgag

p62

781 cggaggatcc gagtgtgaat ttctga aga acgttgggga gagtgtggca gctgccctta

841 gccctctggg cattgaagtt gatatcgatg tggagcacgg agggaaaaga agccgcctga

901 ccccgtctc tccagagagt tccagcacag agagaagag cagctcacag ccaagcagct

$\beta$ -actin

121 ggctcggca tgtgaagcc cggcttcgag ggcgacgatg cccccgggc cgtttcccc

181 tccatcgtgg ggcgccccag gcaccagggc gtgatggtgg gcatgggtca gaaggattcc

241 tatgtggcgc acgaggccca gagcaagaga ggcacacctca ccctgaagta ccccatcgag

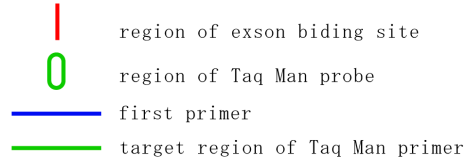
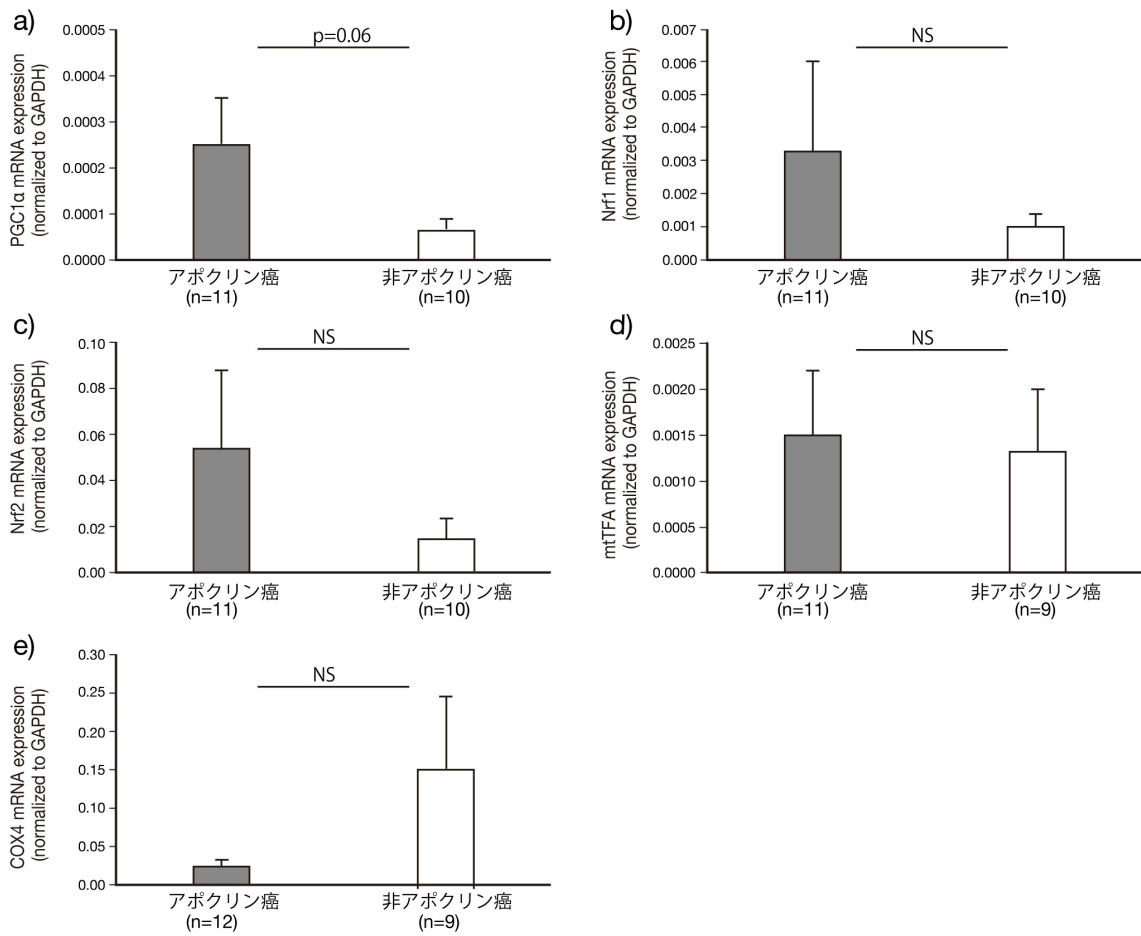


図4 RT-PCR 増幅部の PGC1  $\alpha$ 、p62、 $\beta$ -actin mRNA 配列

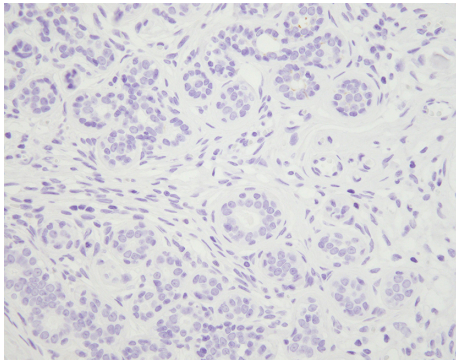
Second primer (TaqMan probe) の増幅領域を内包するように first primer を設計した



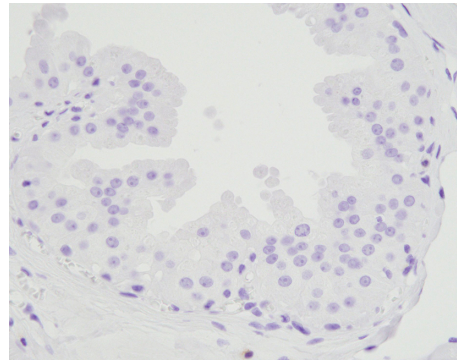
	アポクリン癌		非アポクリン癌		Mann-Whitney
	mRNA 発現量 平均値 (target/GAPDH)	標準誤差	mRNA 発現量 平均値 (target/GAPDH)	標準誤差	U-test p 値
PGC1 α	0.00025	0.00009	0.00006	0.00002	0.06
Nrf1	0.0034	0.0027	0.0010	0.0005	0.75
Nrf2	0.0542	0.0343	0.0139	0.0066	0.15
mtTFA	0.0015	0.0008	0.0013	0.0008	0.11
Cox4	0.0241	0.0086	0.1536	0.0952	0.50

図5 ミトコンドリア関連分子、脂質代謝関連分子の mRNA 発現量比較<sup>41</sup>

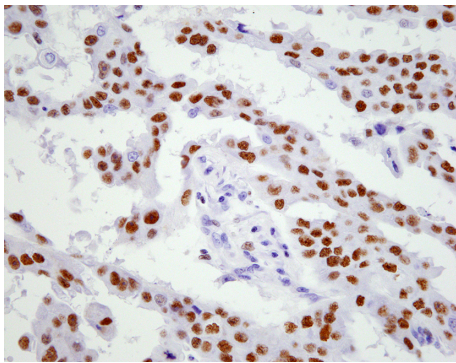
NS: not significant



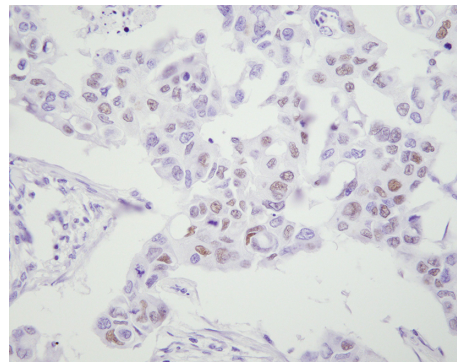
a) 正常乳腺 (x400)



b) 良性乳腺アポクリン化生 (x400)



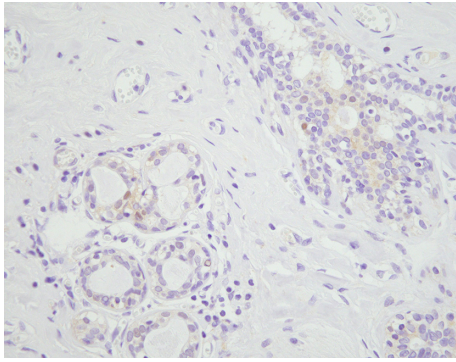
c) アポクリン癌 (x400)



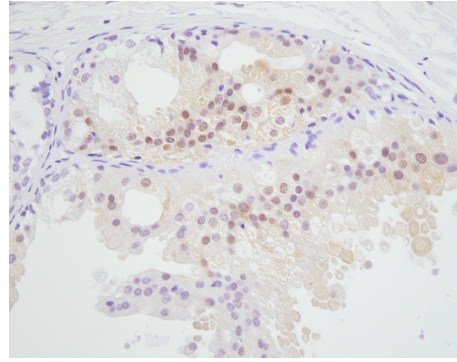
d) 非アポクリン癌 (x400)

図6 PGC1 $\alpha$ 免疫組織化学染色像<sup>41</sup>

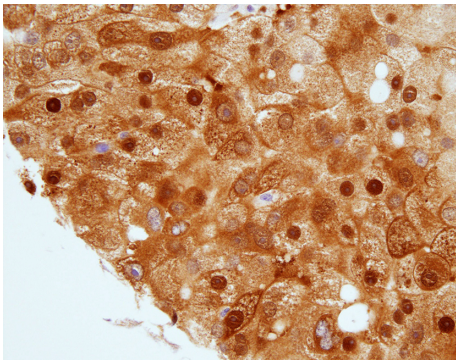
PGC1 $\alpha$ は正常乳腺上皮や正常乳腺アポクリン化生細胞では陰性像を示す(a, b)。アポクリン癌におけるPGC1 $\alpha$ 核陽性像(c)と非アポクリン癌におけるPGC1 $\alpha$ 核陽性像(d)を示す。



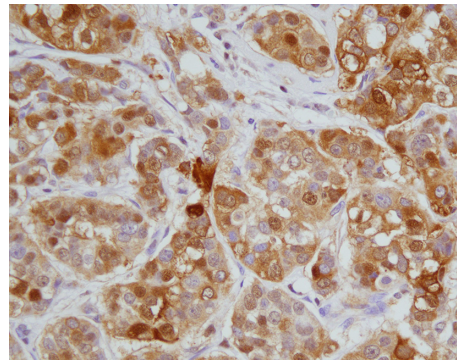
a) 正常乳腺 (x400)



b) 良性乳腺アポクリン化生 (x400)



c) アポクリン癌 (x400)

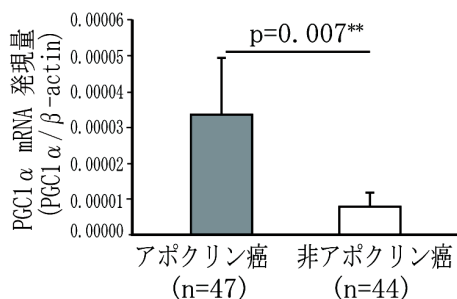


d) 非アポクリン癌 (x400)

図7 p62 免疫組織化学染色像<sup>41</sup>

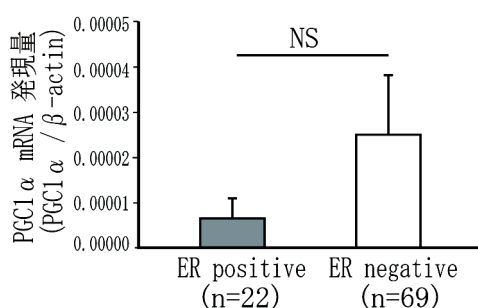
p62 は正常乳腺上皮の細胞質に弱陽性を示し、正常乳腺アポクリン化生細胞では、細胞質の弱陽性像と核の中等度陽性像を示す(a, b)。アポクリン癌と非アポクリン癌における p62 陽性像を c), d) に示す。

a) 組織型別比較



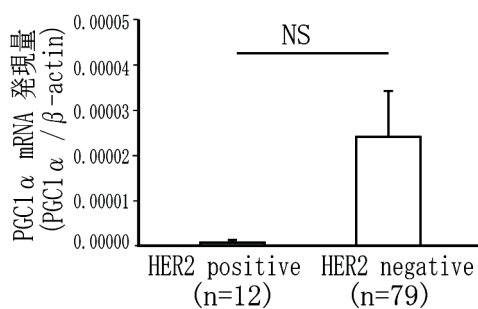
アポクリン癌	非アポクリン癌	Mann-Whitney U test
mean±SD	mean±SD	
0.000034	0.000007	p=0.007*
±0.000116	±0.000046	

b) ER 発現別の比較



ER positive	ER negative	Mann-Whitney U test
mean±SD	mean±SD	
0.000006	0.000026	p=0.618
±0.000024	±0.000102	

c) HER2 発現別の比較



HER2 positive	HER2 negative	Mann-Whitney U test
mean±SD	mean±SD	
0.000004	0.000024	p=0.649
±0.000002	±0.000096	

図8 PGC1α mRNA 発現量結果<sup>41</sup>

ER: estrogen receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2

PGC1α peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha

NS: not significant, \*\*p<0.01

d) AR 発現別の比較

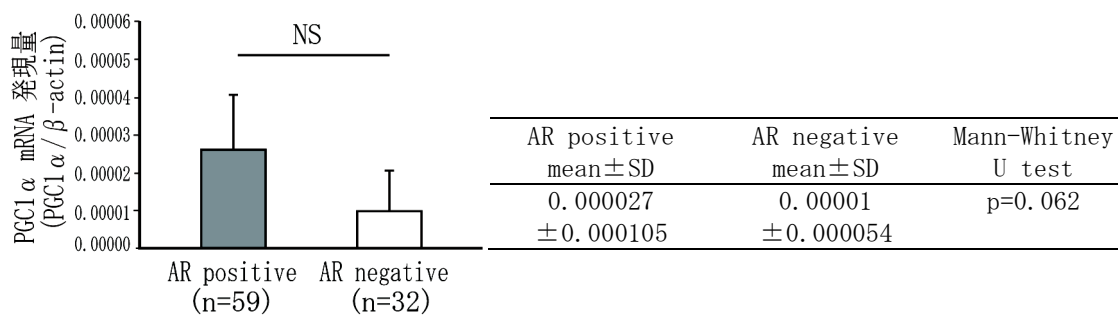
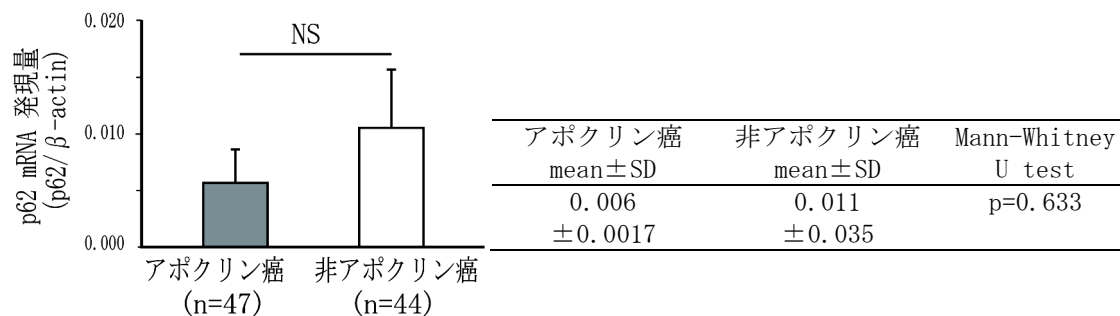


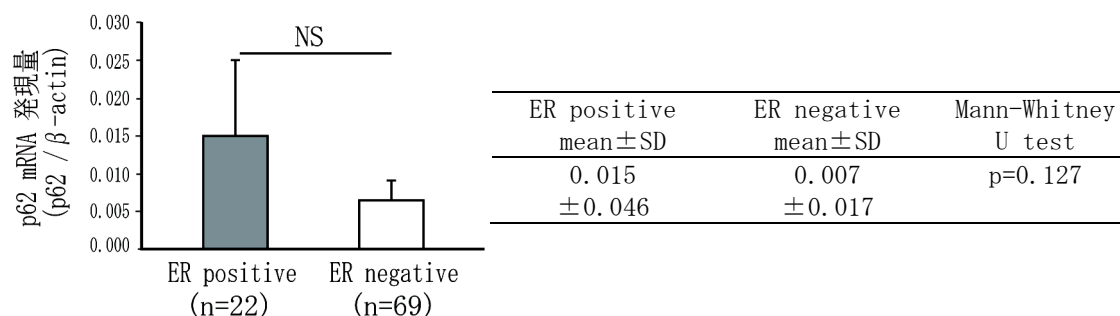
図8 PGC1α mRNA 発現量結果(続き)

AR: androgen receptor, NS: not significant

a) 組織型別比較<sup>41</sup>



b) ER 発現別の比較



c) HER2 発現別の比較

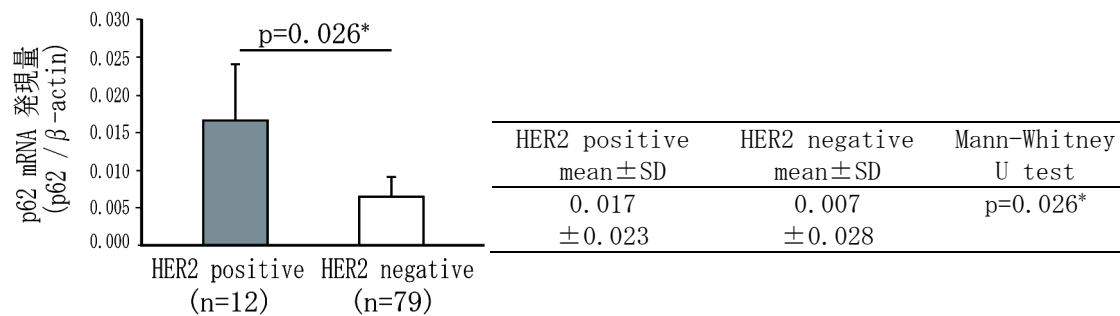


図9 p62 mRNA 発現量結果<sup>41</sup>

ER: estrogen receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2

NS: not significant, \* p<0.05

d) AR 発現別の比較

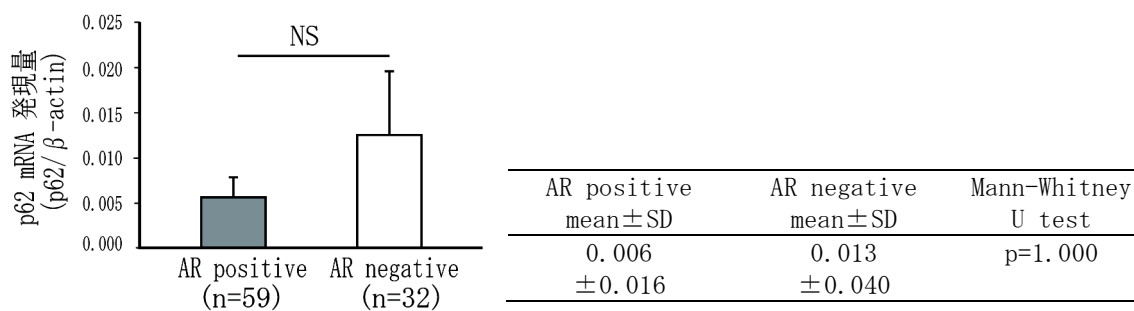


図9 p62 mRNA 発現量結果(続き)

AR: androgen receptor, NS: not significant



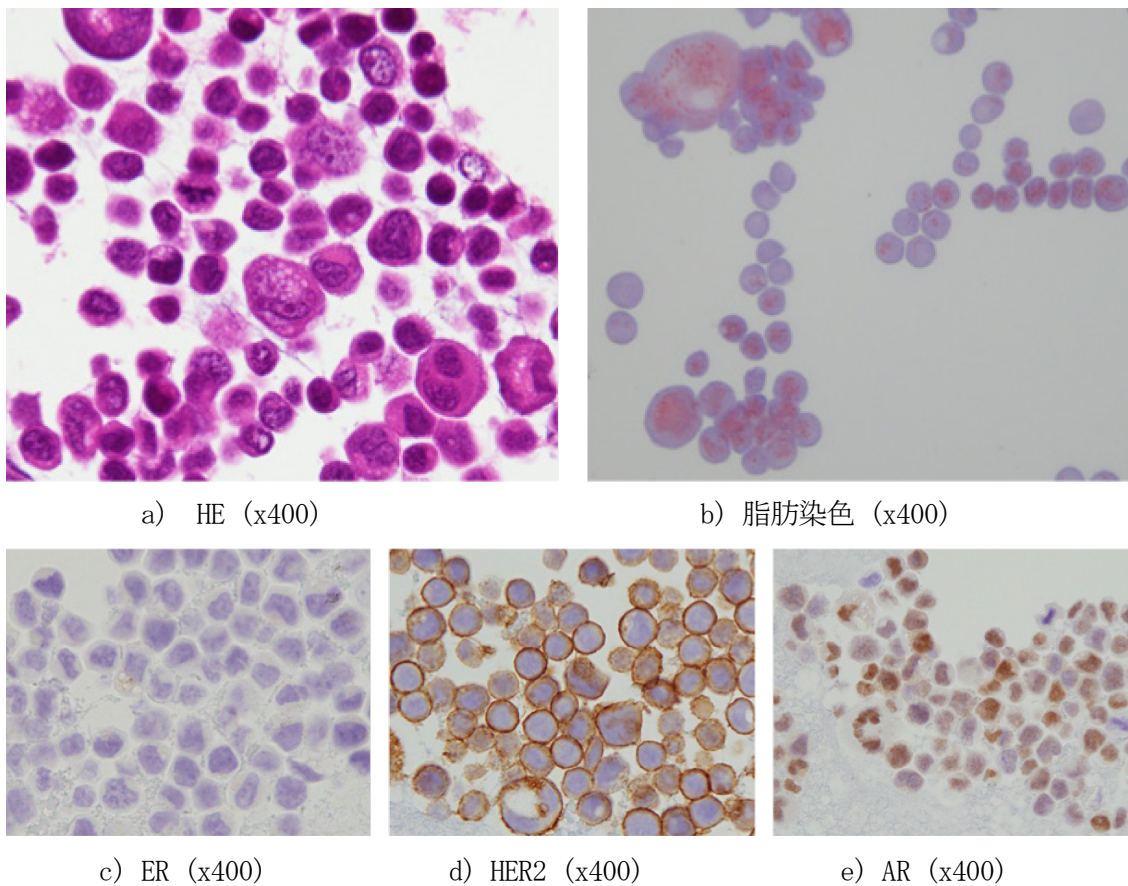


図 10 乳腺アポクリン癌細胞モデル MDA-MB-453 の染色結果

MDA-MB-453 細胞は、豊かな細胞質、腫大核、腫大核小体を有し、また細胞質に多量の脂肪滴沈着を認め、乳腺アポクリン癌と類似した形態を呈している (a, b)。免疫組織化学染色において、ER<sup>-</sup>、HER2<sup>+</sup>、AR<sup>+</sup>を示し、一般的な乳腺アポクリン癌のレセプター発現に合致している (c, d, e)。

AR: androgen receptor, ER: estrogen receptor,  
HER2: human epidermal growth factor receptor 2

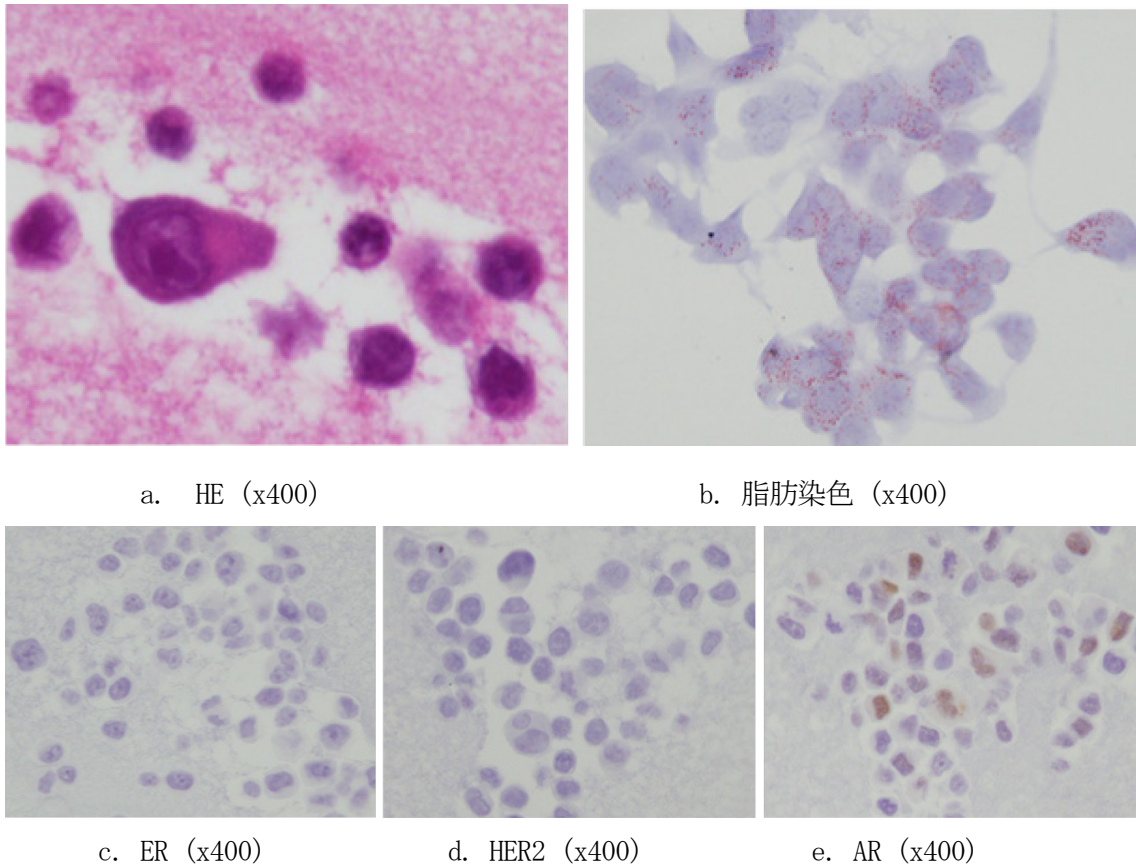
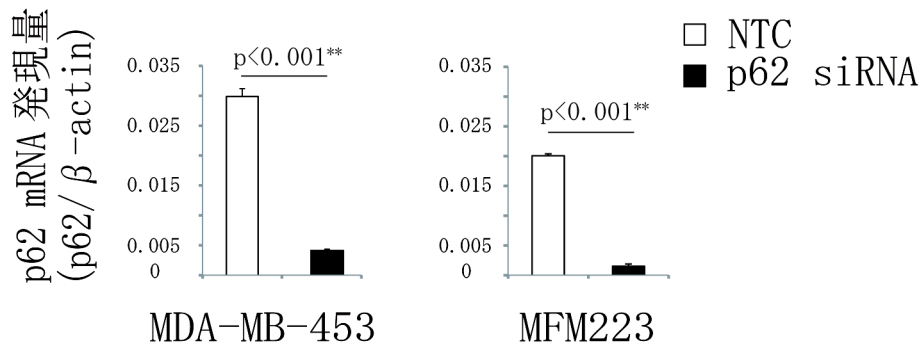


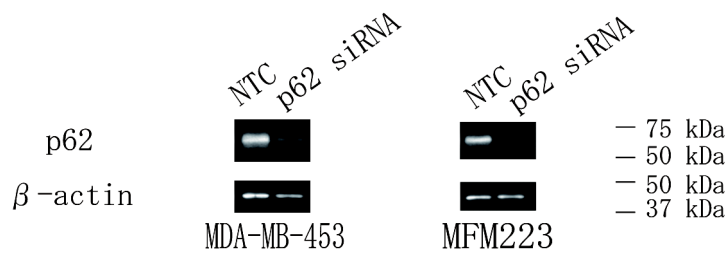
図 11 乳腺アポクリン癌細胞モデル MFM-223 の染色結果

MFM-223 は、豊かな細胞質、腫大核、腫大核小体を有し、また細胞質に多量の脂肪滴沈着を認め、乳腺アポクリン癌と類似した形態を呈している (a, b)。免疫組織化学染色において、ER-、HER2-、AR+を示し、一般的な乳腺アポクリン癌のレセプター発現に合致している (c, d, e)。

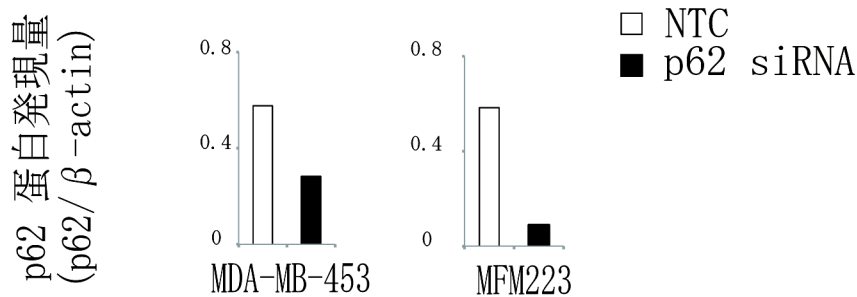
AR: androgen receptor, ER: estrogen receptor,  
HER2: human epidermal growth factor receptor 2



a) p62 siRNA 導入後の p62 mRNA 発現量測定結果



b) p62 siRNA 導入後の western blotting 結果



c) MDA-MB-453 および MFM223 細胞に対する p62 siRNA 導入後の p62 蛋白発現量測定結果

図 12 p62 siRNA 導入による p62 ノックダウン

MDA-MB-453、MFM223 細胞への siRNA 導入により、p62 mRNA (a) および蛋白発現 (b, c) はともに抑制される。Mann-Whitney U-test, \*\*p<0.01

NTC: Non-Targeting, NS: not significant

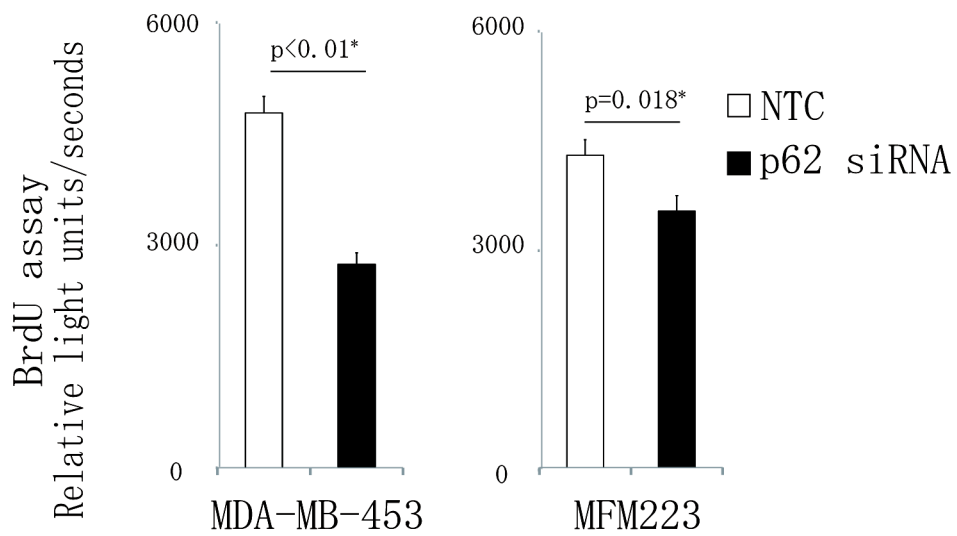
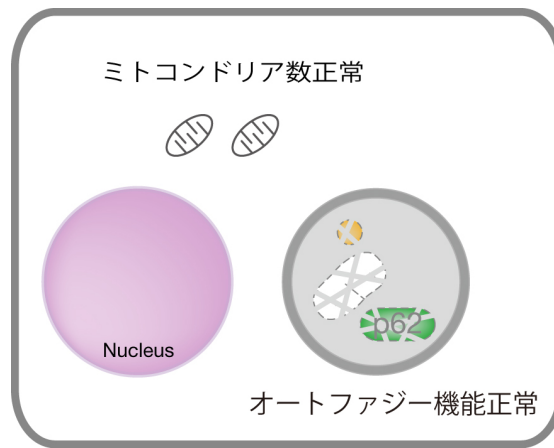


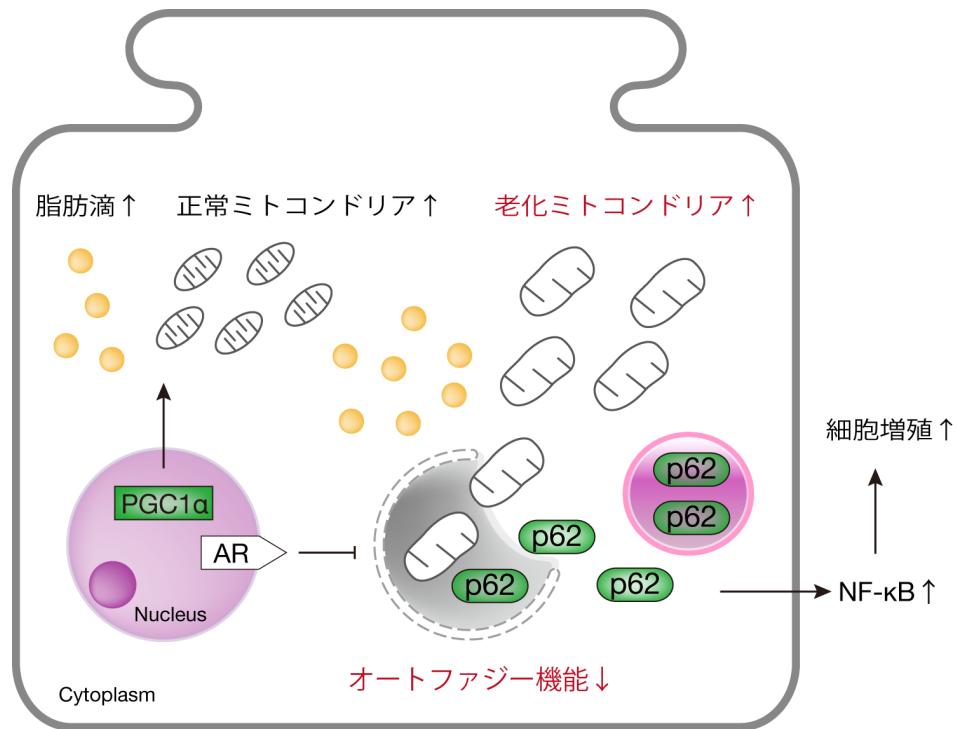
図 13 siRNA ノックダウンが MDA-MB-453、MFM223 細胞の増殖活性に与える影響 (BrdU assay)

MDA-MB-453、MFM223 細胞における p62 ノックダウンにより、p62 siRNA 群はコントロール群に比べ細胞増殖が有意に抑制される。Mann-Whitney U-test, \*  $p < 0.05$

NTC: Non-Targeting, NS: not significant



a. 非アポクリン癌



b. アポクリン癌

図 14 乳腺アポクリン癌における仮説

アポクリン癌においては、PGC1 $\alpha$  mRNA 遺伝子発現増加による PGC1 $\alpha$  蛋白の増加により、脂肪滴・ミトコンドリア産生の増加と、オートファジー不全による脂肪滴・老化ミトコンドリア・p62 貯留が生じている可能性がある。また、アポクリン癌の細胞増殖には p62 が関連している可能性がある。

## 第 11 章 参考文献

- 1 DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008; **7**: 11-20.
- 2 Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; **147**: 728-41.
- 3 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; **324**: 1029-33.
- 4 Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007; **131**: 1149-63.
- 5 Eusebi V, Millis RR, Cattani MG, et al. Apocrine carcinoma of the breast. A morphologic and immunocytochemical study. *The American journal of pathology*. 1986; **123**: 532-41.
- 6 Roddy HJ, Silverberg SG. Ultrastructural analysis of apocrine carcinoma of the human breast. *Ultrastructural pathology*. 1980; **1**: 385-93.
- 7 Moritani S, Ichihara S, Hasegawa M, et al. Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2011; **35**: 861-7.
- 8 Lakhani SR, I.O E, Schnitt SJ, et al. *WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth edn*: World Health Organization 2012.
- 9 Vranic S, Schmitt F, Sapino A, et al. Apocrine carcinoma of the breast: a comprehensive review. *Histology and histopathology*. 2013; **28**: 1393-409.
- 10 Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005; **24**: 4660-71.
- 11 Alberts B, Wilson JH, Hunt T. *Molecular biology of the cell*. 5th edn. New York: Garland Science 2008.
- 12 Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*. 1979;

254: 2669-76.

- 13 Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007; **7**: 961-7.
- 14 Furberg AS, Veierod MB, Wilsgaard T, et al. Serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile, and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; **96**: 1152-60.
- 15 Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004; **89**: 1102-7.
- 16 Sulkowska M, Golaszewska J, Wincewicz A, et al. Leptin--from regulation of fat metabolism to stimulation of breast cancer growth. *Pathology oncology research : POR*. 2006; **12**: 69-72.
- 17 Koves TR, Sparks LM, Kovalik JP, et al. PPARgamma coactivator-1alpha contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans. *Journal of lipid research*. 2013; **54**: 522-34.
- 18 Summermatter S, Baum O, Santos G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2010; **285**: 32793-800.
- 19 Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, et al. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *The Journal of biological chemistry*. 2007; **282**: 36642-51.
- 20 Mormeneo E, Jimenez-Mallebrera C, Palomer X, et al. PGC-1alpha induces mitochondrial and myokine transcriptional programs and lipid droplet and glycogen accumulation in cultured human skeletal muscle cells. *PloS one*. 2012; **7**: e29985.
- 21 Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Molecular endocrinology*. 2010; **24**: 114-27.
- 22 Girnun GD. The diverse role of the PPARgamma coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012;

**23:** 381-8.

23 Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development*. 2004; **18**: 357-68.

24 Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development*. 2011; **25**: 795-800.

25 Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of cell biology*. 2011; **193**: 275-84.

26 Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer cell*. 2012; **22**: 66-79.

27 Allred DC, Harvey JM, Berardo M, et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998; **11**: 155-68.

28 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; **25**: 118-45.

29 Doane AS, Danso M, Lal P, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*. 2006; **25**: 3994-4008.

30 Guedj M, Marisa L, de Reynies A, et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*. 2012; **31**: 1196-206.

31 Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999; **98**: 115-24.

32 Palomer X, Salvado L, Barroso E, et al. An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *International journal of cardiology*. 2013; **168**: 3160-72.

33 Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circulation research*. 2010; **107**: 825-38.



- 34 Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, et al. PGC1alpha promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. *Cancer research*. 2011; **71**: 6888-98.
- 35 Ertel A, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, et al. Is cancer a metabolic rebellion against host aging? In the quest for immortality, tumor cells try to save themselves by boosting mitochondrial metabolism. *Cell cycle*. 2012; **11**: 253-63.
- 36 Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell*. 2008; **13**: 343-54.
- 37 Ling J, Kang Y, Zhao R, et al. KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*. 2012; **21**: 105-20.
- 38 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010; **140**: 313-26.
- 39 Jiang Q, Yeh S, Wang X, et al. Targeting androgen receptor leads to suppression of prostate cancer via induction of autophagy. *The Journal of urology*. 2012; **188**: 1361-8.
- 40 Li L, Shen C, Nakamura E, et al. SQSTM1 is a pathogenic target of 5q copy number gains in kidney cancer. *Cancer cell*. 2013; **24**: 738-50.
- 41 Fuchinoue F, Hirotsu Y, et al. Overexpression of PGC1 $\alpha$  and accumulation of p62 in apocrine carcinoma of the breast. *Pathology International*. 2015; **65**: 19-26.

## 第12章 研究業績目録

### 溯之上 史

1	発表	①一般発表	13
		②特別発表	0
2	論文	①原著論文	5 (単 0/ 共 5)
		②症例報告	7 (単 0/ 共 7)
		③総説	1
3	著書		0

以上

## 1 発表

### ① 一般発表

1. 渕之上 史, 阪本 健太郎, 櫻井 麻美子, 久野 宗一郎, 永井 宣久, 宮川 康司, 高木 健次郎, 正岡 直樹, 栃木 明人, 山本 樹生: Eisenmenger 症候群合併妊娠の 1 例, 第 101 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会, 東京, 2001 年 5 月
2. 渕之上 史, 小林 美智代, 内田 士朗, 砂川 恵伸, 本間 琢, 根本 則: Pierre Robin Syndrome (Sequence) の 2 剖検例の検討, 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月
3. 渕之上 史, 林 紀乃, 本間 琢, 大荷 澄江, 生沼 利倫, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 非血縁者間造血幹細胞移植後に突然の心停止で死亡した Hunter 病の二例, 第 96 回日本病理学会総会, 大阪, 2007 年 3 月
4. 渕之上 史, 中西 陽子, 尾花 ゆかり, 村上 絵里子, 前田 哲代, 渡辺 紀子, 石毛 俊幸, 菊池 建太郎, 砂川 恵伸, 生沼 利倫, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 子宮内膜癌における ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) 発現の臨床病理学的検討, 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009 年 5 月
5. 渕之上 史, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 耳下腺の多形腺腫を先行病変として肺転移が起きた癌肉腫の一例, 第 54 回日本唾液腺学会, 東京, 2009 年 11 月
6. 渕之上 史, 中西 陽子, 尾花 ゆかり, 石毛 俊幸, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 子宮頸部異形成および子宮頸癌におけるパラフィン切片をもちいた HPV タイピングおよび免疫組織染色の検討, 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010 年 3 月
7. 渕之上 史, 中西 陽子, 関 利美, 尾花 ゆかり, 芳野 淳子, 坂本 麻菜美, 大荷 澄江, 千島 史尚, 山本 樹生, 根本 則道: 子宮頸部擦過細胞診における HPV DNA タイピングの検出 従来法と LBC 処理の比較検討, 第 44 回日本臨床細胞学会総会春期大会, 京都, 2010 年 11 月
8. 渕之上 史, 中西 陽子, 関 利美, 尾花 ゆかり, 芳野 淳子, 坂本 麻菜美, 大荷 澄江, 千島 史尚, 山本 樹生, 根本 則道: 子宮頸部擦過細胞診における HPV DNA タイピングの検出—第 2 報, 第 50 回日本臨床細胞学会秋期大会, 東京, 2011 年 9 月
9. 渕之上 史, 唐 小燕, 中西 陽子, 石毛 俊幸, 砂川 恵伸, 大荷 澄江, 楠美 嘉晃, 飯塚 美紗都, 江角 真理子, 増田 しのぶ: 乳腺アポクリン癌における FABP-7 の発現検討, 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012 年 3 月
10. 渕之上 史, 飯塚 美紗都, 増田 しのぶ: 乳癌組織における HER2 検査抗体 3 種間での発現差異の検討, 第 20 回日本乳癌学会学術集会, 熊本, 2012 年 6 月
11. 渕之上 史, 唐 小燕, 中西 陽子, 石毛 俊幸, 砂川 恵伸, 大荷 澄江, 江角 眞理

子, 増田 しのぶ: 乳腺アポクリン癌における FAS, PGC1 $\alpha$ , Nrf2 の発現検討, 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013 年 4 月

12. 瀧之上 史, 鬼島 宏, 秋山 太, 津田 均, 増田 しのぶ: 乳癌における HER2, ER 免疫染色の外部精度管理システムモデル確立にむけての予備検討報告, 第 21 回日本乳癌学会総会, 浜松, 2013 年 6 月

13. 瀧之上 史, 中西 陽子, 尾花 ゆかり, 唐 小燕, 楠美 嘉晃, 江角 真理子, 増田 しのぶ: 乳腺アポクリン癌における PGC1 $\alpha$ , p62 の発現検討, 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 2014 年 4 月

② 特別発表           なし

## 2 論文

### ① 原著論文

1. 瀧之上 史, 金枝 貴史, 小平 博, 土岐 政嗣, 今井 一夫: 当院における下平式高周波手術器と YAG レーザーによる円錐切除術の比較, 検討, 日本産科婦人科学会神奈川地方部会会誌, 39:122-124, 2003.

2. Nakanishi Y, Oinuma T, Sano M, Fuchinoue F, Komatsu K, Seki T, Obana Y, Tabata M, Kikuchi K, Shimamura M, Ohmori K, Nemoto N: Coexpression of an unusual form of the EWS-WT1 fusion transcript and interleukin 2/15 receptor betamRNA in a desmoplastic small round cell tumour, Journal of Clinical Pathology, 59:1108-1110, 2006.

3. Komatsu K, Nakanishi Y, Seki T, Yoshino A, Fuchinoue F, Amano S, Komatsu A, Sugitani M, Nemoto N: Application of liquid-based preparation to fine needle aspiration cytology in breast cancer, Acta Cytologica, 52:591-596, 2008.

4. Nakanishi Y, Shimizu T, Tsujino I, Obana Y, Seki T, Fuchinoue F, Ohni S, Oinuma T, Kusumi Y, Yamada T, Takahashi N, Hashimoto S, Nemoto N: Semi-nested real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the successful quantitation of cytokeratin mRNA expression levels for the subtyping of non-small-cell lung carcinoma using paraffin-embedded and microdissected lung biopsy specimens, Acta Histochemica et Cytochemica, 30:85-96, 2013.

5. 瀧之上 史, 増田 しのぶ, 加藤 哲子, 木佐貫 篤, 笹島 ゆう子, 羽場 礼次, 林 徳真吉, 柳澤 昭夫, 和田 了, 鬼島 宏, 秋山 太, 津田 均: 乳癌における HER2、ER 免疫染色の外部精度管理システムモデル確立にむけての予備検討報告, 乳癌の臨床, 28:179-186, 2013.

## ② 症例報告

1. 林 紀乃, 本間 琢, 漙之上 史, 内田 士朗, 水谷 剛, 砂川 恵伸, 大荷 澄江, 生沼 利倫, 根本 則道: 一過性骨髄増殖症と脳室周囲白質軟化症を合併した Down 症候群の 1 剖検例, 診断病理, 21:26-29, 2004.
2. 漙之上 史, 生沼 利倫, 楠美 嘉晃, 関 利美, 小松 京子, 大荷 澄江, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 腹膜原発二相性悪性中皮腫の 1 剖検, 日本臨床細胞学会雑誌, 46:381-385, 2007.
3. Obinata D, Yamaguchi K, Hirano D, Fuchinoue F, Nemoto N, Takahashi S: Intrascrotal involvement of sarcoidosis presenting like testicular appendices, International Journal of Urology, 14:87-88, 2007.
4. Chishima F, Tamura M, Nakazawa T, Sugitani M, Hirano D, Yoshikawa T, Fuchinoue F, Nemoto N, Yamamoto T: Paraaortic paraganglioma arising in an ovarian carcinoma patient mimicking lymph node metastasis, Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 36:204-208, 2010.
5. 大荷 澄江, 杉谷 雅彦, 漙之上 史, 生沼 利倫, 根本 則道: 脳転移で subtype が判明した膀胱微小乳頭型尿路上皮癌の 1 例, 診断病理, 31:198-202, 2014.
6. 大荷 澄江, 増田 しのぶ, 石毛 俊幸, 漙之上 史, 砂川 恵伸, 生沼 利倫, 楠美 嘉晃, 川島 志布子, 水野 滋章, 森山 光彦, 杉谷 雅彦, 根本 則道: 他臓器癌の胃転移における臨床病理学的検討, 日大医学雑誌, 73:145-149, 2014.
7. 漙之上 史, 砂川 恵伸, 楠美 嘉晃, 増田 しのぶ: 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の 1 剖検例, 病理と臨床, 32:1159-1162, 2014

## ③ 総説

漙之上 史, 増田 しのぶ: 【コンパニオン診断】乳癌におけるコンパニオン診断, 病理と臨床, 30:1321-1327, 2012.

3 著書       なし