

## 原 著 乳癌における Fascin タンパク質発現の検討

昭和大学藤が丘病院臨床病理検査部

外池 孝彦

昭和大学医学部薬理学講座 (医科薬理学部門)

佐々木晶子\* 土屋 洋道

橋本翔太郎 百々 悠介

亀田メディカルセンター乳腺科

角田ゆう子

昭和大学医学部臨床病理診断学講座

瀧本 雅文

昭和大学江東豊洲病院臨床病理診断科

九島 巳樹

昭和大学医学部外科学講座 (乳腺外科学部門)

澤田 晃暢 中村 清吾

抄録：予後不良の Triple Negative Breast Cancer (TNBC) はホルモン感受性がないために標的治療薬が確立されていない。また近年、TNBC が basal-like1 (BL1), basal-like2 (BL2), immunomodulatory (IM), mesenchymal (M), mesenchymal stem-like (MSL), luminal androgen receptor (LAR) の6種類に亜分類されたことから、各サブタイプにおける標的ターゲットを確定することが望まれている。今回われわれは乳癌90症例を用いて乳癌の進行度と関連するアクチン結合タンパク質 Fascin の発現を解析した。さらに TNBC 22症例については basal like type と non- basal like type に分類し Fascin の組織特異的な発現を検討した。乳癌90症例のうち Fascin 陽性率は Luminal A で0%, Luminal B (human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) negative) 6%, Luminal B (HER2 positive) 14%, HER2 positive (non luminal) 13%, TNBC は73%であった。また、TNBC 22症例で臨床病理学的因子との関係では Fascin 陽性乳癌は Ki-67 index が30%以上の腫瘍が有意に多く、悪性度の高さが示された。TNBC 亜分類の basal like type の Fascin 発現率は non- basal like type よりも高かった。以上のことから Fascin タンパク質発現と TNBC basal like type の関係が明らかとなった。Fascin は TNBC における悪性度や予後予測の新たな診断基準となり、TNBC 治療ターゲットになる可能性が示唆された。

キーワード：Fascin, TNBC, basal like type

エストロゲン受容体 (ER), プロゲステロン受容体 (PgR) とヒト上皮増殖因子受容体 (HER2) が陰性の Triple Negative Breast Cancer (TNBC) は原発性乳癌の15%を占めるサブタイプであり、抗 HER2 療法と内分泌療法が奏効しない<sup>1,2)</sup>。さらに TNBC においては脳を含む内臓転移率と再発率が高く予後不良である。ホルモン感受性がなく標

的治療薬が確立されていない TNBC については新しい治療法の開発が強く望まれている。近年、TNBC サブタイプが基底細胞型である basal like type, 管腔アンドロゲン受容体 LAR など6つのサブタイプに亜分類された<sup>3)</sup>。細分化されたサブタイプの標的治療法を確立するためには、個々のサブタイプの特徴を明らかとし標的ターゲットを確定する

\*責任著者

Table 1 Fascin expression of the breast cancer subtype

Clinical-pathologic definition	Fascin positive	Fascin negative	Positivity (%)
Luminal A	0	20	0
Luminal B (HER2 negative)	1	17	6.0
Luminal B (HER2 positive)	1	6	14.0
HER2 positive (non luminal)	3	20	13.0
Triple negative (ductal)	16	6	73.0

ことが急務である。

Fascin は腫瘍辺縁部に局在するアクチン結合タンパク質で細胞先端部を誘導しながら膜突起を形成することが知られている<sup>4)</sup>。さらに Fascin タンパク質と乳癌の進行度および腫瘍内 Fascin mRNA レベルが相関し<sup>5)</sup>、Fascin 発現と estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) が負の相関を示すことや<sup>6)</sup>、Fascin を分子標的とするマクロライド系抗菌薬の誘導體 macroketone が Fascin 活性を阻害し予後不良を伴う TNBC と相関することが報告されたこと<sup>7)</sup>、Fascin タンパク質が癌治療の新しい分子治療標的となる可能性が示されはじめてきている。今回、TNBC 治療標的として Fascin の有用性について免疫組織染色を行って検討したので報告する。

## 研究方法

### 1. 検体

腫瘍組織は 2011 年昭和大学医学部乳腺外科で腫瘍摘出術によって摘出された原発浸潤性乳癌 90 症例を用いた (Table 1)。標本の使用については昭和大学医の倫理委員会にて承認を得た (申請番号第 1374 号)。分類は 2011 年の 12th St Gallen International Breast Cancer Conference で定められたサブタイプ別分類に従い、ER, PgR, HER2 の発現状態によって 5 つのサブタイプに分類した。さらに TNBC については CK5/6, EGFR タンパク質発現が陽性を示す basal like type と発現が陰性を示す non- basal like type に分類した。

### 2. 免疫組織化学的染色

すべての検体は 10%ホルマリンで 24 時間固定を行い、厚さ 4  $\mu\text{m}$  の連続切片をシランコーティングしたスライドガラスに貼り乾燥させた。Fascin 染色用の標本は脱パラフィン後、内因性パーオキシ

ターゼ除去のため 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理を 10 分間行い、その後 non-specific blocking reagent (X0909, DAKO) にて非特異反応ブロックを 5 分間、1 次抗体の Fascin 抗体 (1:100, DAKO, Glostrup, Denmark) で 1 時間、Envision/HRP の 2 次抗体で 30 分間反応後 DAKO DAB LiquidSystem を用いて発色した。CK5/6 (1:100, DAKO) は一次抗体反応の前に熱処理による抗原賦活処理を行い、EGFR (希釈済み抗体, NICHIREI BIOSCIENCES INC, Tokyo, Japan) も proteinase K 処理後、Envision 法にて行った。Fascin は腫瘍細胞の 30% 以上で細胞膜と核に陽性細胞が認められたものを陽性と判定し、CK5/6, EGFR は細胞質に 30% 以上陽性を示した組織を陽性と判定した。Ki-67 は (1:100, DAKO) 一次抗体反応の前に熱処理による抗原賦活処理を行った。German Immunoreactive score に準じて陽性細胞 30% 以上を陽性 (+) とした<sup>8)</sup>。

### 3. 統計処理

データは Chi square test にて統計処理を行い  $p < 0.01$  をもって有意差ありとした。また、TNBC basal like type と non- basal like type の Fascin 陽性率は 95% 信頼区間 (confidence interval, 以下 CI) を併用した。

## 結果

Luminal A における Fascin 陽性率は 0%, Luminal B (HER2 negative) は 6%, Luminal B (HER2 positive) は 14%, HER2 positive (non luminal) は 13%, TNBC は 73% で、TNBC において Fascin 陽性率が高かった (Fig. 1, Table 1)。TNBC 22 例のうちで、Fascin 陽性 16 例中 50 歳未満が 9 例、50 歳以上が 7 例、Facin 陰性 6 例中 50 歳未満が 1 例、50 歳以上が 5 例であった。Fascin 陽性 50 歳未満と 50 歳以上、Facin 陰性 50 歳未満と 50 歳以上の 4

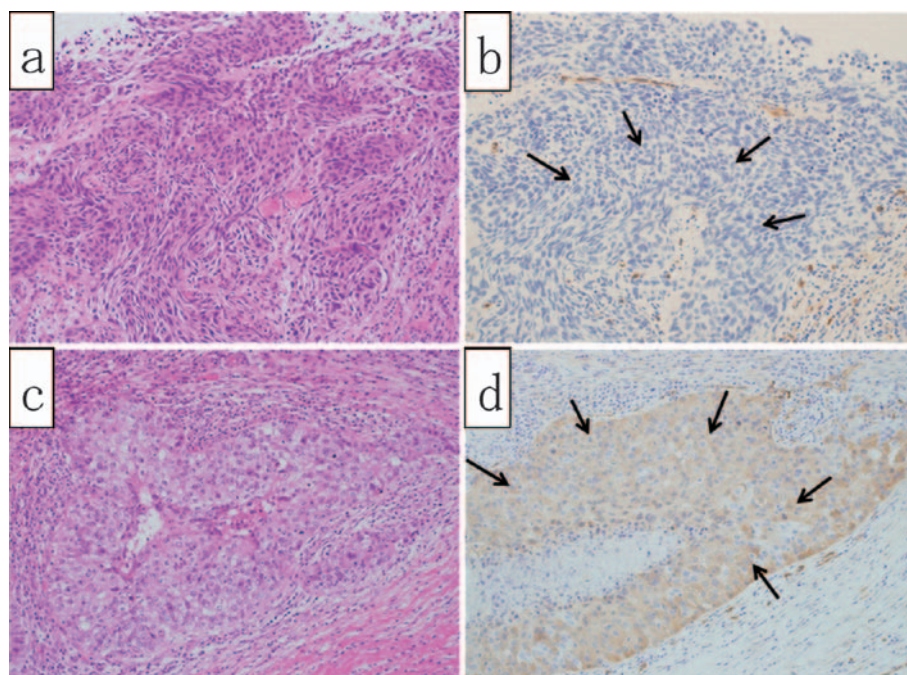


Fig. 1 Fascin immunohistochemical staining (a) HE stain of Luminal A (b) Fascin stain of Luminal A. Fascin stained a site same as (a). Fascin is not found in the tumor cells of the arrow (c) HE stain of Triple Negative Breast Cancer (d) Fascin stain of Triple Negative Breast Cancer. Fascin positive in the cytoplasm of the tumor cells ( $\times 200$ ).

群間を比較した  $2 \times 2$  Chi square test では有意差は認められなかった ( $p = 0.16$ ). Fascin 陽性 16 例中腫瘍径の 2 cm 未満が 10 例, 2 cm 以上は 6 例, Fascin 陰性 6 例中腫瘍径の 2 cm 未満は 2 例, 2 cm 以上は 4 例であった. Fascin 陽性腫瘍径の 2 cm 未満と腫瘍径 2 cm 以上, Fascin 陰性腫瘍径の 2 cm 未満と 2 cm 以上の 4 群間を比較した  $2 \times 2$  Chi square test では有意差は認められなかった ( $p = 0.35$ ). Fascin 陽性 16 例中 Ki-67 の 30% 未満は 0 例, 30% 以上は 16 例, Fascin 陰性 6 例中 Ki-67 の 30% 未満は 4 例, 30% 以上は 2 例であった. Fascin 陽性 Ki-67 の 30% 未満と 30% 以上, Fascin 陰性 Ki-67 の 30% 未満と 30% 以上の 4 群間を比較した  $2 \times 2$  Chi square test では Fascin 陽性と陰性を示す Ki-67 が 30% 以上の腫瘍間において, Fascin 陽性 Ki-67 の 30% 以上で有意に高く認められた ( $p = 0.0021$ ). また, TNBC の亜分類の指標になる CK5/6, EGFR については, Fascin 陽性 16 例中 CK5/6 陽性は 6 例, CK5/6 陰性は 10 例で Fascin 陰性 6 例中 CK5/6 陽性は 1 例, CK5/6 陰性は 5 例であった. Fascin 陽

性 CK5/6 陽性と CK5/6 陰性, Fascin 陰性 CK5/6 陽性と CK5/6 陰性の 4 群間を比較した  $2 \times 2$  Chi square test では有意差は認められなかった ( $p = 0.62$ ). Fascin 陽性を示した Fascin 陽性 16 例中 EGFR 陽性は 11 例, EGFR 陰性は 5 例で, Fascin 陰性 6 例中 EGFR 陽性は 3 例, EGFR 陰性は 3 例であった. Fascin 陽性 EGFR 陽性と EGFR 陰性, Fascin 陰性 EGFR 陽性と EGFR 陰性の 4 群間を比較した  $2 \times 2$  Chi square test では有意差は認められなかった ( $p = 0.62$ ) (Table 2). TNBC を basal like type と non- basal like type に分けて検討した. basal like type の Fascin 陽性率は 82% (95% 信頼区間: 64 ~ 100%), non- basal like type の Fascin 陽性率は 40% (95% 信頼区間: 12 ~ 77%) であり, basal like type で Fascin 陽性率が高かった (Table 3).

#### 考 察

近年, 乳癌と Fascin タンパク質発現との関係について多く報告されている. Fascin-1 タンパク質は 55 kDa のアクチン結合蛋白で, 胚形成と癌組織発

Table 2 Relations of clinicopathological factor and Fascin expression of TNBC

	Fascin positive	Fascin negative	p
Age < 50 (years)	9	1	0.16
≥ 50	7	5	
Tumor size < 2 cm	10	2	0.35
≥ 2 cm	6	4	
Ki-67 < 30%	0	4	0.0021
≥ 30%	16	2	
CK5/6 positive	6	1	0.62
negative	10	5	
EGFR positive	11	3	0.62
negative	5	3	

Table 3 Fascin expression in TNBC basal like/ non-basal like type

Variable	Positivity of Fascin	95% CI
basal like type	82% (14/17)	64%–100%
non-basal like type	40% (2/5)	12%–77%

CI: confidence interval

生の類似性が示されるとともにヒト胚形成から成人までの神経、リンパ組織の濾胞樹状細胞、重層扁平上皮の基底層細胞に発現する組織特異性タンパク質である<sup>9)</sup>。子宮頸内膜の浸潤腺癌 (invasive adenocarcinoma of the endocervix)<sup>10)</sup> や口腔内のメラノサイト、子宮やヒト肺組織の腫瘍など悪性度の高い腫瘍で発現が確認されることから口腔扁平上皮癌の予後マーカーとして使用され<sup>11)</sup>、乳癌 stage T0-1, 2, 3 では正常乳腺よりも発現率が高く、生存率と正の相関を示したことから乳癌における予後因子としての可能性も報告された<sup>5)</sup>。しかしながら TNBC と Fascin 発現が関連するという報告は少ない。今回の 90 症例のうち TNBC において Fascin 陽性率は他のサブタイプに比べて高く Fascin タンパク質発現と TNBC の関連が強く示唆された。さらに Fascin 発現と臨床病理学的因子の関連については Fascin 陽性 Ki-67 の 30% 未満と 30% 以上、Fascin 陰性 Ki-67 の 30% 未満と 30% 以上の 4 群間を比較したところ、Fascin 陽性と陰性を示す Ki-67 が 30% 以上の腫瘍間において、Fascin 陽性 Ki-67

の 30% 以上で有意に高く認められたことから、悪性度と細胞増殖能が高い TNBC は、細胞骨格アクチンに結合するアクチン束化タンパク質 (actin-bundling protein) Fascin が細胞先端部を誘導しながら活発に膜突起を形成し増殖するために、Fascin 発現が高く観察されたことが考えられた。

2011 年、TNBC は Lehmann らによって 6 つに亜分類された<sup>12)</sup>。BL1 (basal-like 基底細胞様 1)、BL2 (basal-like 基底細胞様 2)、免疫調節系 IM (immunomodulatory)、間葉系 M (mesenchymal)、間葉系幹細胞様 MSL (mesenchymal stem-like)、管腔アンドロゲン受容体 LAR (luminal androgen receptor) に分類された。このうち CK5/6 および EGFR が陽性を示す BL1 と BL2 分類型は TNBC 全体で 50% を占める。今回、basal like type (BL1, BL2) と non-basal like type (IM, M, MSL, LAR) に分けて Fascin 発現の関連を確認したところ basal like type は non-basal like type に比べ Fascin 陽性率が高いことが確認された。basal like type には CK5/6 と EGFR が有意に高発現する。高分子ケラチン CK5/6 (58 kDa, 56 kDa) が基底細胞や中皮細胞の中皮腫、扁平上皮の悪性度が高い細胞で発現するため増殖能が高い TNBC basal like type の Fascin 陽性細胞に発現するものと考えられた。さらに EGFR は細胞膜表面に存在し癌組織での高発現や、ホルモン療法、化学療法、放射線療法に耐性を示し予後不良と関係し治療抵抗性を有することから<sup>13,14)</sup>、悪性度が高く予後不良な TNBC basal like

type の，特に増殖能が高い Fascin 陽性組織に特異的に発現することが明らかとなった。

今回，免疫組織化学的染色を用いた乳癌組織の Fascin 発現の結果から，Fascin は TNBC basal type における悪性度や予後予測の新たな診断指標および TNBC 治療標的タンパク質としての可能性が示唆された。

文 献

- 1) Dey N, Smith BR, Leyland-Jones B. Targeting basal-like breast cancers. *Curr Drug Targets*. 2012;13:1510-1524.
- 2) Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*. 2007;8:235-244.
- 3) Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, *et al*. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750-2767.
- 4) Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, *et al*. Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2000;83:870-873.
- 5) Zhang Y, Tong X. Expression of the actin-binding proteins indicates that cofilin and fascin are related to breast tumour size. *J Int Med Res*. 2010;38:1042-1048.
- 6) Nese N, Kandiloglu AR, Simsek G, *et al*. Comparison of the desmoplastic reaction and invading ability in invasive ductal carcinoma of the breast and prostatic adenocarcinoma based on the expression of heat shock protein 47 and fascin. *Anal Quant Cytol Histol*. 2010;32:90-101.
- 7) Chen L, Yang S, Jakoncic J, *et al*. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature*. 2010;464:1062-1066.
- 8) Remmele W, Schickentanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract*. 1993;189:862-866.
- 9) Esnakula AK, Ricks-Santi L, Kwagyan J, *et al*. Strong association of fascin expression with triple negative breast cancer and basal-like phenotype in African-American women. *J Clin Pathol*. 2014;67:153-160.
- 10) Stewart CJ, Crook M, Loi S. Fascin expression in endocervical neoplasia: correlation with tumour morphology and growth pattern. *J Clin Pathol*. 2012;65:213-217.
- 11) Chen SF, Yang SF, Li JW, *et al*. Expression of fascin in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas has prognostic significance - a tissue microarray study of 129 cases. *Histopathology*. 2007;51:173-183.
- 12) Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, *et al*. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750-2767.
- 13) Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 4:S9-S15.
- 14) Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, *et al*. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1368-1376.

## FASCIN PROTEIN EXPRESSION IN BREAST CANCER

Takahiko TONOIKE

Department of Pathology, Showa University Fujigaoka Hospital

Masafumi TAKIMOTO

Department of Pathology, Showa University School of Medicine

Akiko SASAKI, Hiromichi TSUCHIYA,  
Shotaro HASHIMOTO and Yusuke DODO

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Yuko TSUNODA

Breast Center, Kameda Medical Center

Miki KUSHIMA

Department of Pathology, Showa University Koto Toyosu Hospital

Terumasa SAWADA and Seigo NAKAMURA

Department of Breast Surgical Oncology, Showa University School of Medicine

**Abstract** — No molecular target drug has been established for poor-prognostic triple-negative breast cancer (TNBC) because it has no hormone sensitivity. In addition, TNBC has recently been sub-classified into 6 types: BL1, BL2, IM, M, MSL, and LAR. Thus, the establishment of a target for each subtype is desired. In this study, we analyzed the expression of actin-binding protein, Fascin, associated with the breast cancer stage in 90 breast cancer patients. In addition, the tissue-specific Fascin expression was investigated in 22 TNBC cases classified as basal-like type (accounting for 50% of the overall expression rate) and other non-basal-like subtypes. In the 90 breast cancer patients, the Fascin-positive rate was 0% in Luminal A, 6% in Luminal B (HER2-negative), 14% in Luminal B (HER2-positive), 13% in HER2-positive (non-luminal), and 73% in TNBC. In the 22 TNBC patients, regarding the relationship with clinicopathological factors, the frequency of a Fascin-positive breast cancer mass with a Ki-67 index of 30% or above was significantly higher, showing a high-level malignancy. The Fascin expression rate in the basal-like type of TNBC sub-classification was higher than that in the non-basal-like types. These findings clarified the relationship between Fascin protein expression and the basal-like type of TNBC. These findings suggest that Fascin can serve as a new diagnostic criterion to assess malignancy and the prognosis of TNBC patients, and as a target of TNBC treatment.

**Key words:** Fascin, TNBC, basal like type

〔受付：10月10日，受理：11月19日，2014〕