

# 学位論文

## 標題

**ZEB-1** 発現は浸潤性乳管癌の再発予測因子であるとともに、**E-cadherin** 減弱が加わることで、より強力な再発予測因子となり得る

山形大学大学院医学系研究科      (医学専攻)

責任講座   外科学第一講座

指導講座 1   病理診断学講座

指導講座 2   内科学第二講座

柴田健一

【背景】上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)は上皮細胞が間質細胞に変化する現象であり、腫瘍の進行、転移に重要な役割を果たすとされる。乳癌において、EMTに関与する分子である ZEB-1 および E-cadherin と予後との関連を評価した報告は少ない。それらの分子が術後の再発予測因子となるかの検討を目的とした。

【方法】2007 年から 2010 年までに、山形大学医学部附属病院で根治切除が施行された Stage I、II、III の浸潤性乳管癌 116 例(平均年齢 58.5 歳、男:女=0:116)を対象とした。癌の浸潤部を免疫組織化学的に検討した。ZEB-1 は腫瘍の周囲の間質の紡錘型細胞が 5 %以上染色されているものを陽性とした。E-cadherin は、腫瘍全体の染色が全体的に弱いもの、および、腫瘍の中心部位と比較し、辺縁部位で染色が弱いものを減弱とした。それぞれの結果と、腫瘍の臨床病理学的特徴および術後再発との関連を検討した。

【結果】対象症例の Stage は、I が 51 例(44%)、II が 58 例(50%)、III が 7 例(6%)であった。リンパ節転移陽性例は 37 例(32%)、陰性例は 79 例(68%)であった。観察期間中(中央値 59.5 ヶ月、8-89)に、12 例が術後再発をきたした。ER 陽性は 101 例(87%)、HER2 陽性は 20 例(17%)であった。ZEB-1 陽性は 66 例(57%)であった。ZEB-1 発現と Stage、リンパ節転移の有無、ER、HER2 には有意な関連は見られなかったが、ZEB-1 陽性例では、術後再発が多く見られた( $p = 0.04$ )。E-cadherin 減弱は 34 例(29%)であった。E-cadherin 発現と、Stage、リンパ節転移の有無、HER2 には有意な関連は見られなかったが、ER 陰性例が多く見られた。また、E-cadherin 陰性例では、術後再発が多く見られた( $p = 0.004$ )。Kaplan-Meier 法と Log-rank 検定で検討したところ、ZEB-1 陽性例は、陰性例に比較して無再発生存率が低下していた(5年 83.2 vs. 95.8%,  $p = 0.036$ )。また、E-cadherin 減弱例は陽性例に比較して無再発生存率が低下していた(5年 74.5 vs. 94.7%,  $p = 0.002$ )。E-cadherin 減弱例の群において、ZEB-1 陽性例は陰性例に比較して無再発生存率が低下している傾向があった。(5年 68.2 vs 88.9%,  $p = 0.196$ )。

【結論】ZEB-1 発現は浸潤性乳管癌の再発予測因子であるとともに、E-cadherin 減弱が加わることで、より強力な再発予測因子となり得ると考えられた。

キーワード Breast cancer, ZEB-1, E-cadherin, EMT

## 【緒言】

乳癌は世界で、女性で最も一般的に見られる悪性腫瘍の1つであり、乳癌による死亡の90%は腫瘍の局所進行と遠隔転移によるものである。遠隔転移の過程において、腫瘍細胞が、接着を失い、浸潤し、脈管浸潤して転移巣を形成する。上皮性腫瘍細胞が転移性腫瘍細胞に変化することが、転移の成立に関与するとされる<sup>1)</sup>。

上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)は上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり、Hayらが最初に提唱した概念である<sup>2)</sup>。EMTは胎生期の器官形成において重要な役割を示すとされている。一方、EMTにより、上皮性腫瘍細胞がそれぞれの接着を失い、間質に移行することから、組織の線維化や癌細胞の浸潤が起きることも示唆されている。近年、EMTは癌の浸潤、転移、化学療法耐性に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた<sup>3, 4)</sup>。しかし、癌腫によりその役割は異なっている。乳癌においても、EMTの研究がおこなわれているが、その役割は十分には解明されていない<sup>1, 5)</sup>。

E-cadherinはヒトの上皮細胞に存在する膜貫通型糖タンパクであり、それを通じて細胞間接着を保持し、上皮細胞の特徴を維持していることから、上皮細胞の代表的な接着分子のひとつとされている。EMTの過程において、E-cadherinが消失し、上皮細胞の接着が失われ、間質に移行し、転移能や浸潤能を獲得する。癌の悪性度とその発現が逆相関することが知られており、現在、E-cadherinの消失はEMTのもっとも重要な要因の1つとされている<sup>3, 4)</sup>。E-cadherinの発現はさまざまな転写因子によって調節されている。Zinc finger E-box-binding homeobox 1(ZEB-1)はzinc-finger E-box-binding homeobox factor familyの一つであり、E-cadherinのプロモーターに結合し、E-cadherinの転写を抑制する分子である。そのため、ZEB-1は、E-cadherinの発現を抑制し、上皮細胞の特徴を失わせることにより、腫瘍細胞の転移を促進させることから、EMTの代表的な分子とされている<sup>6, 7)</sup>。また、EMTを引き起こす因子により、腫瘍細胞がより高い浸潤能や化学療法への耐性を獲得することが示唆されている<sup>(8)</sup>。近年、胃癌、膵臓癌、肝細胞癌、肺癌などの様々な癌腫で、ZEB-1の発現は腫瘍の高い悪性度や転移能と相関し、予後不良であると報告されている<sup>9-12)</sup>。

乳癌患者において、術後再発は治療方針や予後の予測に重要な因子となる。われわれは、EMT関連分子は乳癌の術後予測因子になりえると推測した。乳癌においても、免疫組織化学染色によるZEB-1に関する研究がなされているが、術後再発予測因子としての有用性はいまだ明らかではない<sup>13-16)</sup>。今回、われわれは、ZEB-1とE-cadherinを乳癌の切除標本で免疫組織化学的に評価し、術後の再発予測因子となるかを検討することを目的とした。

## 【対象と方法】

### 対象

2007 年 1 月から 2010 年 12 月までに山形大学医学部附属病院で根治切除が施行された Stage I、II、III の浸潤性乳管癌 114 例のうち、免疫組織化学染色が可能であった 116 例を対象とした。標本は、乳癌取り扱い規約第 17 版(日本乳癌学会 2012 年)に則り、病理学的因子を明示した。Staging は UICC の TNM 分類(第 7 版 2009 年)で行った。両側乳癌症例は、より Stage の高いもの、悪性度が高いと思われる方を対象とした。術前化学療法施行例は、施行前の Stage を採用した。

Estrogen receptor (ER) は抗エストロゲンレセプター ウサギモノクローナル抗体(clone SP1, Ventana Japan, Yokohama, Japan)、Progesterone receptor (PgR) は抗プロゲステロンレセプター ウサギモノクローナル抗体(clone 1E2, Ventana Japan, Yokohama, Japan) を用いた免疫組織化学染色で腫瘍細胞の核が 1 %以上陽性であったものを陽性とした。Human epidermal growth factor receptor type2 (HER2)は、Hercep Test kit (DAKO Japan, Tokyo, Japan)を用いた免疫組織化学染色で免疫組織学的スコアが 3 あるいは、2 であつ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)陽性のものを陽性とした。

本研究は、Helsinki 宣言を遵守し、山形大学医学部倫理委員会の承認のもとに行われ、組織標本の採取の前に、文書によるインフォームドコンセントを得ている。患者の治療方針は、患者のリスクに応じて、Kimura らの報告<sup>17)</sup>とその時点の乳癌診療ガイドラインに則って行った。患者にとって、禁忌である場合や、患者の同意を得られなかった治療法は施行しなかった。

### 免疫組織学的染色

抗 ZEB-1 マウスモノクローナル抗体(Clone CL0151, lot number 02551, ATLAS ANTIBODIES, Stockholm, Sweden)および、抗 E-cadherin マウスモノクローナル抗体(Clone NCH-38, lot number 10081325, DAKO JAPAN, Tokyo, Japan) を用いた。抗体は、それぞれ、1:500、1:100 にリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, PBS)で希釈して使用した。

標本は、ホルマリン固定とパラフィン包埋が行われた。癌の浸潤部を含む代表的な切片からマイクロトームで薄切切片を作製した。免疫染色は labeled streptavidin biotinylated antibody 法 (LSAB 法)で行った。脱パラフィンおよび脱水し、pH 6.0 のクエン酸バッファー液に入れ、120℃で 20 分のオートクレーブ処理による抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼの除去は、0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$  を含むメタノール液で 30 分で行った。非特異的反応の除去は、スキムミルクを用いて行った。一次抗体はそれぞれ抗 ZEB-1 抗体、抗 E-cadherin 抗体を用いて、4℃で一晩反応させた。ネガティブコントロールには、一次抗体を使用しなかった。翌日に、ニチレイバイオサイエンス社のヒストファ

イン SAB-PO (MULTI) キット (NICHIREI, Tokyo) を二次抗体として用いて、ビオチンとストレプトアビジンの特異的な結合を介した抗原・第一抗体・第二抗体・酵素標識を行い、diaminobenzidine (DAB) で発色後、標本はヘマトキシリン液で対比染色した。ZEB-1 に関しては、すでに陽性を確認している子宮癌肉腫の標本を、E-cadherin に関しては、正常大腸粘膜をポジティブコントロールとして使用した。いずれも、ネガティブコントロールには、有意な染色が見られないことを確認した。

#### 免疫組織学的染色の評価

ZEB-1 の染色は、Soini ら<sup>15)</sup>の研究報告を基に、上皮性腫瘍細胞に関しては、ZEB-1 の染色は、核の染色の有無のみを有意として、染色強度は問わないものとした。腫瘍周囲の間質に存在する紡錘型細胞を以下のように半定量で評価した。0-5% = negative、5-25% = weak positivity、25-50% = moderate positivity、50-75% = strong positivity、75-100% = very strong positivity。核の染色があるものを優位として、染色強度は問わないものとした。weak positivity 以上を陽性と判断した。E-cadherin の免疫染色の評価は、Pang ら<sup>18)</sup>の研究報告を基に、細胞間の線上の染色強度を、weak staining、moderate staining および strong staining で評価した。細胞間の発現頻度を 0-25%、25-50%、50-75% および 75%-で半定量で評価した。腫瘍の染色が全体的に weak staining あるいは、25% 未満を陰性とした。今回、われわれは、上記基準に加えて、腫瘍の中心部と比較して、脂肪織への浸潤部などの辺縁部位で染色強度が弱いものや発現が少ないものも陰性とした。同一標本内の正常乳腺組織を内部コントロールとし、正常乳腺組織で E-cadherin が発現していることを確認した。

いずれの標本も最終的な判定は、臨床病理学的所見や予後と照らし合わせることなく、柴田がブラインドで評価した。

#### 統計学的解析

統計学的解析は Windows ソフトウェアの SAS Japan 社の JMP 11.0.0 を用いて行った。ZEB-1 あるいは E-cadherin と臨床病理学的パラメーターとの相関は  $\chi^2$  検定で解析した。無再発生存率は、Kaplan-Meier 法を用いて解析し、群間の差は log-rank 検定で評価した。術後再発までの期間は、手術が施行されてから、再発が画像的に確認された期間までとした。再発予測因子は、COX 比例ハザードモデルによる単変量解析および多変量解析で検討した。p<0.05 を有意差有りとした。

## 【結果】

### 患者背景

116 例の患者背景を Table 1 に示す。対象期間に男性患者はおらず、全例が女性であった。平均年齢は 58.5 歳 (32-88) であった。Stage I は 51 例 (44%)、II は 58 例 (50%)、III は 7 例 (6%) であった。リンパ節転移は 37 例 (32%) で陽性であった。ER は 101 例 (87%) で陽性、HER2 は 20 例 (17%) で陽性であった。トリプルネガティブ症例は 9 例 (8%) であった。手術死亡例は見られなかった。再発までの術後観察期間 (中央値 59.5 ヶ月、8-89) において、12 例が術後再発をきたしていた (リンパ節転移 7 例、骨転移 4 例、肺転移 3 例、肝転移 1 例、同時に出現した部位をふくむ)。再発症例 12 例の、再発までの期間の中央値は 20.5 ヶ月 (12-43) であった。全観察期間 (中央値 61 ヶ月、8-89) において、5 例が死亡していた。死亡症例において、再発から死亡までの期間の中央値は 24 ヶ月 (19-68) であった。

### ZEB-1 の発現について

ZEB-1 はポジティブコントロールの子宮癌肉腫の肉腫成分の核および、乳癌組織の上皮性腫瘍辺縁の間質において、紡錘型の細胞の核が染色された。浸潤生乳管癌では、ZEB-1 は腫瘍の上皮細胞には発現は見られず、浸潤癌の周囲の間質の紡錘型細胞のみに発現が見られた (Figure 1 a, b)。標本内に含まれる非浸潤癌の部位の周辺には発現はごくわずかしき見られなかった。そのため、間質における発現のみを評価した。ZEB-1 発現の免疫組織学化学染色結果と臨床病理学的パラメーターの関連を Table 2 に示す。間質における紡錘型細胞の ZEB-1 陽性例は全 116 例中 66 例 (57%) であった。術後再発が多く見られた ( $p = 0.040$ )。他には、Stage、リンパ節転移の有無、バイオマーカーなどを含め有意差は見られなかった。7 例において、腫瘍の辺縁部を囲むように ZEB-1 の発現が見られた (Figure 1 c) が、臨床病理学的所見や術後再発との有意な相関は見られなかった (data not shown)。

### E-cadherin の発現について

E-cadherin の染色を Figure 2 に示す。E-cadherin は、腫瘍の上皮細胞に染色が見られ、周囲の間質の細胞には発現は見られなかった。また、腫瘍の中心と、脂肪組織への浸潤部などの辺縁部位との比較の 1 例を Figure 3 に示す。E-cadherin 減弱は 34 例 (29%) であった。E-cadherin 減弱例では、ER 陰性例 ( $p = 0.008$ ) とトリプルネガティブ例 ( $p = 0.002$ )、再発例も多く見られた ( $p = 0.004$ )。そのほかのパラメーターには有意差を認めなかった。ZEB-1 発現と E-cadherin 減弱との間には、相関傾向はあるとおもわれた ( $p = 0.052$ ) が、有意差は見られなかった (Table 2)。

#### ZEB-1 および E-cadherin 発現と術後再発の関連

本研究の観察期間（中央値 59.5 ヶ月 8-89）において、12 例が術後再発をきたしていた。そのうち、10 例が ZEB-1 陽性であった。同様に、8 例で E-cadherin が減弱していた。ZEB-1 および、E-cadherin 発現による無再発生存率を Fig. 4 に示す。Kaplan-Meier 法で無再発生存率を比較したところ、ZEB-1 陽性例は陰性例よりも無再発生存率は低下していた（5-year 83.2 vs. 95.8%,  $p = 0.036$ ）（Fig. 4a）。E-cadherin 減弱例は、陽性例よりも無再発生存率が低下していた（5-year 74.5 vs. 94.7%,  $p = 0.002$ ）（Fig. 4b）。また、ZEB-1、E-cadherin それぞれ単独だけでなく、E-cadherin 減弱例における ZEB-1 陽性が与える影響についても検討した。E-cadherin 減弱かつ ZEB-1 陽性例は、E-cadherin 減弱かつ ZEB-1 陰性例に比較して、無再発生存率が低下していた。統計学的有意差は得られなかったものの、傾向はあるものと考えられた（5-year 68.2 vs. 88.9%,  $p = 0.196$ ）。

#### 単変量および多変量解析

術後再発に関与する因子の単変量および多変量解析を Table 3 に示す。単変量解析において、術後再発に有意に関連するものは、腫瘍径  $> 2.0$  cm ( $p = 0.0003$ )、HER2 陽性 ( $p = 0.027$ )、リンパ節転移陽性 ( $p = 0.009$ )、ZEB-1 発現 ( $p = 0.027$ )、E-cadherin 減弱 ( $p = 0.004$ ) であった。多変量解析では、術後再発に有意に関連するものは、腫瘍径  $> 2.0$  cm ( $p = 0.011$ )、E-cadherin 減弱 ( $p = 0.045$ ) のみであった。リンパ節転移陽性は、相関傾向にはあるものの、有意差はみられなかった ( $p = 0.052$ )。

## 【考察】

本研究において、われわれは、EMT 関連分子である ZEB-1 と E-cadherin の発現を浸潤性乳管癌において免疫組織化学的に検討し、その臨床病理学的特徴と術後再発率を評価した。間質の ZEB-1 発現例や腫瘍の E-cadherin 減弱例において、再発例が多く見られていた。

### ZEB-1

これまでの研究において、Montserrat らは、免疫組織染色で乳癌症例の 19%で腫瘍細胞が ZEB-1 陽性であったが、予後因子とはならないと報告している。意外な結果ではあるが、ZEB-1 の mRNA が発現している方が、Grade が低く、予後が良好であるとしている<sup>14)</sup>。また、Soini らは、ZEB-1 は免疫組織染色において、75%の症例で間質の紡錘型細胞は陽性例であったが、腫瘍細胞はすべて陰性であったと報告している。しかしながら、間質の細胞での ZEB-1 発現は、予後には相関しなかったとしている<sup>15)</sup>。

われわれの研究において、ZEB-1 陽性例では、ER、PgR、HER 2 等のバイオマーカーや TNM 因子との相関はなかったものの、陰性例に比較して、無再発生存率が低下していた。ZEB-1 は間質の紡錘型細胞のみが染色され、上皮性腫瘍細胞は染色されなかった。また、標本内に含まれていた非浸潤癌の周辺の紡錘型細胞には ZEB-1 陽性細胞は少数のみであった (data not shown)。今回、ポジティブコントロールとして使用した子宮癌肉腫の標本においても、間質の肉腫成分は染色されたが、上皮性腫瘍は染色されなかった。われわれは、大腸癌組織も ZEB-1 で染色してみたが、やはり、間質の細胞のみが染色され、腫瘍細胞は染色されなかった (date not shown)。近年、EMT にともなって、上皮細胞が大きな形態的な変化をとともなって間質の紡錘型の細胞に変化することや、繊維化した組織の筋繊維芽細胞の中には、上皮由来であるものがあることが明らかにされている (19)。本研究で見られた間質の ZEB-1 陽性細胞は、腫瘍由来である可能性があり、腫瘍の悪性度との関連があると考えられた。今回、われわれは、116 例中 7 例の標本内において、腫瘍の辺縁を取り囲むように ZEB-1 が発現している部位を確認した (Fig. 1c)。この所見を、Kimura.W-Shibata.K の浸潤と命名した。腫瘍がまさに EMT を起こして浸潤する過程と推測された。臨床病理学的因子や術後再発との有意な相関は見られなかったが、今後さらに検討を重ねていきたいと考えている。

### E-cadherin

乳癌における、免疫組織染色による E-cadherin の染色を評価した研究はこれまで多数あり、Meta-analysis も行われている。その多くは、E-cadherin 減弱例では予後が不良であるとされている。しかしながら、施設間での染色法や評価方法が均一化されていないことが問題としてあげられる<sup>20)</sup>。近年においても、免疫組織染色による E-cadherin 評価方法として、腫瘍細胞を全体的に評価する研究が報告されている<sup>18, 21)</sup>。しかしな



がら、われわれは、腫瘍全体で E-cadherin の染色が減弱している場合には、標本の保存状態や染色法の影響による結果である可能性が否定できないと考えた。われわれは、EMT は腫瘍辺縁で起こるものと推測し、腫瘍の全体部分のみならず、腫瘍の辺縁部を中心部と比較することでも評価した。また、同一プレパラート中に存在する正常乳腺組織が問題なく染色されていることを確認し、腫瘍細胞においてのみ減弱していることを確認した。この評価方法は、標本ごとの違いもあり、可及的におこなわれたものではあるが、保存状態や染色方法による影響が少なくなり、より精度の高い評価ができたものと考えられた。

#### 再発予測因子

本研究において、浸潤性乳管癌における ZEB-1 発現が再発予測因子となりえることを初めて報告した。また、より強力な再発予測因子を見いだすため、両者の発現を加えて検討した。E-cadherin が減弱している 34 例の群において、ZEB-1 陽性例は陰性例よりも無再発生存率が低下していた (5-year 68.2vs. 88.9%,  $p = 0.196$ )。統計学的な有意差が得られなかったのは、検討症例数が少ないことによると考えられたが、傾向はあると考えられた。ZEB-1 単独でも再発予測因子として有効であるが、さらに E-cadherin を組み合わせて評価することで、より強力な再発予測因子となりえると考えられた。

#### 多変量解析

再発予後因子として、多変量解析を行ったが、有意なものは、腫瘍径  $>2.0$  cm と E-cadherin 減弱のみであった。ZEB-1 は単変量解析では有意差をみとめたが、多変量解析に関して有意差を得られなかった。本研究で、われわれは、E-cadherin の減弱の評価を、腫瘍の中心部と辺縁部で比較するという新しい方法で検討した。その結果、多変量解析でも有意差が得られ、浸潤性乳管癌の術後再発の独立した予測因子として、有用であると考えられた。本研究で検討した EMT 関連分子において、E-cadherin 減弱は、ZEB-1 発現よりもより強く術後再発に関与していると考えられた。

本研究は、浸潤性乳管癌において、免疫染色による ZEB-1 発現が無再発生存率の予測因子として有効であることを示した最初の報告である。また、ZEB-1 と E-cadherin 発現を組み合わせが無再発生存率の予測因子であるかを検討した最初の報告である。ZEB-1 陽性および E-cadherin 減弱が見られる症例は無再発生存率が低く、より high risk であり、積極的な術後補助療法の追加が必要であると考えられた。現在のところ、多くの癌腫で ZEB-1 や E-cadherin を悪性度の評価や再発予測因子として検討している報告は散見されるが、それらを標的とする治療法の報告はなされていない。今後の研究開発により、新たな治療戦略の確立が望まれる。本研究の限界は、生存率には

有意な差が見られなかったことである。本研究の対象症例 116 例のうち、死亡例は 5 例であった。今後は、より多くの患者数で長期間にわたって観察する必要があると考えられた。

#### 結論

ZEB-1 発現は浸潤性乳管癌の再発予測因子であるとともに、E-cadherin 減弱が加わることで、より強力な再発予測因子となり得る

#### 謝辞

本研究は、第 106 回日本外科学会定期学術集会記念・外科手術研究助成基金からの助成金によって遂行された。本研究にあたり、御指導いただきました山形大学医学部外科学第一講座の木村理教授、研究の御協力をいただいた山形大学医学部外科学第一講座の医局員の皆様、薄切切片の作製をしていただいた山形大学医学部外科学第一講座の黒沼正子さんに深謝いたします。

## 文献

1. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Hallm*. 2013;1:38-49.
2. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*. 1982;95:333-9.
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8.
4. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139:871-90.
5. Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11:213.
6. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res*. 2008;68:537-44.
7. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:151-66.
8. Foroni C, Broggin M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*. Oct;38:689-97.
9. Jia B, Liu H, Kong Q, Li B. Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2012;366:223-9.
10. Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, et al. Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 2012;105:655-61.
11. Hashiguchi M, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Hiwatashi K, Minami K, et al. Clinical implication of ZEB-1 and E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma (HCC). *BMC cancer*. 2013;13:572.
12. Zhang J, Lu C, Zhang J, Kang J, Cao C, Li M. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2013;40:949-56.
13. Geradts J, de Herreros AG, Su Z, Burchette J, Broadwater G, Bachelder RE. Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2011;42:1125-31.

14. Montserrat N, Gallardo A, Escuin D, Catasus L, Prat J, Gutierrez-Avigno FJ, et al. Repression of E-cadherin by SNAIL, ZEB1, and TWIST in invasive ductal carcinomas of the breast: a cooperative effort? *Hum Pathol.* 2011;42:103-10.
15. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, Auvinen P, et al. Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC cancer.* 2011;11:73.
16. Karihtala P, Auvinen P, Kauppila S, Haapasaari KM, Jukkola-Vuorinen A, Soini Y. Vimentin, zeb1 and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: association with an aggressive tumour phenotype. *Breast cancer Res Treat.* 2013;138:81-90.
17. Kimura W, Hirai I, Kimura S. Breast Preserving Mastectomy for the Breast Cancer. *Yamagata Med J.* 2002;20(2):41-58.
18. Pang H, Lu H, Song H, Meng Q, Zhao Y, Liu N, et al. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and beta-catenin in breast cancer. *Cancer epidemiol.* 2013;37:985-92.
19. O'Connor JW, Gomez EW. Biomechanics of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. *Clini Transl Med.* 2014;3:23.
20. Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100:139-48.
21. Tang D, Xu S, Zhang Q, Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Med Oncol.* 2012;29:526-33.

## Figure legends

Table 1. Characteristics of patients

Table 2 Clinicopathological variables of stromal ZEB-1 and tumor E-cadherin expression in breast invasive ductal carcinoma

Table 3. Univariate and Multivariate analyses of recurrence-free survival by COX proportional hazard model

CI confidence interval

Fig. 1

ZEB-1 の代表的な免疫組織化学染色像.

倍率,  $\times 20$  a 子宮癌肉腫 (ポジティブコントロール) ; 肉腫成分の腫瘍細胞が染色された. b 浸潤性乳管癌 ; 間質の紡錘型細胞が染色された c 腫瘍周囲の ZEB-1 陽性細胞 (Kimura. W - Shibata. K type infiltration).

Fig. 2

浸潤性乳管癌における細胞膜の E-cadherin 染色像.

倍率,  $\times 20$ ., a strong, b moderate, c weak, d 腫瘍の辺縁部の weak 像.

Fig. 3

腫瘍の辺縁部位と中心部位の E-cadherin 発現の比較の 1 例.

Fig. 4

それぞれの免疫組織化学染色による無再発生存率.

- ZEB-1 陽性群 vs. ZEB-1 陰性群 (5 年 83.2% vs. 95.8%,  $p = 0.036$ ).
- E-cadherin 減弱群 vs. E-cadherin 陽性群 (5 年 74.5% vs. 94.7%,  $p = 0.002$ ).
- ZEB-1 および E-cadherin 発現; ZEB-1 陽性かつ E-cadherin 減弱群, ZEB-1 陰性かつ E-cadherin 減弱群, ZEB-1 陽性かつ E-cadherin 陽性群, ZEB-1 陰性かつ E-cadherin 陽性群 (5 年 68.2, 88.9, 91.7, 97.4%).

Table 1. Characteristics of patients

| Patients              |                                   | n = 116 |
|-----------------------|-----------------------------------|---------|
| Sex, n (%)            |                                   |         |
| Male/Femal            | 0 (0%) / 116 (100%)               |         |
| Age                   | 58.5 ± 13.3 (32 - 88)             |         |
| T classification      |                                   |         |
| T1/T2/T3/T4           | 62 (54%)/ 45 (39%)/ 4 (3%)/ 5(4%) |         |
| Lymph node metastasis |                                   |         |
| Positive              | 37 (32%)                          |         |
| Negative              | 79 (68%)                          |         |
| TNM Stage             |                                   |         |
| I/II/III              | 51 (44%) / 58 (50%)/7 (6%)        |         |
| ER                    |                                   |         |
| Potitive              | 101 (87%)                         |         |
| Negative              | 15 (13%)                          |         |
| PgR                   |                                   |         |
| Potitive              | 86 (74%)                          |         |
| Negative              | 30 (26%)                          |         |
| HER2                  |                                   |         |
| Potitive              | 20 (17%)                          |         |
| Negative              | 96 (83%)                          |         |
| Triple negative       | 9 (8%)                            |         |
| Menoposal status      |                                   |         |
| Pre                   | 34 (29%)                          |         |
| Post                  | 82 (71%)                          |         |
| Operation             |                                   |         |
| Mastectomy            | 64 (45%)                          |         |
| Conservative surgery  | 52 (55%)                          |         |
| Axillar disection     |                                   |         |
| Axillar               | 105 (91%)                         |         |
| Sentinel node biopsy  | 7 (6%)                            |         |
| None                  | 4 (3%)                            |         |
| Systemic therapy      |                                   |         |
| Chemotherapy          | 45 (39%)                          |         |
| Trastuzumab           | 9 (8%)                            |         |
| Hormonal therapy      | 100 (86%)                         |         |
| None                  | 5 (4%)                            |         |
| Radiation             |                                   |         |
| Recurrence            | 36 (31%)                          |         |
| Died                  | 12 (10%)                          |         |
|                       | 5(4%)                             |         |

Table 2. Clinicopathological parameters of stromal ZEB-1 and tumor E-cadherin expression in invasive ductal breast carcinoma.

| Variable     | ZEB-1                  |                      |                      | E-cadherin            |                     | p-value      |
|--------------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
|              | Total no.<br>(n = 116) | positive<br>(n = 66) | negative<br>(n = 50) | preserved<br>(n = 82) | reduced<br>(n = 34) |              |
| Stage, n (%) |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| I            |                        | 25 (38)              | 26 (52)              | 38 (46)               | 13 (38)             | 0.705        |
| II           |                        | 36 (54)              | 22 (44)              | 39 (48)               | 19 (56)             |              |
| III          |                        | 5 (8)                | 2 (4)                | 5 (10)                | 2 (6)               |              |
| Lymph node   |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Positive     |                        | 25 (38)              | 12 (24)              | 23 (28)               | 14 (41)             | 0.172        |
| Negative     |                        | 41 (62)              | 38 (76)              | 59 (72)               | 20 (59)             |              |
| ER           |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Positive     |                        | 56 (85)              | 45 (90)              | 76 (93)               | 25 (77)             | <b>0.008</b> |
| Negative     |                        | 10 (15)              | 5 (10)               | 6 (7)                 | 9 (23)              |              |
| PgR          |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Positive     |                        | 46 (70)              | 40 (80)              | 63 (77)               | 23 (67)             | 0.31         |
| Negative     |                        | 20 (30)              | 10 (20)              | 19 (23)               | 11 (33)             |              |
| HER2         |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Positive     |                        | 15 (23)              | 5 (10)               | 14 (17)               | 6 (18)              | 0.941        |
| Negative     |                        | 51 (77)              | 45 (90)              | 68 (83)               | 28 (82)             |              |
| TN           |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Yes          |                        | 5 (8)                | 4 (8)                | 2 (2)                 | 7 (21)              | <b>0.002</b> |
| Other        |                        | 61 (92)              | 46 (92)              | 80 (98)               | 27 (79)             |              |
| Recurrence   |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Absent       |                        | 56 (85)              | 48 (96)              | 78 (95)               | 26 (76)             | <b>0.004</b> |
| Present      |                        | 10 (15)              | 2 (4)                | 4 (5)                 | 8 (24)              |              |
| ZEB-1        |                        |                      |                      |                       |                     |              |
| Positive     |                        |                      |                      | 42 (51)               | 24 (71)             | 0.052        |
| Negative     |                        |                      |                      | 40 (49)               | 10 (29)             |              |

Table 3. Univariate and multivariate analyses of recurrence-free survival using Cox proportional hazard model.

| Variables             | Univariate   |             |         | Multivariate |             |         |
|-----------------------|--------------|-------------|---------|--------------|-------------|---------|
|                       | Hazard ratio | 95%CI       | p-value | Hazard ratio | 95%CI       | p-value |
| Tumor size > 2cm      | 14.75        | 2.87-269.53 | 0.0003  | 8.24         | 1.50-153.88 | 0.011   |
| HER2 positive         | 4.03         | 1.19-12.66  | 0.027   | 2.17         | 0.65-8.45   | 0.213   |
| Lymph node metastasis | 4.66         | 1.47-17.46  | 0.009   | 3.58         | 0.99-12.56  | 0.052   |
| positive ZEB-1        | 4.42         | 1.16-28.72  | 0.027   | 2.32         | 0.53-16.08  | 0.280   |
| reduced E-cadherin    | 5.37         | 1.69-20.15  | 0.004   | 3.62         | 1.03-15.05  | 0.045   |

CI, confidence interval



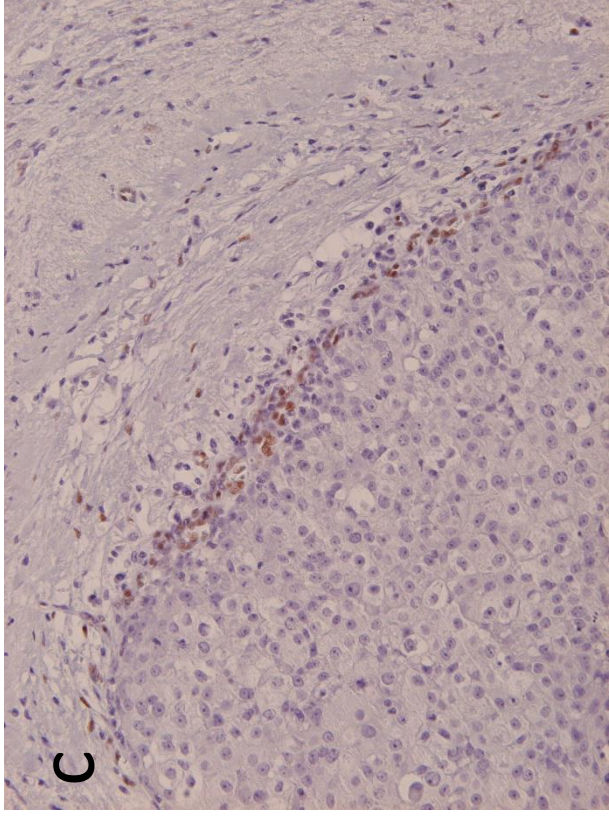
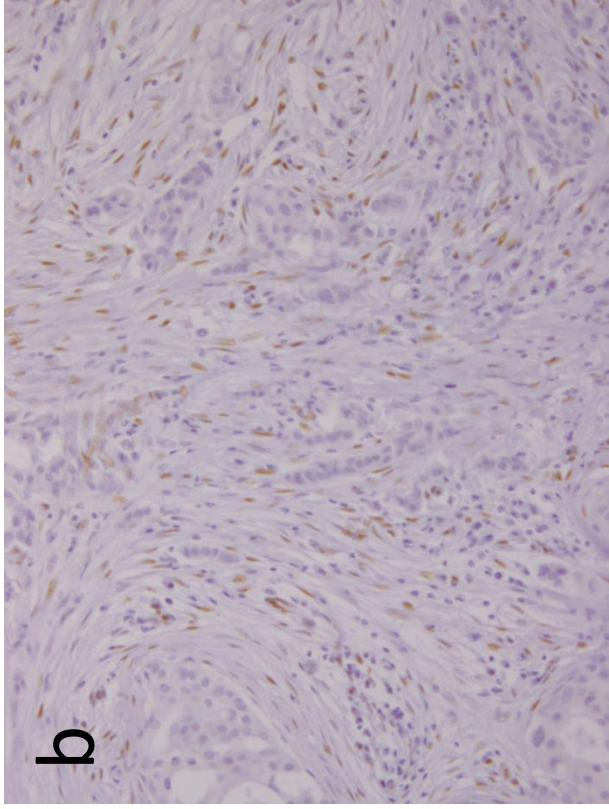
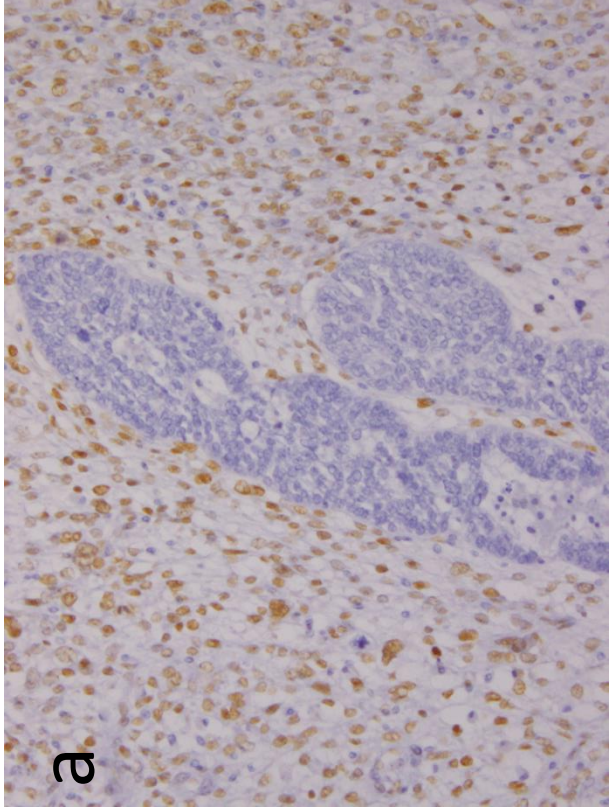


Fig. 1 ZEB-1の代表的な免疫組織化学染色像.

倍率, × 20

a 子宮癌肉腫(ポジティブコントロール); 肉腫成分の腫瘍細胞が染色された.

b 浸潤性乳管癌; 間質の紡錘型細胞が染色された.

c 腫瘍周囲のZEB-1陽性細胞 (Kimura. W - Shibata. K type infiltration).



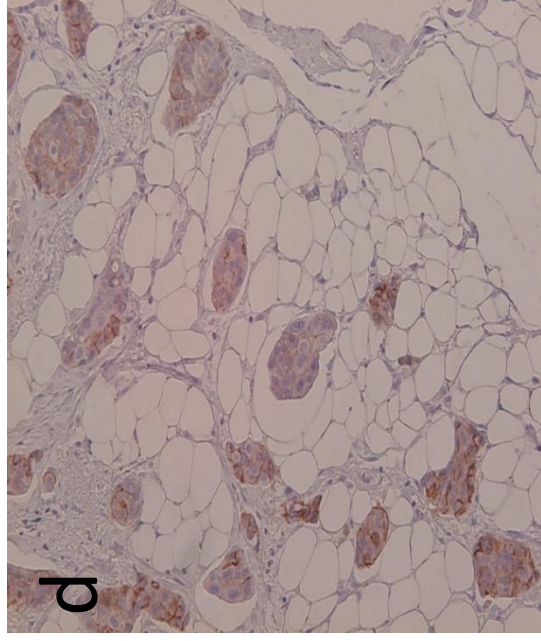
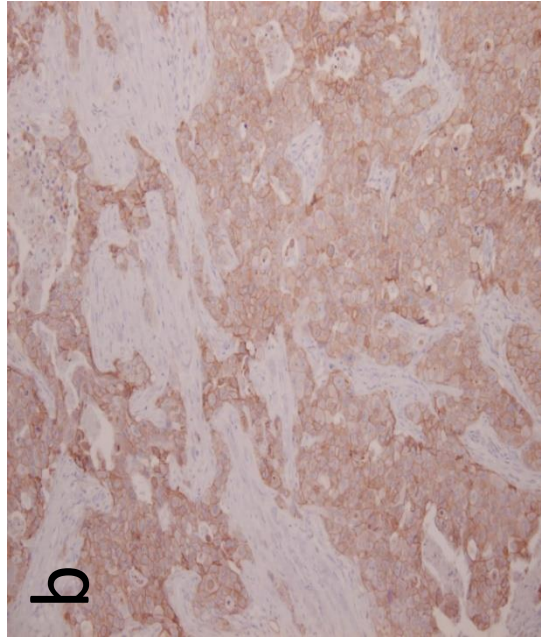
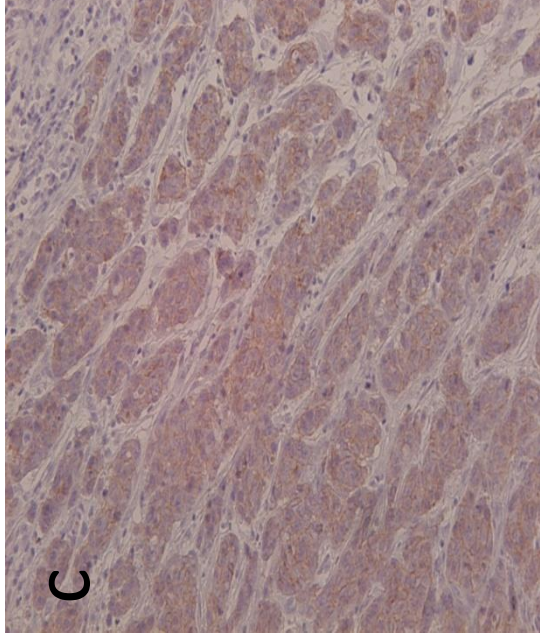
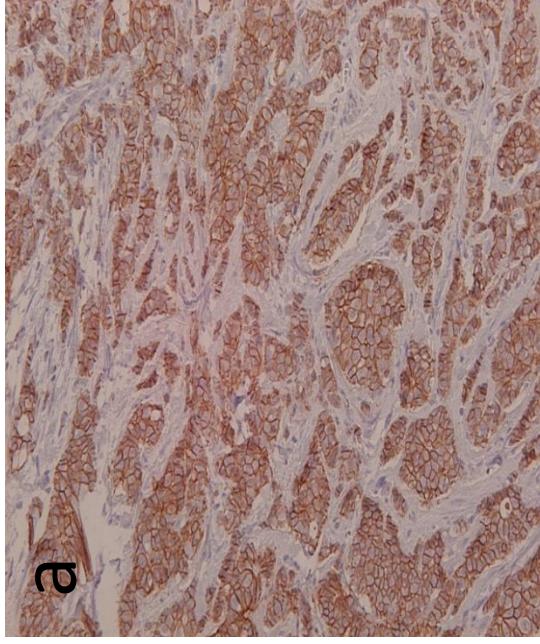
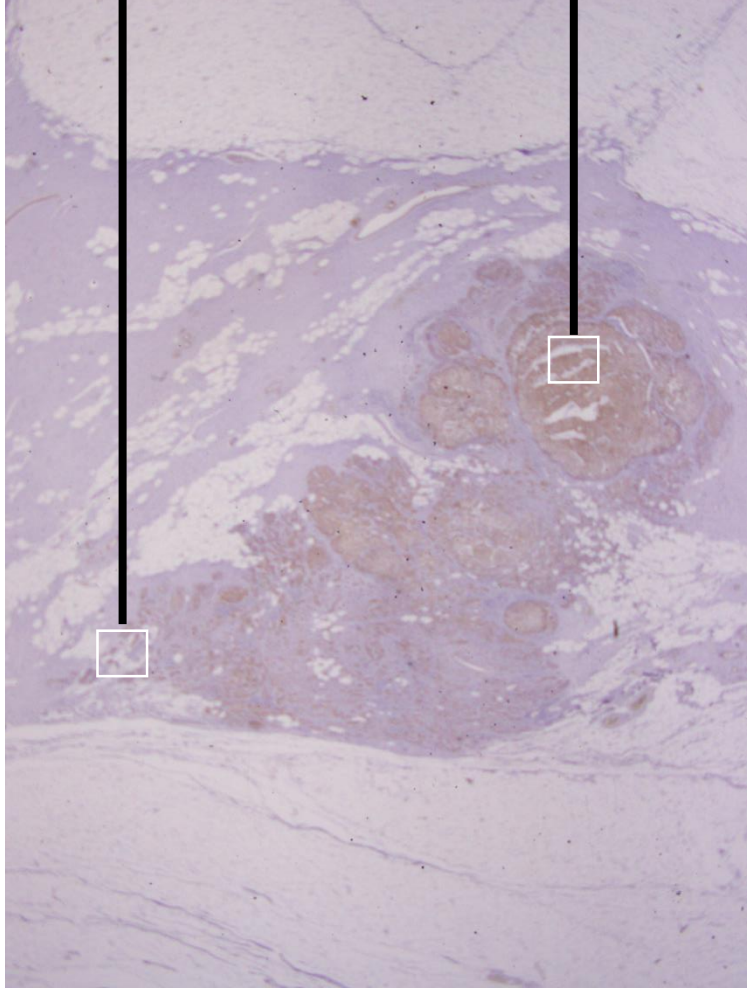


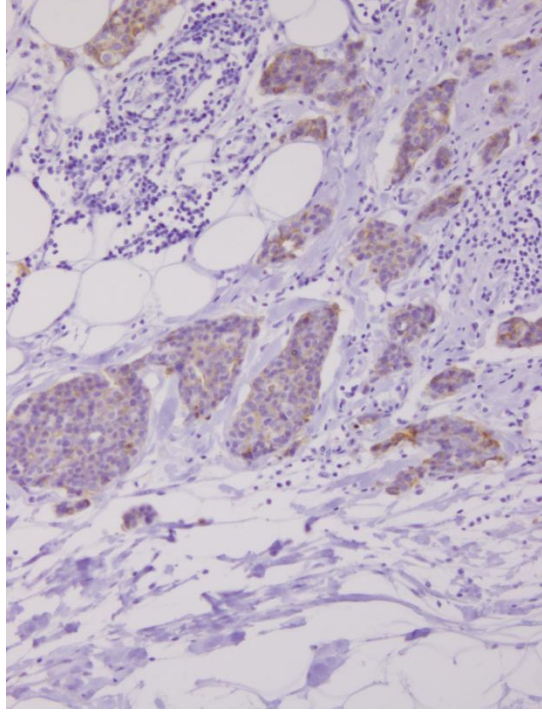
Fig. 2  
 浸潤性乳管癌における細胞膜のE-cadherin染色像.  
 倍率, × 20. a strong, b moderate, c weak, d 腫瘍の辺縁部のweak像.



## 腫瘍全体



末梢部位, × 20, weak staining



中心部位, × 20, strong staining

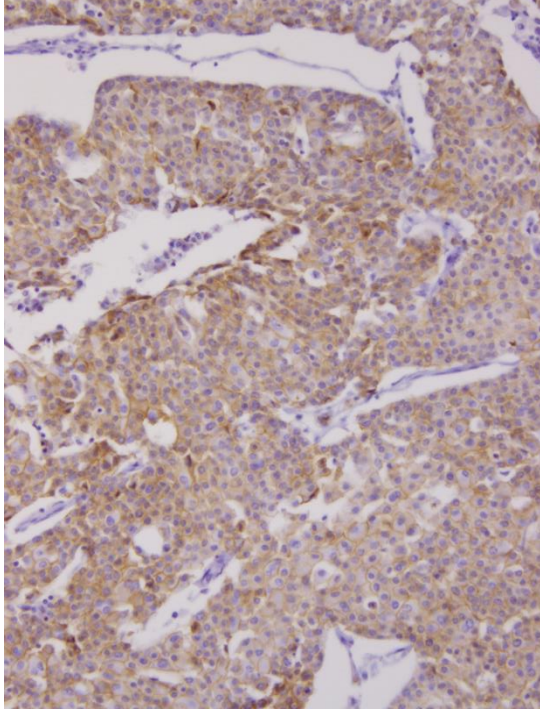


Fig. 3  
腫瘍の辺縁部位と中心部位のE-cadherin発現の比較の1例.

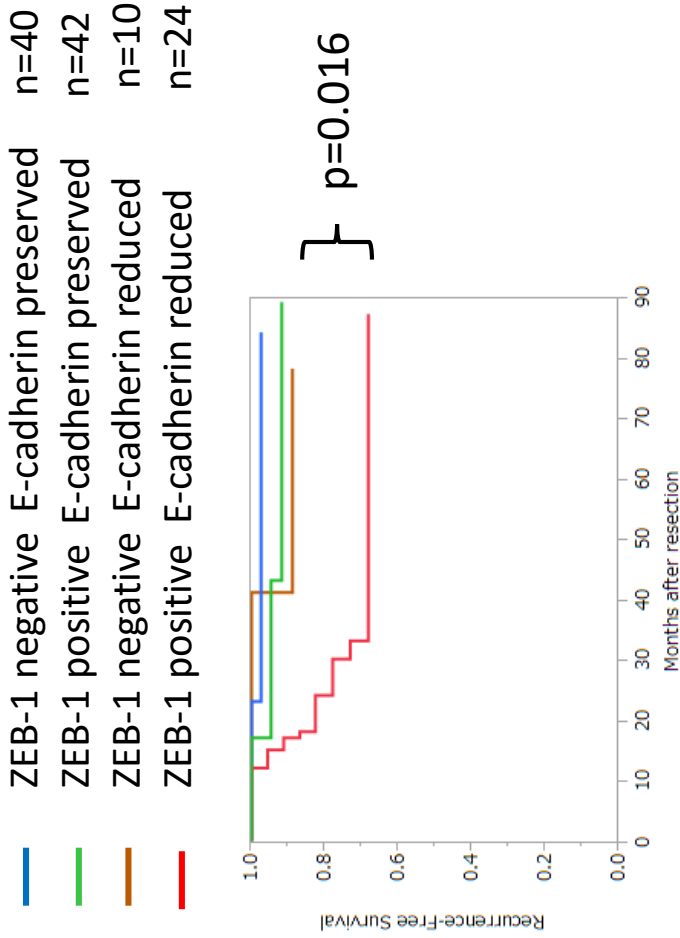
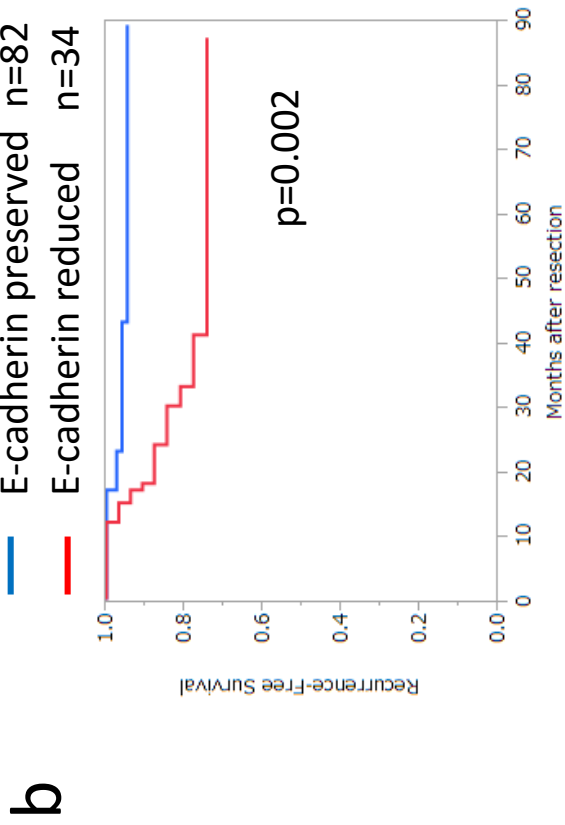
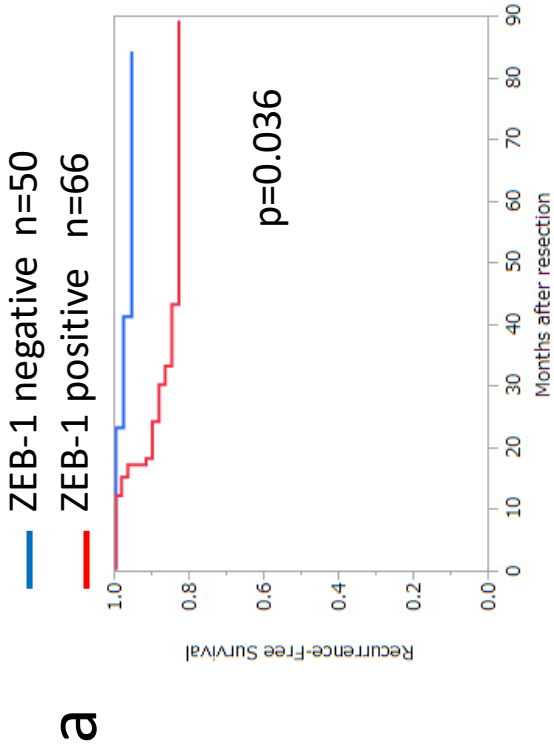


Fig. 4 それぞれの免疫組織化学染色による無再発生存率.

a. ZEB-1陽性群 vs. ZEB-1陰性群 (5年 83.2% vs. 95.8%,  $p = 0.036$ ).

b. E-cadherin減弱群 vs. E-cadherin陽性群 (5年74.5% vs. 94.7%,  $p = 0.002$ ).

c. ZEB-1 およびE-cadherin 発現 ; ZEB-1陽性かつE-cadherin 減弱群, ZEB-1陰性かつE-cadherin 陽性群, ZEB-1 陰性かつE-cadherin陽性群 (5年 68.2, 88.9, 91.7, 97.4%).