

乳癌における中心体構成蛋白質

ペリセントリン異常発現の病理学的意義について

の研究

かとう きみ
加藤 貴美

(病理学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

目次

第1章 序文	1
(1) 乳癌の分類	1
(2) 細胞分裂と中心体	2
(3) 染色体不安定性と中心体増幅	3
(4) 目的	3
第2章 対象と方法	5
(1) 対象症例	5
(2) 病理所見, 臨床所見の調査	6
(3) 未固定凍結組織の捺印標本に対する免疫細胞染色/免疫蛍光染色(ICC/IF)法によるペリセントリン発現の観察と評価	6
(4) 免疫組織化学(IHC)法によるペリセントリンの観察と評価	7
(5) 臨床的サブタイプ分類	8
(6) ICC/IF 法と IHC 法の計測結果の相関性	9
(7) 核 DNA 量の評価	9
(i) Feulgen 反応	9
(ii) FISH 法	10
(8) ペリセントリン spot 変化と乳癌悪性度の関係	12
(9) 統計学的手法	13
第3章 結果	14
(1) 患者背景	14
(2) ICC/IF 法によるペリセントリンの評価	14
(3) IHC 法によるペリセントリンの評価	14
(4) ICC/IF 法と IHC 法によるペリセントリン評価結果の対応	15

(5) Feulgen 反応による核 DNA 量の評価.....	15
(6) X 染色体セントロメア領域の異常の評価.....	16
(7) Feulgen 反応と FISH 法の相関.....	16
(8) ペリセントリン spot 変化と乳癌の核 DNA 量パターン, 臨床病理学的指標, 及び患者予後との関連.....	17
(i) 核 DNA 量パターンとの関連.....	17
(ii) 臨床病理学的指標との関連.....	18
(iii) 予後との関連.....	19
(iv) 化学療法の有無による予後との関連.....	20
(v) 再発例の詳細.....	21
第4章 考察.....	23
(1) ペリセントリン発現異常の免疫組織化学的な評価方法の確立について.....	23
(2) ペリセントリン発現異常と乳癌の染色体不安定性の関連について.....	24
(3) 乳癌サブタイプごとのペリセントリン発現異常について.....	25
(4) ペリセントリン発現異常の予後因子, 治療効果予測因子としての意義について.....	25
第5章 結論.....	28
謝辞.....	29
略語一覧.....	30
引用文献.....	31

第1章 序文

(1) 乳癌の分類

乳癌は女性の部位別がん罹患率第一位であり, 30代前半から罹患率が急増し, 予後や薬物感受性に関する関心が高い疾患の一つである(1)。乳癌の診療では, 腫瘍浸潤径, 腋窩リンパ節転移状況, 組織型分類, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 状況等が重要であるが, 特に遺伝子発現プロファイリングに基づく intrinsic subtype 分類は予後や薬物感受性と関連するため治療法選択において有用である(2, 3)。しかし乳癌全例に遺伝子発現プロファイリングを行うのは現実的ではないため, 2011年以降のザンクトガレンコンセンサス会議で病理学的 ER, PgR, HER2, Ki-67 labeling index (LI) 状況や多遺伝子アッセイによる細胞増殖性の状況, さらには腫瘍浸潤径, リンパ節転移の状態, 脈管侵襲, 組織型とグレード分類に基づく代替定義を用いることが提唱された(4-6)。現在の日常診療では ER/PgR 陽性かつ HER2 陰性の乳癌のうち, 予後良好な生物学的悪性度の低い例, 例えば Ki-67 LI の低い例や PgR 高値の例などを luminal A-like breast cancer (luminal A-like BC), 予後がより不良な悪性度の高い例を luminal B-like BC に分類し, 薬物療法の治療計画が立てられることが多い(7)。病理学的に ER, PgR, HER2 いずれも陰性の乳癌は triple-negative breast cancer (TNBC) と総称され, ホルモン受容体陽性乳癌に比べて予後が不良であることが知られている。TNBC には遺伝子発現プロファイリング上, cytokeratin (CK)5/6 や CK14, epidermal growth factor receptor (EGFR) などの発現を示す basal-like type の乳癌が多いとされる。しかしながら, basal-like type 以外にも apocrine 分化を示す例や肉腫様プロファイルを示す例など複数のサブタイプが含まれており生物学的特性は多彩と考えられ(8), 現在も様々な分子や病理学的情報に基づくさらなる予後や治療反応性と関連する分類の試みが続いている。

(2) 細胞分裂と中心体

細胞の有糸分裂では合成期(synthesis phase, S 期)に DNA が複製して倍加した染色体が分裂期(mitotic phase, M 期)に等しく分配される。S 期と M 期を隔て、細胞の成長や分裂に関わる各因子を調整する時期をギャップ期(gap phase)といい、S 期の前を gap 1(G1)期、M 期の前を gap 2(G2)期と呼ぶ。M 期の染色体分配に関わる機能的装置のことを紡錘体といい、双極に配列する M 期紡錘体は、複製された 2 組の染色体を 1 組ずつ各々の極に引っ張って娘細胞の核が形成される。紡錘体は、染色体を引っ張る役割を担う微小管を基本構造としている。ヒトを含む多くの動物ではこの紡錘体微小管を形成する中心として中心体(centrosome)が存在し、紡錘体の位置決定の役割も担っている。中心体は G1 後期から S 期にかけて複製が開始され 2 個になるが、M 期までは互いに結合している。M 期に入ると複製された 2 個の中心体が解離して双極に移動する。染色体の分配の後、2 個の娘細胞には各々 1 つずつ中心体が含まれることになる。この中心体の正確な複製、移動、染色体の分配といった一連の機能に問題が生じると、染色体分配に不均衡が生じる。

中心体は、2 個の筒状の中心小体(centriole)と、それらを囲む高密度な蛋白質の複合体である中心小体周辺物質(pericentriolar material, PCM)から構成されている。細胞周期における中心体の複製・移動のサイクルは、中心小体自体の複製や結合・解離などによって制御されている。PCM は中心小体の変化に必要な蛋白質や、微小管形成中心として必要な γ -チューブリン環複合体(γ -tubulin ring complex, γ -TuRC)を多く含んでいる。すなわち、中心体の正確な複製サイクルと位置決定は中心小体が制御し、微小管形成中心としての機能を支えるのが PCM であるが、PCM の構成蛋白質や機能にはまだ不明な点もある。

ペリセントリンは γ -チューブリンなどとともに PCM の主な構成成分となる蛋白質ファミリーで、他の PCM 成分を結合させ固定している。 γ -TuRC と直接または間接的に結合するほか、複数の酵素と間接的に結合して制御酵素を特定の基質に導くとも考えられている(9)。また、ペリセントリンは γ -チューブリンなどとともに中心体マーカーとして研

究面で用いられている。

(3) 染色体不安定性と中心体増幅

染色体の1本全体の数が変化した状態を異数性といい、染色体の数や構造の変化が蓄積、亢進する状態のことを染色体不安定性という。染色体不安定性はゲノム不安定性の一形態をさす包括的な概念である。複数の原因と結果が想定されるためその測定法も多様である(10)。有糸分裂異常に注目した測定法においては、しばしば複数の染色体のセントロメア領域の蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization, FISH)法による変化率や、有糸分裂細胞像における多極有糸分裂像の割合などで算出される(11, 12)。

中心体増幅とは中心体の構造的変化と機能的変化の総称である。中心体増幅は動物細胞やヒト体細胞の腫瘍培養細胞、及び患者の癌細胞などの様々な対象と規模で研究されている。構造変化の多くは中心小体の構造に言及されているが、中心小体を含まないPCMの紡錘体形成能に関する記載もある(11, 13-17)。染色体不安定性、すなわち染色体の数や構造変化の蓄積は、細胞分裂に中心的な役割を担う中心体増幅と相関がある。

ヒトのがんの8割以上、乳癌検体の84.5%で染色体数が通常と異なる異数性がみられるとのデータがある(18)。乳癌に関しては、TNBC, basal-like type 乳癌において中心体増幅や染色体不安定性との関連が報告され、中心体増幅群は悪性度が高く予後不良であることが示された(11, 16, 19, 20)。

異常な中心体を有する癌細胞は、細胞分裂が失敗すれば細胞死に陥るはずであるが、このような癌細胞が自律的に増殖するためには、増幅した中心体が集まって極を形成し、紡錘体機能を維持するクラスタリングという機構が重要であると判ってきている(19, 21-24)。

(4) 目的

本研究では乳癌の中で予後不良群である TNBC について、予後良好群とされる luminal

A-like BC との比較対照により中心体増幅の観点から生物学的特性を明らかにすることを目的とした。中心体マーカーであるペリセントリンの発現異常について免疫細胞学的, 免疫組織化学的検討と評価法も検討した。その上で, ペリセントリン発現異常と核 DNA 量, 染色体数の変化からみた染色体不安定性との関連, さらに乳癌の臨床病理学的特徴や予後との関連について検討した。また, 従来, 中心体の観察は培養細胞による観察が多く, 手術検体を用いた報告でも組織マイクロアレイや少数例の検討, 電子顕微鏡・共焦点顕微鏡や免疫細胞染色/免疫蛍光染色(immunocytochemistry/immunofluorescence, ICC/IF)法による観察が一般的である。そこで, 今回は多症例の臨床情報の活用, 広範囲な組織像の観察, 長期間保存可能で一般検査室でも可能な免疫組織化学(immunohistochemistry, IHC)法のプロトコルを確立し, 組織マイクロアレイではなく手術材料の組織ブロックを用いて広範囲の組織を評価することも着眼とした。

第2章 対象と方法

(1) 対象症例

本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得たのちに行われた(承認番号 4746)。2002年から2019年に防衛医科大学校病院で初回手術が施行された浸潤性乳癌 1152例のうち、TNBCは153例、luminal A-like BCは412例であった。Stage IIIb, IIIcの局所進行乳癌、Stage IVの転移性乳癌、術前薬物療法施行例、十分な治療情報が得られない症例、浸潤径が1 mm以下の症例を除外したTNBC 126例、luminal A-like BC 358例の中から以下の手順で抽出したTNBC 55例とluminal A-like BC 55例を対象とした。まず未固定凍結検体については、2012年以降の症例に対して術前インフォームドコンセントを得たのち手術による摘出検体から診断に差し支えない部位、量の腫瘍部と非腫瘍部を採取し2-3 mm角の組織片として-80°Cに凍結しており、研究に十分な量と質の未固定凍結組織としてTNBC 19例とluminal A-like BC 27例、計46例が得られた。ホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)組織は上記の46例に加え、FFPE組織ブロックだけが評価可能なTNBC 36例とluminal A-like BC 28例を2002年から手術年月日順に追加した。FFPEについても術前に研究目的の使用についてインフォームドコンセントを得たのち、防衛医科大学校病院検査部に保存されていた残余組織を今回の検討に用いた。非腫瘍部については、未固定凍結検体は観察期間内に集積した症例の中から対象例2例の非腫瘍部と、組織内に腫瘍が含まれていなかったため対象外となった5例の非腫瘍部、計7例を用いた。7例の年齢の平均値と標準偏差(standard deviation, SD)は50.3歳(±10.0 SD)であった。FFPE組織の非腫瘍部は、対象症例のうち腫瘍組織と同一切片上で腫瘍組織と充分離れた部位に非腫瘍性乳管を多く含んでいた10例を用いた。10例の年齢の平均値とSDは59.7歳(±11.3 SD)であった。

(2) 病理所見, 臨床所見の調査

過去の FFPE 組織ブロックから症例ごとに代表的なブロック 1 個を選出し, 4 μm の厚さの組織切片を作製して hematoxylin-eosin(HE)染色を施行し, 2 名の病理医で組織型, Nuclear Grade (NG)を確認した。NG は乳癌取り扱い規約第 18 版に基づいて核異型スコアと核分裂像スコアの合計によって評価し, NG1, NG2, NG3 の 3 段階で評価した(25)。また電子カルテや病理診断システムのデータベースから対象患者の年齢, 術式, 組織型, 浸潤径 (pT 因子), リンパ節転移の状況 (pN 因子), リンパ管侵襲の有無, Ki-67 LI, 術後薬物療法, 転移再発部位について調査を行った。

(3) 未固定凍結組織の捺印標本に対する免疫細胞染色/免疫蛍光染色(ICC/IF)法によるペリセントリン発現の観察と評価

TNBC 19 例と luminal A-like BC 27 例の未固定凍結組織片を氷上融解し, 剥離防止加工スライドガラス CREST adhesive coated slides(Matsunami, Osaka, Japan)に細胞を捺印後, 直ちに 4%パラホルムアルデヒドで 7 分間室温にて湿固定した。

ICC/IF の手順は 1 次抗体メーカー推奨条件に準じて施行した。0.2%Triton X-100(Sigma-Aldrich, St. Louis, M.O., U.S.A.)で室温にて 5 分間静置後, 非特異的結合を 0.4 %Block Ace 粉末(KAC, Kyoto, Japan)で室温にて 10 分間ブロッキングし, 抗ペリセントリンウサギポリクローナル抗体(ab4448, Abcam, Cambridge, U.K., 希釈率 1: 1000)を 37°Cで 30 分間反応させた。蛍光二次抗体として Alexa fluor 488(Cell Signaling, Danvers, M.A., U.S.A.)を室温にて 30 分間反応させた後, ProLong Diamond Antifade Mountant with 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, M.A., U.S.A.)で封入した。陽性コントロールに非腫瘍性乳腺組織を, 陰性コントロールに 1 次抗体を載せない切片を用いた。

ICC/IF 法によるペリセントリンの観察には、Leica DM 5000B 蛍光顕微鏡(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)と画像閲覧ソフトウェア(Leica Application Suite X, Leica Microsystems)を使用した。標本観察は対物 60 倍または 100 倍レンズを用いた。細胞重複が目立たない箇所、細胞質内のペリセントリン陽性箇所、他の陽性箇所と不連続なものを”spot”として、細胞あたりの spot 数を計測した(Figure 1A, B)。非腫瘍性乳管上皮細胞、luminal A-like BC、TNBC の各群で 3 個以上の spot がみられる細胞の出現割合を以下の式で症例ごとに算出した。

$$\text{spot 数増加} (\geq 3 \text{ 個}) \text{ 細胞の出現割合} (\%) = \frac{\text{3 個以上の spot を保有する細胞数}}{\text{計測細胞数}} \times 100$$

細胞あたりの細胞質内ペリセントリン spot 数を、各症例最大 100 細胞まで計測したが、100 細胞に満たない症例も対象に含めた。

(4) 免疫組織化学(IHC)法によるペリセントリンの観察と評価

FFPE から 4 μ m の厚さに薄切した切片を脱パラフィン後、10mM Tris-1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)(pH 9.0)溶液内で、オートクレーブにて 121°C10 分間抗原賦活化した。常温に戻した後、3%過酸化水素水で 10 分間内因性ペルオキシターゼ除去を行った。0.4% Block Ace 粉末(KAC)で室温にて 1 時間ブロッキングを行った後、抗ペリセントリンウサギポリクローナル抗体(ab4448, Abcam, 希釈率 1: 500)を 4°C一晩反応させた。イムノポリマー法による 2 次抗体(EnVision+ System-HRP labelled Polymer, Dako, Glostrup, Denmark)で 30 分間室温にて反応させた。特異的抗原反応の可視化は 0.02%ジアミノベンジジン四塩酸塩と過酸化水素水を用い、対比染色として Carrazzi ヘマトキシリンを用いた。陽性コントロールは内部コントロールとして非腫瘍性乳管上皮細胞、陰性コントロールには 1 次抗体を載せない切片を用いた。

IHC 法によるペリセントリンの観察、及び評価には NanoZoomer-SQ (Hamamatsu

Photonics, Hamamatsu, Japan)と画像閲覧ソフトウェア(NDP.view2, Hamamatsu Photonics)を使用した。40xモード撮影, 21.5インチ画面上80x表示設定により細胞質内のペリセントリン陽性領域を“spot”として, 数と大きさを評価した(Figure 2)。まず, 10症例につき対照として腫瘍と同一切片上で腫瘍から充分離れた位置にある非腫瘍性乳管上皮細胞100個のspotを各々計測した(Figure 2A, B)。その上で腫瘍細胞を観察し, 対照細胞に比べて腫瘍細胞に特徴的な所見としてspotの数と大きさの増加に着目した。数の増加は腫瘍細胞あたり3spots以上のペリセントリンの発現とした。大きさの増加については, 非腫瘍性乳管上皮細胞のspot長径の平均値とSDを求め, 平均値+3SDを基準に, 整数値の $2\mu\text{m}$ をcutoff値として, 1spotあたり長径 $2\mu\text{m}$ 以上のペリセントリンの発現とした。これらの基準の下に腫瘍毎に, 中心体の数と大きさの増加を含む中心体増幅細胞割合を以下の式にて算出した。

中心体増幅細胞割合(%)

$$= \frac{\{(数の増加)かつ/または(大きさの増加)がみられる\text{ spot を保有する細胞数}\}}{\text{症例当たりの計測細胞数}} \times 100$$

各症例200個の癌細胞につき, 細胞あたりの細胞質内ペリセントリンspot数と長径 $2\mu\text{m}$ 以上のspotを保有する細胞数を計測した。計測は1名が200細胞を計測し, 他の1名がダブルチェックを実施した。観察者間の計測結果不一致症例はディスカッションによりコンセンサスを得, 必要に応じて追加計測を行った。

(5) 臨床的サブタイプ分類

臨床的サブタイプ分類は2017年のザンクトガレンコンセンサス会議に基づいて定義した(7)。ER, PgRはAllred scoreにより評価し, 陽性腫瘍細胞が計測腫瘍細胞の1%以上を陽性, 1%未満を陰性とした(7, 26)。HER2は米国臨床腫瘍学会/米国病理学会(American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists, ASCO/CAP)ガイドライン

2018 に基づいて, 0, 1+, 2+, 3+の 4 段階で評価を行い, IHC3+と, IHC2+かつ FISH 法陽性例を HER2 陽性, それ以外は陰性と判断した(27)。Ki-67 LI は各腫瘍の平均的な個所を選び, 500 個以上の核を計測して陽性細胞率を計測した。TNBC は ER/PgR の両方が IHC 法にて陰性かつ HER2 陰性と定義した。Luminal A-like BC はホルモン受容体陽性/HER2 陰性乳癌のうち, ホルモン受容体高発現かつ低増殖能と考えられる, ER が Allred score 6 以上かつ Ki-67 LI 14%未満の乳癌と定義した(26, 28, 29)。HE 染色と D2-40 を併用してリンパ管侵襲の有無を確認した。

対象の各症例の HE 染色切片と同じ FFPE ブロックから, 4 μ m の厚さの連続切片を作製して Ki-67, D2-40 の IHC 染色を施行した。本研究で用いられた試薬, 及び 1 次抗体ごとの染色条件を示す(Table 1)。2011 年以降の ER, PgR, 及び 2013 年以降の HER2 の評価は防衛医科大学校病院検査部にて日常診断にて染色された切片に対して実施し, それ以外の IHC 法の検討は病態病理学講座で実施した。

(6) ICC/IF 法と IHC 法の計測結果の相関性

ICC/IF 法では, 未固定凍結標本を用い, 細胞全体のペリセントリンを観察できるが, IHC 法は 4 μ m 薄切切片の評価であり細胞全体の評価が困難である。一方で, IHC 法は FFPE を用いるため汎用性がある。IHC 法が ICC/IF 法による spot 数増加細胞出現割合に対応するか否かを検討する目的で, 両法による spot 数増加細胞出現割合の平均値以上の症例と平均値未満の症例が有意に対応するか否かを解析した。

(7) 核 DNA 量の評価

(i) Feulgen 反応

TNBC 55 例と luminal A-like BC 10 例に関する核 DNA 量測定目的で, Feulgen 反応を施行した。FFPE 組織ブロックを 4 μ m の厚さに薄切した切片を用いた。脱パラフィン

後, 1N 塩酸により 60°C 10 分間加水分解し, Schiff 試薬(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)で室温にて 60 分間反応させ可視化した。

Feulgen 反応による核 DNA 量の計測には KEYENCE BZ-X710 All in One 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan)と画像解析ソフトウェア(BZ-X analyzer, Keyence)を用いた。画像解析ソフトウェアにて選択した領域に個別の番号を付与し, 選択領域内の積算輝度をそれぞれ測定した。対物 40x レンズの撮影画像で腫瘍細胞核と非腫瘍細胞核の各々 500 個以上を測定対象とした(Figure 3A)。

核 DNA 量は X 軸に DNA index, Y 軸に細胞比率(%)を用いたヒストグラムで評価した。DNA index は対象の核 DNA 量における G0/G1 ピークを, 同一条件で測定した二倍体細胞の DNA 量で除した値で定義される。本研究では二倍体細胞として腫瘍と同一切片上の非腫瘍細胞を用い, DNA index が 0.8 以上, 1.2 未満($0.8 < 1.2$, 以下同様)の区域に含まれる細胞を 2c の DNA diploid として各症例の DNA index を設定した(30, 31)。本研究では, DNA index に対応する X 軸を, 2c($0.8 < 1.2$), 2cH($1.2 < 1.4$), 3c($1.4 < 1.6$), near 4c($1.6 < 2.4$), over 4c($2.4 -$)の 5 区域に分け, 2c と 2cH を near 2c($0.8 < 1.4$)と定義した(Figure 3B)。ヒストグラムの bin 幅は $\text{DNA index} | 0.2 |$ とした。G0/G1 ピークはヒストグラム上で細胞比率 5%以上かつ両隣の bin より高い細胞比率を示す bin とし, G0/G1 ピークが単独の場合はその bin を最大ピーク, 複数ピークを有する場合は最も細胞比率が高い G0/G1 ピークを最大ピークとした。核 DNA 量の評価項目として, (a)最大ピークの DNA index の区域, (b)最大ピークが占める細胞比率, (c)複数ピークの有無, (d)細胞比率に関わらず G0/G1 ピークをつくる DNA index の最大区域の 4 項目で行った(Figure 3 B, C)。

(ii) FISH 法

乳癌において X 染色体に数的変化がある症例の 88%(276/312)が染色体数も 46 以外であるというデータがある(32, 33)。そこで, X 染色体の数的異常を核 DNA 量変化の代替指

標の一つとして 19 例の TNBC において検討した。

未固定凍結検体を有する TNBC 19 例について、染色体不安定性の検索として FISH 法による X 染色体セントロメア領域(CEP X)の DNA コピー数を計測した。プローブには CEP X SpectrumOrange/ Y SpectrumGreen DNA Probe Kit(Abbott, Chicago, IL, U.S.A.)を用いた。

ICC/IF 同様に捺印標本を作製し、風乾後、95%エタノールで 20 分間室温にて固定した。再風乾後、前処理として、2 × Saline-sodium citrate buffer(SSC)で 73°C 2 分間、プロテアーゼ溶液で 37°C 10 分間反応、再固定、脱水、風乾させた。70 %ホルムアミド/2×SSC (pH 7.0)で 73°C 3 分間 DNA を変性させ、室温にて振盪しながら洗浄・脱水、45°Cにてスライドウォーマーで乾燥・加温した切片に蛍光標識されたプローブ溶液 CEP X/Y DNA Probe(Abbott)を 3 μ L 添加し、カバーガラスの処置をして 42°C 20 時間ハイブリダイゼーションした。73 °Cの 0.4×SSC, 室温の 2×SSC/0.1 % NP-40, 室温の 2×SSC の順で洗浄し、脱水、乾燥、DAPI 含有封入剤で封入した。

X 染色体の観察と撮影は KEYENCE BZ-X710 All in One 蛍光顕微鏡(Keyence)を用いた。腫瘍と同一切片上の非腫瘍細胞、合計 100 細胞の CEP X のコピー数の平均値と標準偏差を求め、平均値 \pm 2SD を cutoff 値とした。cutoff 値を超える数の異常コピー数がみられた症例を X 染色体セントロメア領域に異常あり、cutoff 値以内であった症例はセントロメア領域に異常なしと判定した。

コピー数の計測は画像上の目視で細胞あたりのコピー数を計測して行い、正常細胞は 1 名の観察者が症例によらず合計 100 細胞を、対象の癌細胞は 2 名の観察者が症例あたり 20 細胞を各々盲検的に評価した合計 40 細胞の計測値を用いた。

4 μ m 薄切切片を用いる Feulgen 反応による核 DNA 量評価の検索も、IHC 法と同様に観察範囲の制限がある。Feulgen 反応による核 DNA 量評価の正当性検証のため、DNA index と FISH 法との相関を調べた。

(8) ペリセントリン spot 変化と乳癌悪性度の関係

ペリセントリン spot 変化と乳癌悪性度の関係を調査する目的で、方法(4)で定義したペリセントリン spot 変化に関わる3つの変数、ペリセントリン spot の「数/(かつ/または)大きさ」の増加、「数」の増加、「大きさ」の増加のうち、再発と相関のある変数を用いた。55例の TNBC の再発に関して、各々の変数が増加した spot を保有する細胞割合の receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成し、「数/大きさ」では cutoff 値 23% (AUC = 0.803), 「大きさ」では cutoff 値 13% (AUC = 0.862) を設定した (Figure 4A, B)。なお、ペリセントリン spot の「数」についても ROC 曲線を作成したが、AUC < 0.6 のため cutoff 値を設けなかった (Figure 4C)。それぞれの分類において、cutoff 値以上を高値群、cutoff 値未満を低値群として 110 例の乳癌を 2 群に分け、臨床病理学的因子を評価した。同様に TNBC 55 例についても同 cutoff 値を用いて各群を比較した。評価項目には患者背景として手術時の年齢と術後療法、悪性度の指標として腫瘍浸潤径、リンパ節転移個数、脈管侵襲、NG, Ki-67 LI, サブタイプ分類、組織型分類を用いた。染色体不安定性との関係には Feulgen 反応による核 DNA 量の評価項目を用いた。

予後の評価には無再発生存期間 (recurrence-free survival; RFS), 及び原病死のみをイベントとした疾患特異的生存期間 (disease-specific survival; DSS) を調査した。初めに乳癌 110 例において生存時間分析、単変量解析、多変量解析によって上記「数/大きさ」, 「大きさ」の各々について予後因子としての検討を行った。TNBC 55 例においても同様の検討を実施した。次に、「数/大きさ」, 「大きさ」が術後化学療法の効果予測因子となり得るかを推測する目的で、事情によって術後化学療法が施行されなかった 19 例と術後化学療法が行われた 31 例の各々について「数/大きさ」もしくは「大きさ」の変数で階層化し、予後解析を行った。同様に、後者の 31 例の中で、タキサンを含むレジメンが用いられた 22 例と EC (epirubicin and cyclophosphamide therapy) のみのレジメンが用いられた 9 例につ

いても予後解析を行った。

(9) 統計学的手法

統計学的処理は JMP Pro 16(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)ソフトを用いた。2 群間の発現頻度の差の検定には Fisher の正確確率検定を用いた。中心体増幅細胞割合と CEP X のコピー数の関係には, Wilcoxon の順位和検定を用いた。RFS と DSS は手術日より起算し, Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を記載し, 曲線間の差を log-rank 法で検定した。RFS と DSS を目的変数とした単変量解析と多変量解析によるハザード比と 95%信頼区間の算出には Cox 比例ハザードモデル及び Wald 検定を用いた。 P 値は片側検定による 0.05 未満を統計学的に有意とした。

第3章 結果

(1) 患者背景

ICC/IF 法によるペリセントリン発現の検討対象の TNBC 19 例と luminal A-like BC 27 例に関する臨床病理学的背景を示す(Table 2)。年齢, 術式, 組織型, 浸潤径(pT), リンパ節転移状況(pN), リンパ管侵襲の有無に両群間で有意差はなかった。Ki-67 LI($P < 0.0001$)と NG($P < 0.0001$)は TNBC で有意に高値であった。IHC 法によるペリセントリン発現の検討対象の TNBC 55 例, luminal A-like BC 55 例でも同様の結果であった(Table 3)。

(2) ICC/IF 法によるペリセントリンの評価

非腫瘍性乳管上皮細胞 7 例で 3 個以上の spot を有する細胞は認めなかった。Spot 数増加細胞の出現割合の平均値と SD は, 乳癌 46 症例において 3.3% (± 3.8 SD), TNBC 19 例で 5.5 % (± 4.5 SD), luminal A-like BC 27 例で 1.7 % (± 2.1 SD)と TNBC で有意に高値であった(Wilcoxon 検定, $P = 0.0009$)(Table 4)。

(3) IHC 法によるペリセントリンの評価

非腫瘍性乳管上皮細胞 10 例では細胞 1 個につき 1 個の spot が観察され, 併せて 1,000 個の細胞の spot の長径平均値と SD は $0.80 \mu\text{m}$ (± 0.34 SD)であった。また, 中央値は 0.78 [95%信頼区間(confidence interval, CI): 0.78 – 0.82], 範囲は 0.11 – 1.89 であった。平均値 + 3 SD よりも大きい整数値である $2.0 \mu\text{m}$ 以上を spot 長径の「大きさの増加」と定義した。正常細胞では $2.0 \mu\text{m}$ 以上の spot は明らかでなかった。

TNBC 55 例, luminal A-like BC 55 例の各症例で 200 細胞を計測した。乳癌 110 例において中心体増幅細胞割合(数/大きさの増加)の平均値と SD は 11.8% (± 11.6), 中央値は

7.0 [95% CI: 9.6 – 14.0], 範囲は 0.0 – 49.5 であった。TNBC の平均値と SD は 20.8 % (± 10.2 SD), luminal A-like BC で 2.8 % (± 2.1 SD) と TNBC で有意に高値であった (Wilcoxon 検定, $P < 0.0001$)。この結果は, 数の増加のみの比較, 大きさの増加のみの比較でも TNBC で有意に高値であった (Wilcoxon 検定, いずれも $P < 0.0001$) (Table 5)。

(4) ICC/IF 法と IHC 法によるペリセントリン評価結果の対応

ICC/IF 法で対象となった乳癌 46 例について, spot 数増加細胞の出現割合平均値と SD は, ICC/IF 法での 4,435 細胞の計測では 3.3 % (± 3.8 SD), IHC 法での 9,200 細胞の計測では 3.9 % (± 4.9 SD) であった (Table 4, 5)。標本作製方法ごとにこれらの平均値以上群, 平均値未満群の比率を比較すると, ICC/IF 法による平均値以上であった群は, IHC 法でも同割合が平均値以上の群である率が有意に高く (Fisher の正確確率検定, $P = 0.002$) (Table 6), ICC/IF 法と IHC 法との対応関係が示された。

(5) Feulgen 反応による核 DNA 量の評価

乳癌 65 例の同一切片上にみられる非腫瘍細胞の核 DNA 量パターンは, 全例が 2c 区域の単一ピークで, G0/G1 ピークが占める細胞比率は 20%以上であった。乳癌 65 例の核 DNA 量パターンは (a) 最大ピークの DNA index の区域に関し, near 2c が 38 例 (58%), (b) 最大ピークが占める細胞比率が 20%未満の症例は 33 例 (51%), (c) 複数ピークを有する症例は 13 例 (20%), (d) DNA index の最大区域が 3c 以上であった症例が 31 例 (48%) であった。TNBC 55 例と luminal A-like BC 10 例の核 DNA 量パターンの比較結果を示す (Table 7)。(a) 最大ピークの DNA index の区域が 3c 以上であった例は, TNBC は 26 例 (47%), luminal A-like BC では 1 例 (10%) のみであり, TNBC の方が luminal A like よりも有意に高かった (Fisher の正確確率検定, $P = 0.027$)。(b) 最大ピークが占める細胞比率が 20%未満の症例は, TNBC は 31 例 (56%), luminal A-like BC では 2 例 (20%) で, TNBC の方が有

意に高かった(Fisher の正確確率検定, $P = 0.037$)。 (c)複数ピークを有した例の割合は, TNBC は 13 例(24%)であったのに対して, luminal A-like BC では認められなかったが, subtype による統計学的な有意差はみられなかった。 (d)DNA index の最大区域が 3c 以上であった例は, TNBC は 30 例(55%), luminal A-like BC では 1 例(10%)であり, TNBC の方が luminal A-like BC よりも有意に高かった(Fisher の正確確率検定, $P = 0.010$)。

以上より, luminal A-like BC は near 2c の範囲に最大ピークを有し, 細胞比率が最大ピーク以外に分散しにくい傾向を示した。 一方 TNBC は, 半数近くが near 2c に最大ピークをもつが, 3c 以上の区域での最大ピークまたはその他の G0/G1 複数ピークが luminal A-like BC に比べて出現しやすく, 最大ピークに占める細胞比率が他の区域に分散する傾向がみられた。

(6) X 染色体セントロメア領域の異常の評価

TNBC 19 例中, 17 例で十分な腫瘍細胞量を評価可能であった。 非腫瘍細胞 100 細胞の CEP X のコピー数の平均値と SD は 1.96 (± 0.28 SD)であった。 この値から平均値 ± 2 SD を cutoff 値とした。 X 染色体のセントロメア領域に異常ありは 10 例(59%), 異常なしが 7 例(41%)であった。

(7) Feulgen 反応と FISH 法の相関

FISH 法で検討した TNBC 17 例に関して, Feulgen 反応による核 DNA 量パターンと FISH 法の相関を示す(Table 8)。 Feulgen 反応による(a)最大ピークの DNA index 区域や (c)複数ピークの有無と FISH 法の結果との間には有意差はみられなかった(Fisher の正確確率検定, 各 $P = 0.052, 0.441$)。 しかし, (b)最大ピークが占める細胞比率が 20%未満の症例は, FISH 法で CEP X の数的異常ありの群が異常なしの群よりも多かった(Fisher の正確確率検定, $P = 0.013$)。 (d)DNA index の最大区域についても, 2cH 以上の例は CEP X の数

的異常ありの群で9例(90%)であったのに対し, CEP Xの数的異常なしの群では2例(28%)に留まり, 有意差がみられた(Fisherの正確確率検定, $P=0.018$)。

以上より, TNBCにおいて, DNA indexのピークが2c以外に出現した例, 最大ピークの細胞比率が20%に満たない例では, CEP Xの数的異常もみられやすいという関連性が示された。

(8) ペリセントリン spot 変化と乳癌の核 DNA 量パターン, 臨床病理学的指標, 及び患者予後との関連

(i) 核 DNA 量パターンとの関連

TNBC 55 例の Feulgen 反応による核 DNA 量パターンについて, ペリセントリン spot の数/大きさの分類との関連(Table 9A)と, 大きさの分類との関連(Table 9B)を示す。

TNBC の数/大きさの分類による異常 spot を有する細胞比率高値群 19 例において, (a)最大ピークの DNA index 区域が near 4c 以下の症例は 16 例(84%), over 4c は 3 例(16%)であった。一方, 低値群 36 例では全例(100%)が near 4c 以下であり, 有意差を認めた(Fisherの正確確率検定, $P=0.037$)。 (b)最大ピークが占める細胞比率が 20%未満の症例は, 高値群が 15 例(79%), 低値群が 16 例(44%)であり高値群のほうが有意に高かった(Fisherの正確確率検定, $P=0.014$)。 (c)複数ピークを有する症例は, 高値群で 8 例(42%), 低値群で 5 例(14%)であり, 高値群のほうが有意に高かった(Fisherの正確確率検定, $P=0.024$)。

(d)DNA index の最大区域では, 高値群では 3c 以上が 14 例(73%), 一方, 低値群では 3c 以上が 16 例(45%)であり, 高値群のほうが有意に 3c 以上の比率が多かった(Fisherの正確確率検定, $P=0.036$)。なお, 核 DNA 量パターンの諸パラメータ(a)-(d)は大きさの分類による高値群 15 例と低値群 40 例の間では有意な関連を示さなかった。

以上より, ペリセントリン spot に関する数/大きさの分類 低値群は G0/G1 ピークの出現が near 2c に留まりやすく, ピークは単独で, 最大ピーク以外の区域に細胞が分散しにく

い傾向にあった。最大ピークが 3c 以上の症例もみられたが、高値群に比べ over 4c の例の比率は低い傾向にあった。逆に、数/大きさの分類 高値群は G0/G1 ピークが 3c 以上に出現しやすく、複数ピークへの細胞比率の分散、over 4c の最大ピークがより高頻度であり、低値群よりも高度で複雑な核 DNA パターンと関連する傾向が示された。

(ii) 臨床病理学的指標との関連

乳癌 110 例の臨床病理学的因子について、方法(4)の中心体増幅細胞割合(すなわち、数/大きさ)の分類との関連(Table 10A)と、大きさの増加した spot 保有細胞割合(すなわち、大きさ)の分類による比較(Table 10B)を示す。数/大きさの分類の cutoff 値 23%で 2 群に分けると、高値群は 19 例(17%)、低値群は 91 例(83%)で、高値群は低値群よりも NG3, Ki-67 LI 高値で、TNBC サブタイプの比率が有意に高かった(Fisher の正確確率検定, 各 $P < 0.0001, 0.0002, < 0.0001$)。その他の臨床病理学的因子には有意差はみられなかった。同様に、乳癌 110 例を大きさの増加した spot 保有細胞割合による分類の cutoff 値 13%で 2 群に分けると、高値群は 15 例(14%)、低値群は 95 例(86%)で、数/大きさの分類と同じく、NG3, Ki-67 LI 高値, TNBC サブタイプで有意差を認めた(Fisher の正確確率検定, 各 $P < 0.0001, < 0.0001, < 0.0001$)。術後療法の詳細情報が得られなかった 9 例を除く 101 例に関して、数/大きさ、及び大きさの両分類で、高値群は低値群よりも術後化学療法施行症例の比率が有意に高かった(Fisher の正確確率検定, 各 $P = 0.027, 0.0003$)。

次に、TNBC 55 例の臨床病理学的因子について、数/大きさの分類との関連(Table 11A)と、大きさの分類との関連(Table 11B)を示す。TNBC 55 例を数/大きさの分類で 2 群に分けると、高値群は 19 例(35%)、低値群は 36 例(65%)であり、高値群は低値群よりも病理学的 N 因子が pN1a 以上の症例とリンパ管侵襲陽症例の比率が有意に高かった(Fisher の正確確率検定, 各 $P = 0.014, 0.022$)。一方、大きさの分類で 2 群に分けると、高値群は 15 例(27%)、低値群は 40 例(73%)で、高値群は低値群よりもリンパ管侵襲陽性症例の比率と、組

織型が浸潤性乳管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)の症例の比率が有意に高かった (Fisher の正確確率検定, 各 $P = 0.019, 0.043$)。術後療法の詳細情報が得られなかった 5 例を除く 50 例の術後療法の内容に関しては, 数/大きさの分類では有意差はみられなかったが, 大きさの分類では, 高値群は低値群よりも術後化学療法施行症例の比率が有意に高かった (Fisher の正確確率検定, 各 $P = 0.607, 0.049$)。

以上より, ペリセントリン spot の数/大きさの分類と大きさの分類におけるペリセントリン異常を有する細胞比率高値群は, TNBC と luminal A-like BC が混在した 110 例に関しては NG, Ki-67 LI のような増殖指標と強い相関を示すが, TNBC 55 例の中では増殖性以外の悪性度指標, すなわちリンパ節転移やリンパ管侵襲との関連がみられ, 大きさの分類では組織型との関連もみられた。

(iii) 予後との関連

ペリセントリンの異常 spot に関する数/大きさの分類による高値群と低値群 (Figure 5A, B) と, 大きさの分類による高値群と低値群 (Figure 5C, D) の間での乳癌患者 110 例の無再発生存曲線及び全生存曲線を示す。数/大きさの分類による高値群 19 例と低値群 91 例の生存曲線の間, 及び大きさの分類 高値群 15 例と低値群 95 例の生存曲線の間, いずれにおいても高値群は RFS, DSS とともに低値群よりも予後不良であった (両分類: log-rank 検定, RFS, DSS いずれも $P < 0.0001$) (Figure 5A-D)。

Cox の単変量解析ではペリセントリンの数/大きさによる分類, 大きさによる分類, サブタイプ, NG, Ki-67 LI, 術後化学療法施行ありが有意な予後不良因子であった (Table 12)。サブタイプ, NG, Ki-67 LI は互いに交絡因子であったため, 多変量解析には Ki-67 LI を用いたところ, 数/大きさの分類と大きさの分類はいずれも, Ki-67 LI とともに独立した予後因子であった [数/大きさ: ハザード比 = 12.5; 95 %CI, 3.01-52.2; $P = 0.0005$] [大きさ: ハザード比 = 21.3; 95 %CI, 4.20-108.3; $P = 0.0002$]。

次に TNBC 55 例に関して、同様にペリセントリンの数/大きさの分類 高値群 19 例と低値群 36 例(Figure 6 A, B), 及び大きさの分類 高値群 15 例と低値群 40 例(Figure 6C, D)の間の生存曲線の比較では、両分類において高値群は RFS, DSS とともに低値群よりも予後不良であった(数/大きさ: log-rank 検定, 各 $P = 0.0007, 0.004$; 大きさ: log-rank 検定, 各 $P < 0.0001, 0.017$) (Figure 6A-D)。Cox の単変量解析において数/大きさの分類, 及び大きさの分類が再発に関する有意な予後因子であった(数/大きさ: ハザード比 = 9.2, 95%CI, 1.95-43.5, $P = 0.005$; 大きさ: ハザード比 = 15.2, 95%CI, 3.21-71.5, $P = 0.0006$)(Table 13)。その他の臨床病理学的因子の中ではリンパ管侵襲陽性が再発との関連する傾向を示したが有意ではなく($P = 0.052$), 他の因子も有意ではなかった。

以上より, ペリセントリンの異常 spot に関する数/大きさの分類, 及び大きさの分類は, TNBC と luminal A-like BC を合わせた患者グループでも, TNBC のみの患者グループでも, 独立した予後予測因子となり, 高値群は低値群よりも予後不良であることが示された。

(iv) 化学療法の有無による予後との関連

TNBC において術後療法の詳細が不明な 5 例を除き, 術後補助化学療法を施行されなかった 19 例と施行された 31 例の各々を, ペリセントリンの異常 spot に関する数/大きさの分類と大きさの分類それぞれの高値群と低値群で階層化した 4 群の生存曲線を示す(Figure 7A-D)。

数/大きさの分類において, 術後化学療法なしの高値群(赤点線)は, RFS, DSS とともに低値群(青点線)よりも予後不良であった(log-rank 検定, RFS: $P = 0.006$, DSS: $P = 0.003$)。一方, 化学療法を施行した例の高値群(赤実線)は低値群(青実線)と比べ予後に差はみられなかった(log-rank 検定, RFS: $P = 0.114$, DSS: $P = 0.328$) (Figure 7A, B)。

大きさの分類では化学療法施行例において RFS, DSS とともに高値群のほうが低値群よりも予後不良であり(log-rank 検定, RFS: $P = 0.0002$, DSS : $P = 0.020$) (Figure 7C, D), 化学

療法未施行例では両群の予後に差はみられなかった(log-rank 検定; RFS, $P=0.091$; DSS, $P=0.151$)。大きさの分類 高値群の化学療法未施行例では 2 例中 1 名が再発, 死亡していた。

上記の化学療法を施行された 31 例について, タキサンを含むレジメンが用いられた 22 例と EC のみのレジメンが用いられた 9 例についてのペリセントリン異常 spot に関する数/大きさの分類で階層化した生存曲線を解析した。タキサン投与群, EC 投与群ともに, 数/大きさの分類の高値群, 低値群いずれにおいても使用レジメンの違いによる生存曲線間の差はみられなかった(データ示さず)。ペリセントリンの異常 spot に関する大きさの分類では, RFS に関して高値群においてタキサン投与群の方が EC 投与群に比べて予後良好の傾向はみられたものの, 有意差はみられなかった(log-rank 検定, $P=0.056$)。また, 低値群は使用薬剤によらず再発がみられなかった(Figure 8A)。DSS に関して高値群については, タキサン投与群が全例生存, EC 投与群が 4 例中 3 名死亡し, EC 投与群のほうがタキサン投与群よりも予後不良であった(log-rank 検定, $P=0.016$)。低値群について使用レジメンに関わらず, 死亡例は認めていない(Figure 8B)。

以上より, 一般に TNBC においてペリセントリン spot 異常高値群は術後化学療法の有無にかかわらず低値群に比べて予後不良の傾向を示すことが明らかにされた。数/大きさの分類は術後化学療法未施行例において, 大きさの分類は術後化学療法施行例において, 高値群が低値群よりも有意に予後不良であった(Figure 7)。さらに大きさの分類では, 化学療法の使用薬剤に関わらず, 低値群は予後良好であり, 高値群は EC 群でより予後不良の傾向がみられた(Figure 8)。

(v) 再発例の詳細

数/大きさの分類と, 大きさの分類の高値群で再発をきたした合計 10 例の詳細を示す (Table 14)。これらの 10 名中 6 名が両分類で高値群に属していた。10 名中死亡したのは

6名で, そのうち5年以内の死亡が4名であった。担癌生存4名中, 観察期間が5年未満は1名であった。局所再発のみは1例のみで, 両分類の高値群, タキサン投与例であった。

第4章 考察

本研究では(1)乳癌組織における中心体増幅のマーカーとしてペリセントリン発現異常を免疫組織化学的に評価する方法を確立すること, (2)ペリセントリン発現の異常と乳癌の染色体不安定性の関連を核 DNA 量の変化の観点から明らかにすること, (3)乳癌サブタイプごとのペリセントリン発現異常の出現頻度を TNBC と luminal A-like BC で比較すること, そして(4)ペリセントリン発現異常の予後因子, 治療効果予測因子としての意義を調べることを, の4点を主眼として検討を行った。

IHC 法によるペリセントリン spot の数/大きさの変化は中心体増幅の総量の変化を把握して観察していると考えられた。大きさの変化には, 複数の中心体が一気に癒合してみえるクラスタリングの状態と, 一か所の PCM が何らかの原因で拡大する状態が想定された。本研究における観察法ではこれらの原因は区別できないが, 大きな spot の一部にはクラスタリングの状態を含んでいると考えられる。

(1) ペリセントリン発現異常の免疫組織化学的な評価方法の確立について

本研究では IHC 法によるペリセントリンの発現異常検出のプロトコルを確立することを第一目標とした。IHC 法で $4\ \mu\text{m}$ に薄切した切片で測定するため細胞全体を観察できる ICC/IF 法での検出結果と対比させた結果, 数の異常に関する IHC 法による計測値は ICC/IF 法による計測値と関連した。

ペリセントリン発現の評価は概ね容易であったが, IHC 法の測定時に計測者間でディスカッションが必要になった組織所見としては, 主に2点が挙げられた。1つは細胞境界の不明瞭な細胞においてペリセントリン spot の帰属についてである (Figure 2 D, K)。細胞境界が不明瞭な細胞は, 画像上で示して観察者間で同意が得られれば spot として計測, 同意が得られなければ計測対象から除外した。2つ目は DAB の染色背景が強い症例につい

てで、このような症例については、正常細胞部分でみられる spot と背景のコントラスト、及び spot の輪郭の明瞭さを基準として、不明瞭で薄い染色部分は spot と判定しなかった。

これにより、複数の spot の集合かまたは spot の大きさの変化か迷った場合には、正常細胞を基準として spot 全周が他の陽性部分と不連続かどうかを判定することで観察者間の一致が見られた。

画面上の目視で行う測定には、測定者間の基準の統一が必要であるが、今後は別コホートでの測定や、染色強度や局在に関する自動解析との相関を検討することで、今回用いた方法の汎用性の検証が可能と考えられる。

(2) ペリセントリン発現異常と乳癌の染色体不安定性の関連について

核 DNA 量に関する結果では、ペリセントリン spot に関する数/大きさの分類 高値群は低値群よりも高度で複雑な核 DNA パターンを示した。このことは中心体増幅の総量が多いことと高レベルの染色体不安定性との間に関連がある(11, 20)ことを反映していると考えられた。それに対して、大きさの分類には染色体不安定性との相関はみられなかった。このことはペリセントリン spot の大きなものは主としてクラスタリングによって生じたものと考えると説明可能と思われる。中心体増幅や染色体不安定性のレベルが高すぎると癌細胞の増殖能は低下し、場合によっては細胞死に陥ってしまう。増幅した中心体がクラスタリングを形成して双極分裂を続けられることで、中心体が増幅した癌細胞は活発な増殖を継続出来ると考えられており(21, 24, 34)、クラスタリングによって有糸分裂継続可能な癌細胞は染色体不安定性のレベルが高すぎない状態に維持される必要があると予想される。今回の結果も大きさの変化は染色体不安定性の指標との関連はなかったが、増殖能を表す Ki-67 LI や NG との強い相関を示し、本研究における大きさの分類がクラスタリングの状態を反映するという仮説を支持する結果であった。

(3) 乳癌サブタイプごとのペリセントリン発現異常について

サブタイプごとのペリセントリン発現異常に関しては、数/大きさの増加と大きさの増加のいずれも TNBC においての方が luminal A-like BC においてよりも出現頻度が高いという結果であった。これより、中心体増幅総量とクラスタリングともに TNBC のほうが luminal A-like BC よりも出現頻度が高いと考えられた。

(4) ペリセントリン発現異常の予後因子、治療効果予測因子としての意義について

TNBC と luminal A-like BC が混在した集団に関しては数/大きさ、または大きさの両分類は NG, Ki-67 LI のような増殖指数と強い相関を示し、単変量解析、多変量解析において各分類は独立した予後予測因子であることが示された。さらに、TNBC だけからなる集団ではリンパ節転移やリンパ管侵襲といった悪性度指標との関連が示され、単変量解析で各分類が予後予測因子であることが示された。この結果より、中心体増幅総量とクラスタリングの指標であるペリセントリン発現の評価がサブタイプの混在した乳癌だけでなく TNBC を層別化する予後予測因子になると考えられた。

予後の比較においては術後化学療法による修飾が加わっているため、TNBC の術後化学療法未施行例 19 例についてペリセントリン spot の状態で予後を調査したところ、数/大きさの分類では高値群の方が予後不良であり、中心体増幅総量が TNBC の予後因子となることをより裏付けた結果であった。大きさの分類についても同様の傾向がうかがわれたが有意差がみられなかったのは、大きさの分類 高値群の術後化学療法 未施行例は 2 例のみであり、症例数の不足が原因と考えられた。また、術後化学療法 施行例 31 例においても、数/大きさの分類では予後に有意差はみられなかったが、大きさの分類では RFS, DSS とともに高値群が予後不良であり、クラスタリングが多い方が予後不良である可能性が考えられた。

化学療法のレジメンと大きさの分類で層別化した予後の比較では、大きさの分類 高値群はタキサン投与群に比べ EC 投与群において予後不良の傾向がみられた。TNBC における

クラスタリングが少ない症例は薬剤によらず予後が良好な傾向にあり、クラスタリングの多い症例では EC のみよりもタキサンを含むレジメンのほうが、予後が改善する可能性が示唆された。症例数が少ないため、解釈は慎重に行う必要があり、タキサンがクラスタリングに効いているのか、乳癌全般に奏効することを示しているのかは今回の検討からは判断出来ない。しかしタキサンの治療奏効群や、タキサン使用推奨群を予測することが出来れば臨床的な意義は大きいと考えられる。

従来、タキサンを含む微小管阻害薬は重合-脱重合の動的均衡状態を破壊し、有糸分裂を停止させることが薬理作用であると考えられてきた。しかし、近年の乳癌患者の臨床試験で、術前化学療法でパクリタキセルを投与した 20 時間後の患者腫瘍を生検して薬剤濃度を調べると、これまで培養細胞で想定されていた有糸分裂停止濃度よりもはるかに低濃度であることが示された。薬剤投与後の患者生検組織、及び臨床条件と同濃度のパクリタキセルを投与した乳癌培養細胞では、有糸分裂停止は明らかでなく、多極性有糸分裂が増加した。そして M 期後期に多極性が持続する場合と、細胞のもつ染色体不安定性が高い場合の方がよりパクリタキセルの抗腫瘍効果を発揮するという報告がある(12, 35)。これらの報告では染色体不安定性はパクリタキセル反応性予測因子と考えられ、ペリセントリン spot の数/大きさの分類が中心体増幅の総量と染色体不安定性を反映しているとすれば、数/大きさの分類でペリセントリン spot 高値群においては EC 投与群と比較したタキサン投与群の予後は良好となることが予測されたが、本研究の予後解析の結果ではそのような関連はみられなかった。一方、多極性の持続はクラスタリングが起こらない状態であるため、クラスタリング形成のおかげで増殖していた癌細胞に対して抗腫瘍効果が発揮されたと仮定できる。本研究においても大きさの分類でのペリセントリン spot 高値群の予後解析で、タキサン使用群 7 例が EC 使用群 4 例よりも予後良好であった結果(Figure 8)と一致し、spot の大きさがクラスタリングを反映し、タキサン反応予測因子になるという仮説を立てることができる。いずれにしても、本研究よりも詳細な患者情報または統一されたレジメンで、

症例数を増やした別コホートにおける検討の価値があると考えられた。

本研究の limitation として、症例数が充分といえず、臨床情報の欠損値もあり、統計的解析の検出力に限界があったことが挙げられる。特に染色体不安定性を裏付ける FISH の実施や DNA index の計測は限られた数の症例でしか行えなかった。また、Feulgen 反応より新しい技術であるフローサイトメトリー法による検索も試みたが、データを得るに至らなかった。この原因は、腫瘍組織内に混在する間質の存在、フローサイトメトリーに最適化された検体保存法ではなかった点、細胞単離における手技的限界などに起因すると予測された。次に、本研究はレトロスペクティブかつ TNBC と luminal A-like BC を各々症例、対照として選び出した症例対照研究である。本研究結果を検証するには全部のサブタイプを含む一定期間内の全症例を対象としたレトロスペクティブな検討や、前向き観察研究が必要と考えられた。それでも今回の研究において FFPE を用いたペリセントリン発現の測定により、ペリセントリン発現異常が TNBC において高頻度で生じ、TNBC の予後不良因子であることを明らかに出来たこと、また薬物療法効果との関連の一端を示唆できたことは、新規性のある結果であると思われる。今後もペリセントリン発現異常のバイオマーカーとしての意義、また異型度の高い乳癌の増殖機構について研究を続けていきたい。

第5章 結論

乳癌における IHC 法によるペリセントリンの異常発現は, TNBC の予後因子となることが示された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御高閲、御協力を下さいました防衛医科大学校病態病理学講座教授 津田 均先生に深く感謝の意を表します。論文の作成にあたり、大変有用な御助言、多くの知識や示唆を賜りました防衛医科大学校外科学講座教授 岸 庸二先生ならびに生化学講座准教授 今村 宰先生に心より御礼申し上げます。また検体・臨床情報を御提供下さいました防衛医科大学校外科学講座の諸先生方に感謝の意を表しますとともに、多岐にわたり御助力いただきました防衛医科大学校病態病理学講座の皆様には謝意を表します。

略語一覧

- BC : breast cancer
- CI : confidence interval
- CK : cytokeratin
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DSS : disease-specific survival
- EC : epirubicin and cyclophosphamide therapy
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- ER : estrogen receptor
- FFPE : formalin-fixed paraffin-embedded
- FISH : fluorescence in situ hybridization
- G0/1/2 期 : gap 0/1/2 phase, ギャップ 0/1/2 期
- HE : hematoxylin-eosin
- HER2 : human epidermal growth factor receptor 2
- ICC/IF : immunocytochemistry/immunofluorescence
- IDC : invasive ductal carcinoma
- IHC : immunohistochemistry
- LI : labeling index
- M 期 : mitotic phase, 分裂期
- N/A : not applicable
- PCM : pericentriolar material
- PgR : progesterone receptor
- RFS : recurrence-free survival
- ROC : receiver operating characteristic
- SD : standard deviation
- SSC : saline-sodium citrate buffer
- S 期 : synthesis phase, 合成期
- TNBC : triple-negative breast cancer
- γ -TuRC : γ -tubulin ring complex

引用文献

1. Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (National Cancer Registry, Ministry of Health, Labour and Welfare) [Internet]. 2023 [cited 2023.06.01]. Available from: https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html.
2. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
3. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
4. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1533-46.
5. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer

2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.

7. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, Colleoni M, Regan MM, Piccart-Gebhart M, Senn HJ, Thürlimann B, André F, Baselga J, Bergh J, Bonnefoi H, Brucker SY, Cardoso F, Carey L, Ciruelos E, Cuzick J, Denkert C, Di Leo A, Ejlersen B, Francis P, Galimberti V, Garber J, Gulluoglu B, Goodwin P, Harbeck N, Hayes DF, Huang CS, Huober J, Hussein K, Jassem J, Jiang Z, Karlsson P, Morrow M, Orecchia R, Osborne KC, Pagani O, Partridge AH, Pritchard K, Ro J, Rutgers EJT, Sedlmayer F, Semiglazov V, Shao Z, Smith I, Toi M, Tutt A, Viale G, Watanabe T, Whelan TJ, Xu B. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1700-12.

8. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67.

9. Blagden SP, Glover DM. Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):505-11.

10. Drews RM, Hernando B, Tarabichi M, Haase K, Lesluyes T, Smith PS, Morrill Gavarró L, Couturier DL, Liu L, Schneider M, Brenton JD, Van Loo P, Macintyre G, Markowitz F. A pan-cancer compendium of chromosomal instability. *Nature.* 2022;606(7916):976-83.

11. Denu RA, Zasadil LM, Kanugh C, Laffin J, Weaver BA, Burkard ME. Centrosome amplification induces high grade features and is prognostic of worse outcomes in breast cancer. *BMC Cancer.* 2016;16:47.

12. Scribano CM, Wan J, Esbona K, Tucker JB, Lasek A, Zhou AS, Zasadil LM, Molini

- R, Fitzgerald J, Lager AM, Laffin JJ, Correia-Staudt K, Wisinski KB, Tevaarwerk AJ, O'Regan R, McGregor SM, Fowler AM, Chappell RJ, Bugni TS, Burkard ME, Weaver BA. Chromosomal instability sensitizes patient breast tumors to multipolar divisions induced by paclitaxel. *Sci Transl Med.* 2021;13(610):eabd4811.
13. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 1998;58(17):3974-85.
14. Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):2950-5.
15. Chan JY. A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *Int J Biol Sci.* 2011;7(8):1122-44.
16. Marteil G, Guerrero A, Vieira AF, de Almeida BP, Machado P, Mendonça S, Mesquita M, Villarreal B, Fonseca I, Francia ME, Dores K, Martins NP, Jana SC, Tranfield EM, Barbosa-Morais NL, Paredes J, Pellman D, Godinho SA, Bettencourt-Dias M. Overelongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1258.
17. Shimomura A, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of loss of BRCA1 expression with centrosome aberration in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(3):421-30.
18. Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):658-67.
19. Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, They M, Pellman D. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes*

Dev. 2008;22(16):2189-203.

20. Pannu V, Mittal K, Cantuaria G, Reid MD, Li X, Donthamsetty S, McBride M, Klimov S, Osan R, Gupta MV, Rida PC, Aneja R. Rampant centrosome amplification underlies more aggressive disease course of triple negative breast cancers. *Oncotarget*. 2015;6(12):10487-97.

21. Milunovic-Jevtic A, Mooney P, Sulerud T, Bisht J, Gatlin JC. Centrosomal clustering contributes to chromosomal instability and cancer. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:113-8.

22. Marthiens V, Piel M, Basto R. Never tear us apart--the importance of centrosome clustering. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 14):3281-92.

23. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*. 2005;307(5706):127-9.

24. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. 2009;460(7252):278-82.

25. Tsuda H, Akiyama F, Kurosumi M, Sakamoto G, Watanabe T. Establishment of histological criteria for high-risk node-negative breast carcinoma for a multi-institutional randomized clinical trial of adjuvant therapy. Japan National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer (NSAS-BC) Pathology Section. *Jpn J Clin Oncol*. 1998;28(8):486-91.

26. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM, Senn HJ, Winer EP, Gnant M. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol*. 2021;32(10):1216-35.

27. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH,

- Viale G, McShane LM, Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.
28. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
29. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Lakhani SR, Chavez-MacGregor M, Perlmutter J, Perou CM, Regan MM, Rimm DL, Symmans WF, Torlakovic EE, Varella L, Viale G, Weisberg TF, McShane LM, Wolff AC. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020;38(12):1346-66.
30. Sauter ER, Klein-Szanto A, Ehya H, MacGibbon B. Ductoscopic cytology and image analysis to detect breast carcinoma. *Cancer*. 2004;101(6):1283-92.
31. Schmidt B, Weinberg DS, Hollister K, Barnhill RL. Analysis of melanocytic lesions by DNA image cytometry. *Cancer*. 1994;73(12):2971-7.
32. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2023). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <https://mitelmandatabase.isb-cgc.org> [Internet]. [cited 2023.07.01].
33. CytoConverter: a web-based tool to convert karyotypes to genomic coordinates. Wang, J., LaFramboise, T. *BMC Bioinformatics* 20, 467 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3062-4> [Internet]. [cited 2023.07.01].
34. Silk AD, Zasadil LM, Holland AJ, Vitre B, Cleveland DW, Weaver BA. Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress

tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(44):E4134-41.

35. Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. Sci Transl Med. 2014;6(229):229ra43.

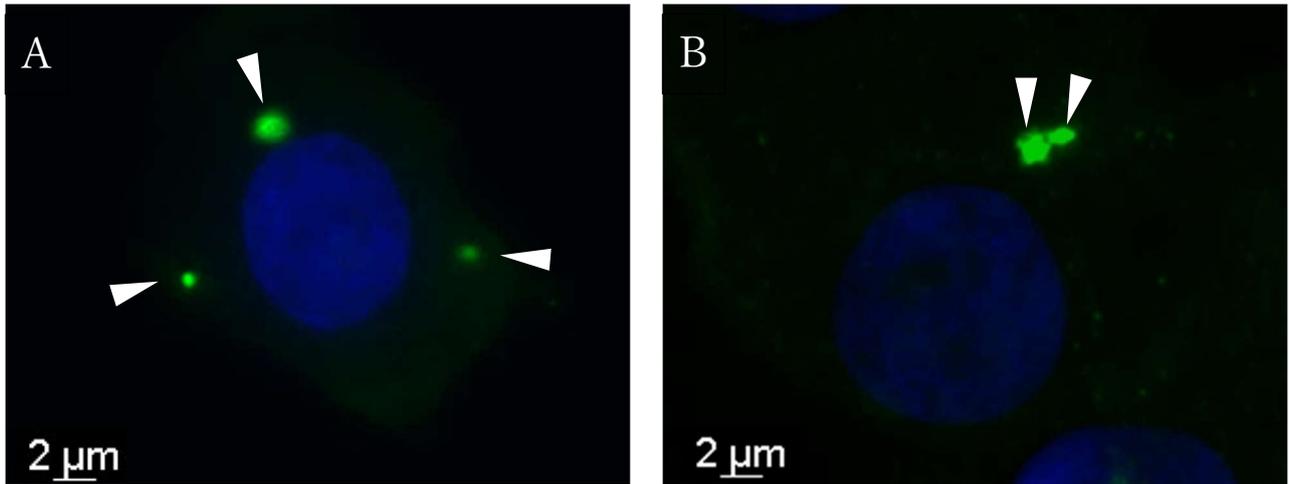


Figure 1. Pericentrin expression in breast cancer by immunocytochemistry/immunofluorescence
凍結乳癌組織からの捺印細胞標本に対し、ペリセントリンを緑で(Alexa Fluor 488™), 核を青で(DAPI)標識した。(A)Spot 数の増加として計測した間期乳癌細胞。3 個の spot(矢頭)を有する。(B)Spot 数の増加として計測しない間期乳癌細胞。2 個の spot(矢頭)を有する。複数個の spot が集合していると推測されたが、ピントと光量の調節によって 2 個までしか識別できなかったため 2 spots として計測した。

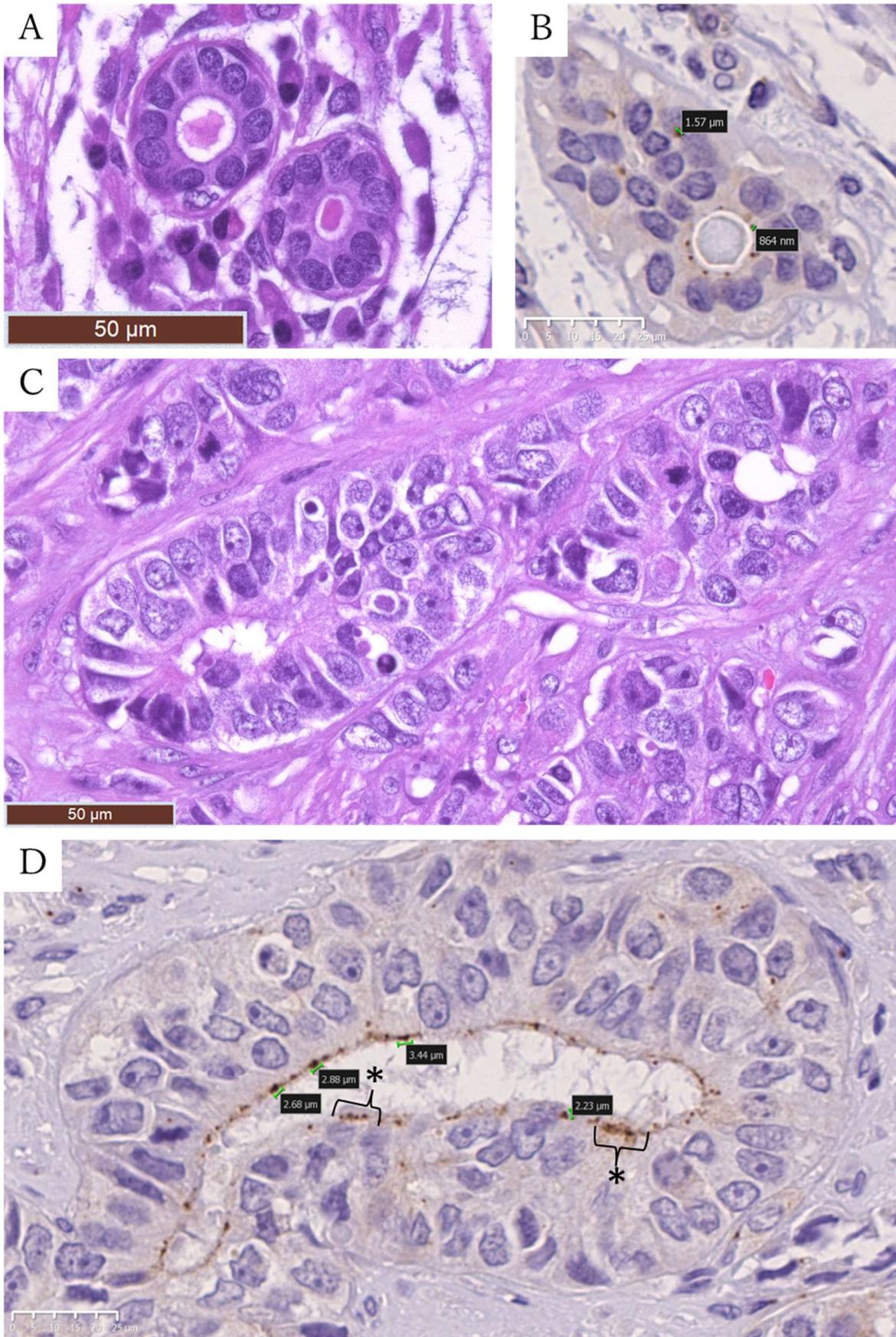


Figure 2(A-D)

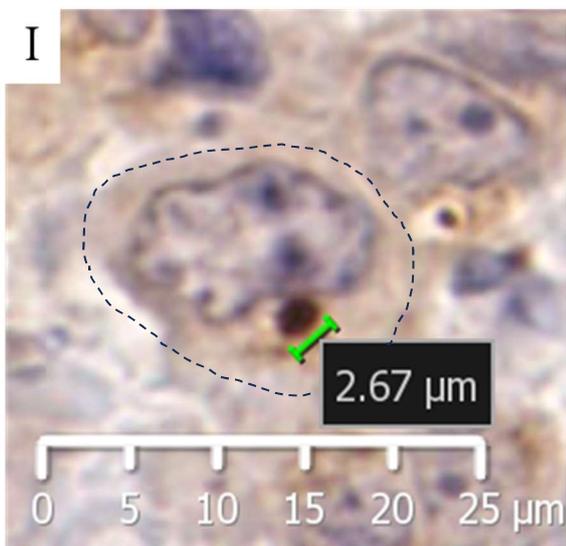
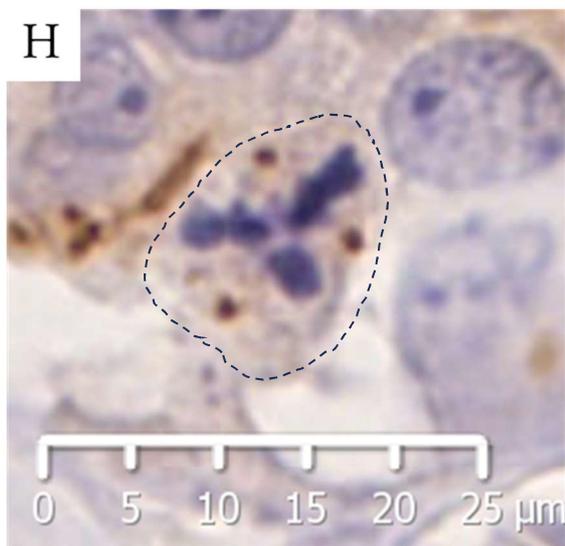
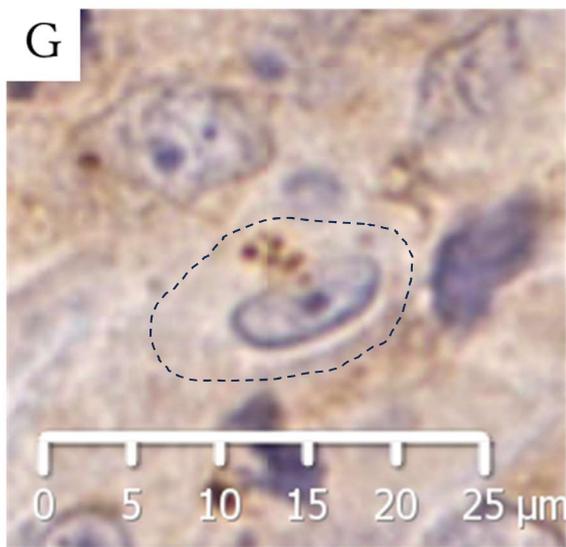
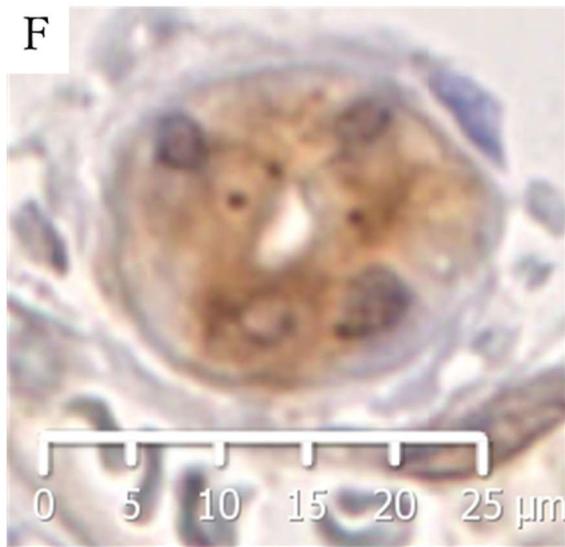
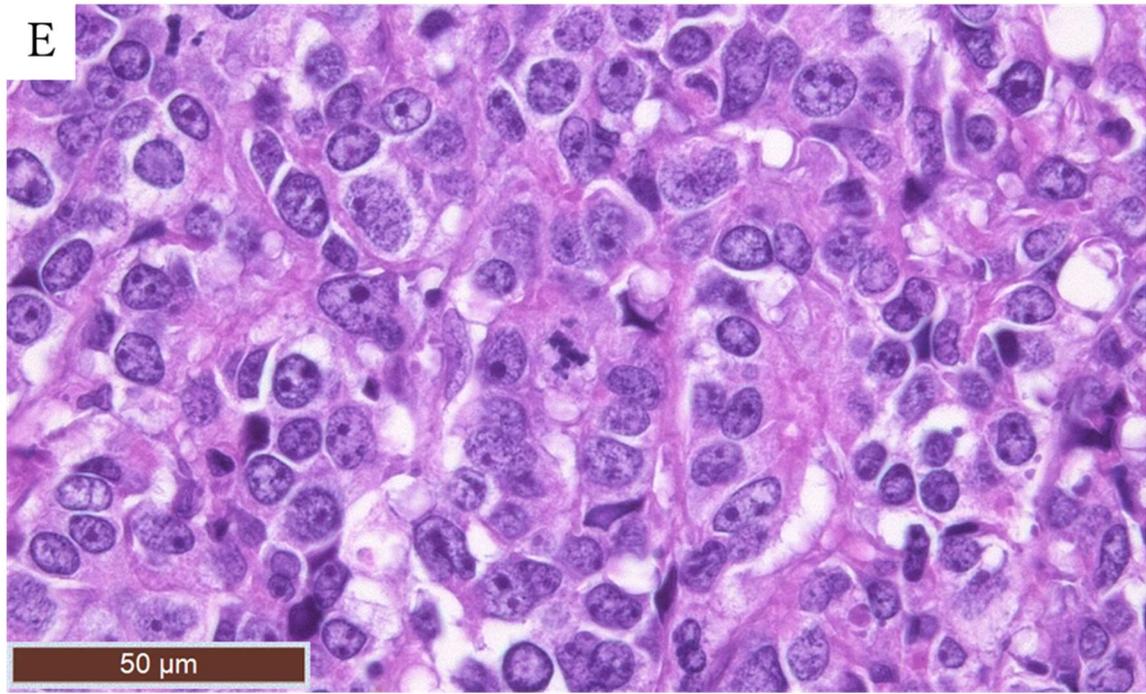


Figure 2(E-I)

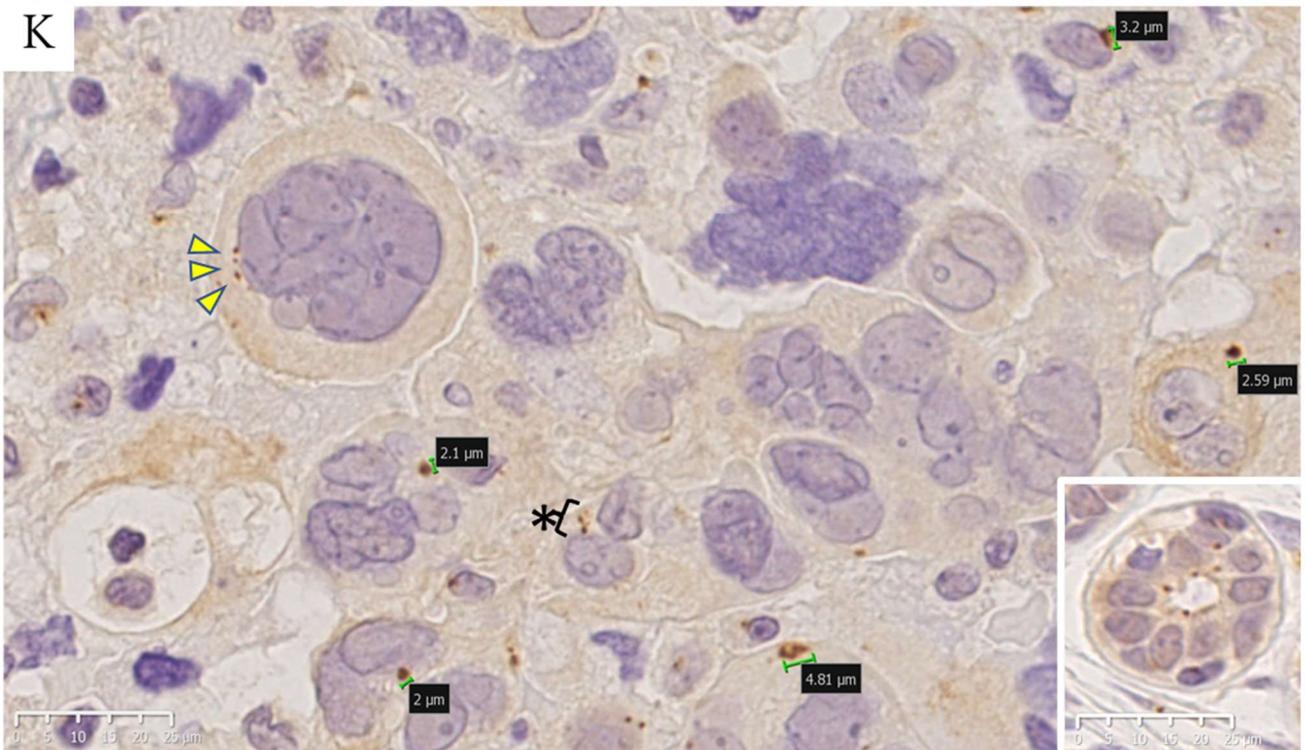
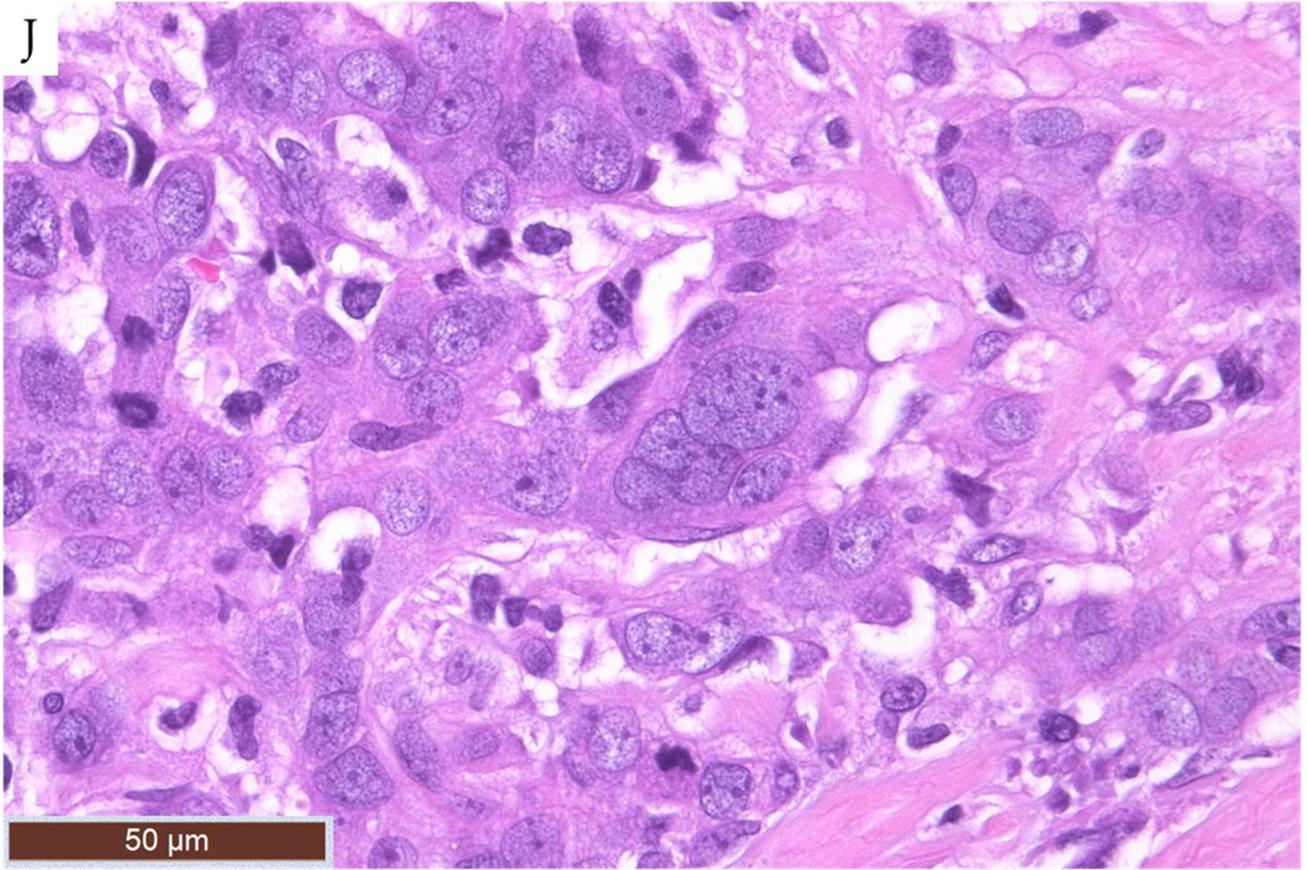


Figure 2(J, K)

Figure 2. Pericentrin expression in breast cancer by immunohistochemistry (IHC)

(A-D) A, B は非腫瘍性乳管組織。A は HE 染色標本, B は IHC 標本で, 腺管内腔側に細胞あたり 1 spot のペリセントリンが認められる。C, D は高分化な乳癌組織。C は HE 染色標本, D は IHC 標本で, 正常構造に類似して内腔側にペリセントリンの spot が認められるが, $2\mu\text{m}$ 以上の大きさの増加が散見される。* は spot の細胞帰属が不明瞭な部分である。腺管内腔側は細胞密度が高いため, 同一切片上に核が認められず spot の帰属が不明瞭な場合があり, それらの spot は計測対象から除外している。

(E-I) E, G-I は低分化な乳癌組織。E は HE 染色標本, F-I は IHC 標本である。F は同一症例の非腫瘍性乳管組織で, 細胞あたり 1 個のペリセントリンの spot を認める。G は間期乳癌細胞で, 中央に 3 個以上に増加した spot を認める。H は増殖性の強い癌細胞でみられる三極分裂細胞で, 3 個に増加した spot を認める。I は間期乳癌細胞で大きさの増加したペリセントリンの spot を認める。

(J, K) 大型多核細胞が目立つ乳癌組織。J は HE 染色標本, K は IHC 標本で, 数の増加(矢頭)と大きさの変化(緑 bar)を示すペリセントリンを有する癌細胞がみられる。* で示す spot の細胞帰属が不明瞭な部分は計測対象から除外している。K の inset は同一症例の非腫瘍性乳管組織のペリセントリンを示す。

(A, C, E, J) HE 染色, (B, D, F-I, K) 免疫組織化学染色(IHC)。IHC 写真内の緑 bar と数字は画像閲覧ソフトウェア(NDP.view2)による直線距離の計測値である。

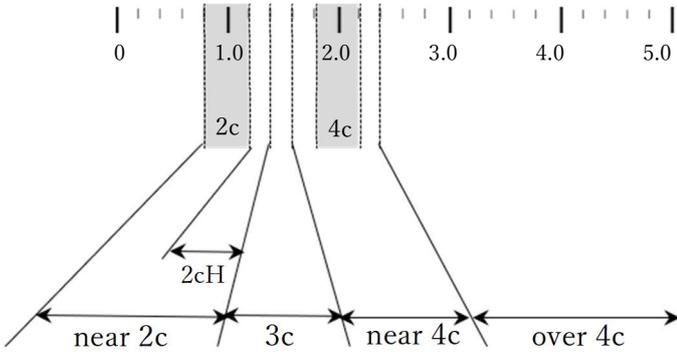
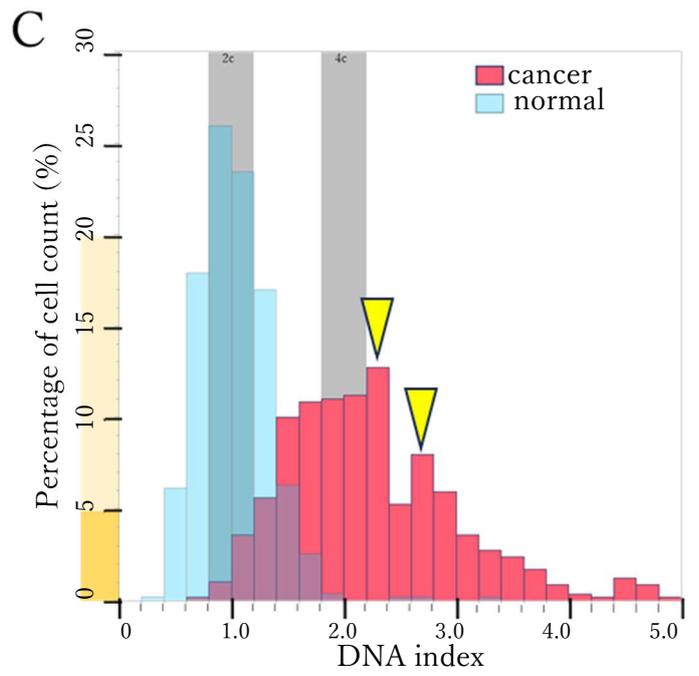
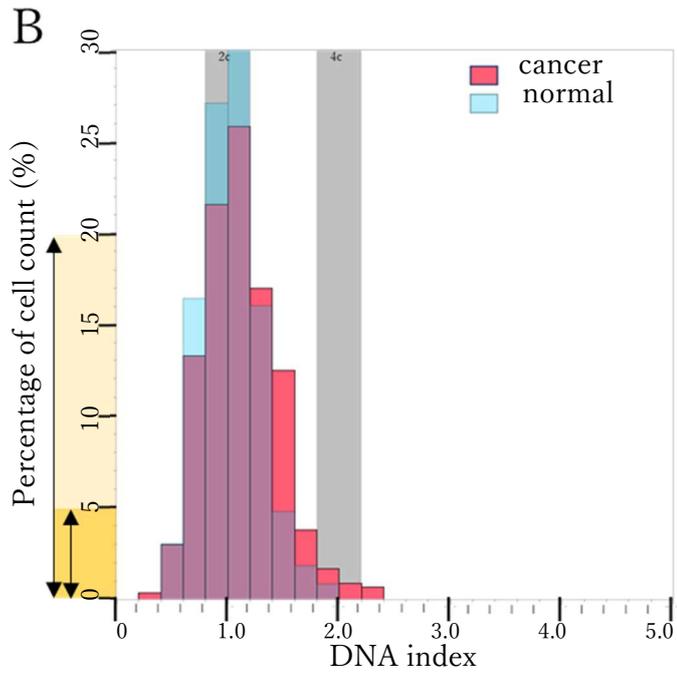
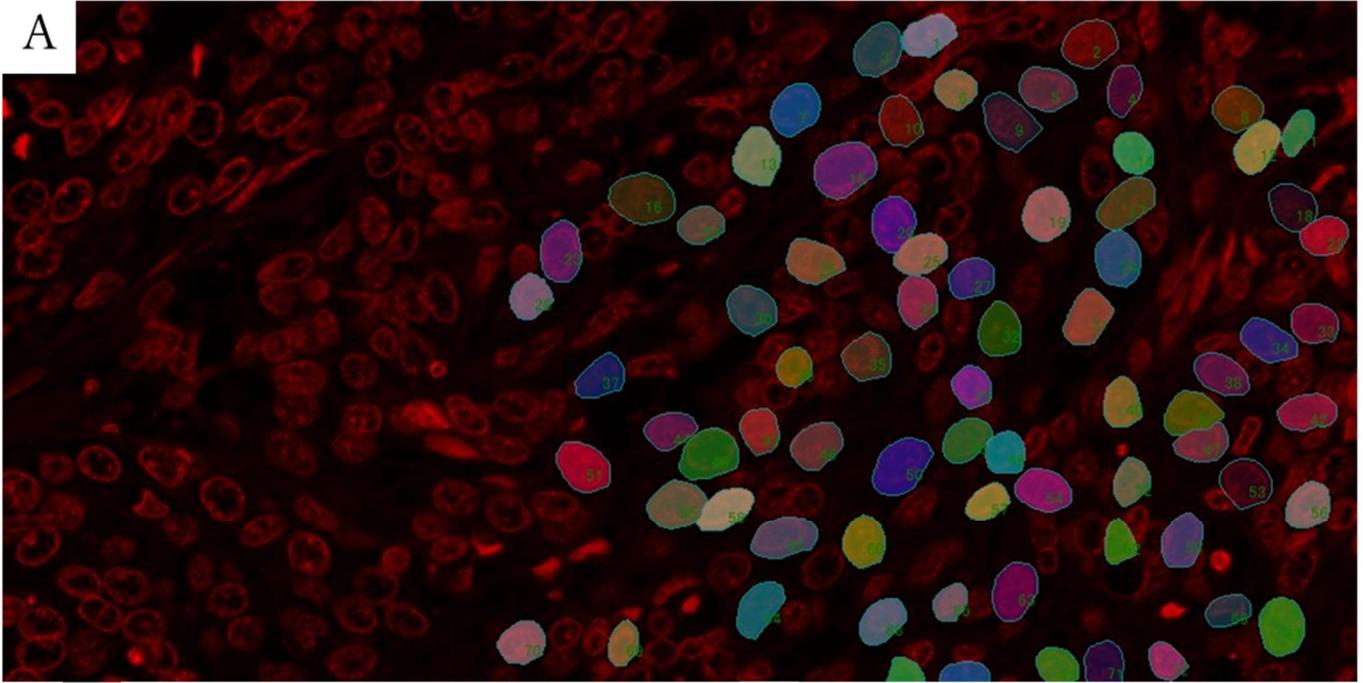


Figure 3. Analyses of DNA contents using Feulgen reaction and imaging analysis.

(A) Feulgen 反応を施行した乳癌組織の蛍光撮影画像。赤色に反応しているのが癌組織の構成細胞の核である。右側で番号ごとにランダムな色で塗りつぶされているのが、計測者が選択した癌細胞の核である。これらの核の蛍光輝度を画像解析ソフト (BZ-X analyzer, Keyence) によって測定している。

(B, C) 乳癌症例の核 DNA 量ヒストグラム。非腫瘍細胞 (水色) と乳癌細胞 (赤色) の核 DNA 積算輝度を示す。両者が重なる部分を紫色で示す。本研究では非腫瘍細胞のピークが収束する範囲を $2c$ として, DNA index を 5 区域 (DNA index) [$2c$ (0.8 以上, 1.2 未満; $0.8 < 1.2$, 以下同様), $2cH$ ($1.2 < 1.4$), $3c$ ($1.4 < 1.6$), $near\ 4c$ ($1.6 < 2.4$), $over\ 4c$ ($2.4 -$)] に分け, Y 軸の細胞比率が 5% (Y 軸 オレンジ色の範囲) 以上で, 両隣より高い bin を G0/G1 ピークとした。最大ピークに占める細胞比率や G0/G1 ピークが出現する X 軸の区域を計測した。B の乳癌では非腫瘍細胞と同様に $2c$ に G0/G1 ピークを 1 つだけ有する。C の乳癌では $near\ 4c$ に最大ピーク (細胞比率 20% 未満, Y 軸 薄黄色の範囲内), $over\ 4c$ に 2 つ目のピークを有する (矢頭)。

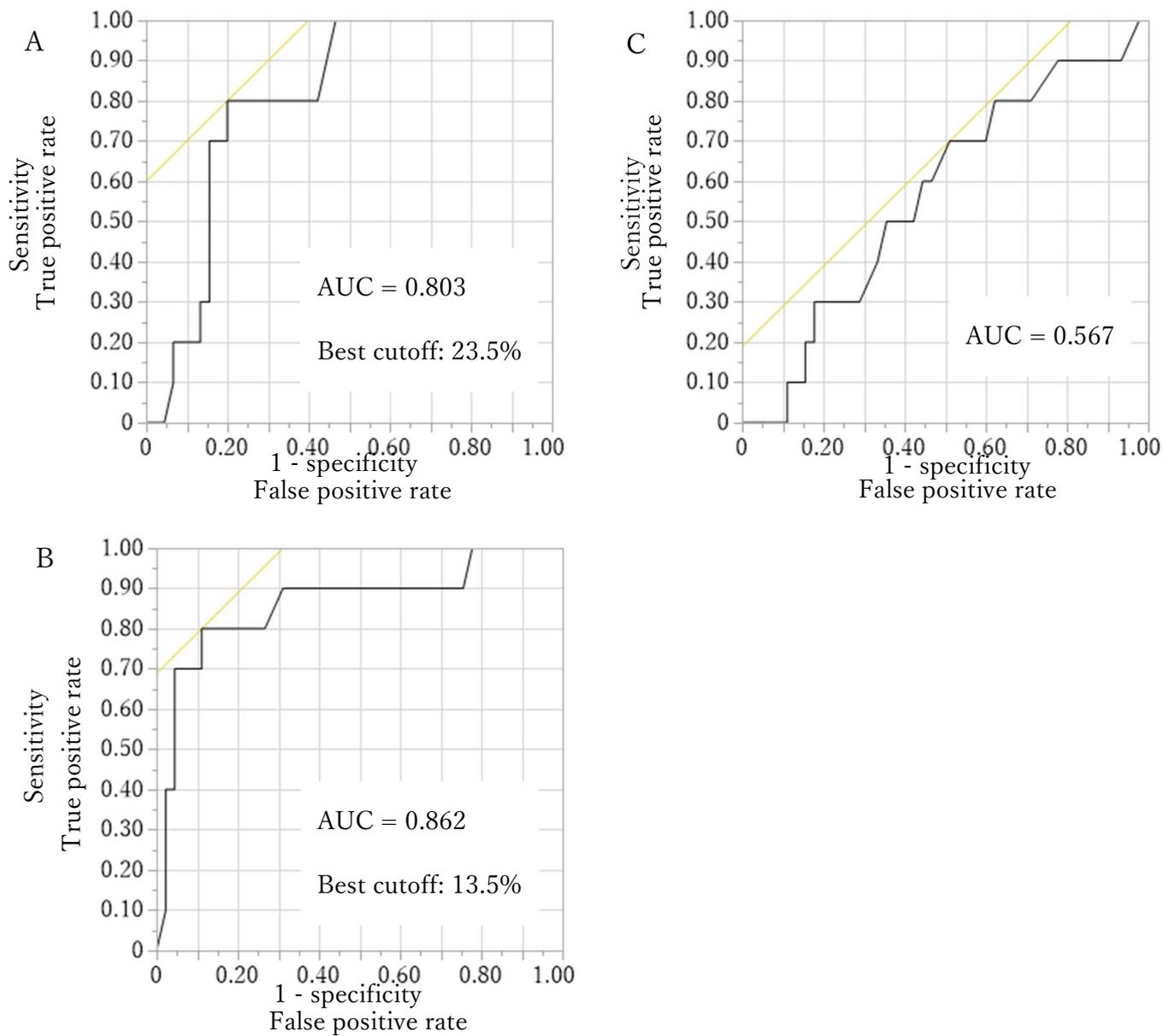


Figure 4. Receiver operating characteristic curve predicting recurrence in 55 triple negative breast cancers

(A)ペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合と再発に関する ROC 曲線

(B)ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合と再発に関する ROC 曲線

(C) ペリセントリンの数の異常を有する細胞割合と再発に関する ROC 曲線

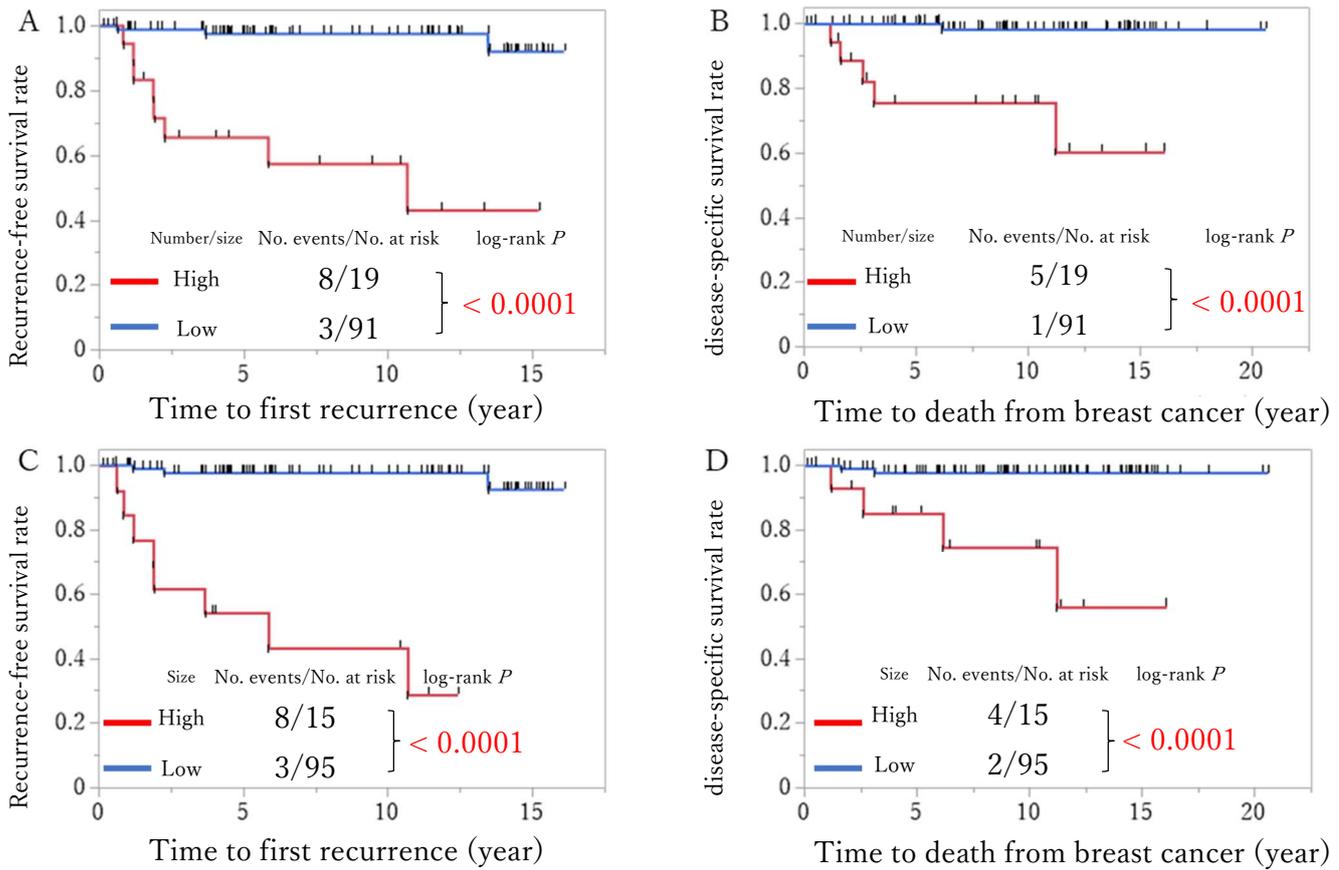


Figure 5. Kaplan-Meier curves of 110 patients with breast cancer stratified by the status of abnormal pericentrin spots.

(A) ペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の RFS 曲線

(B) ペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の DSS 曲線

(C) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の RFS 曲線

(D) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の DSS 曲線

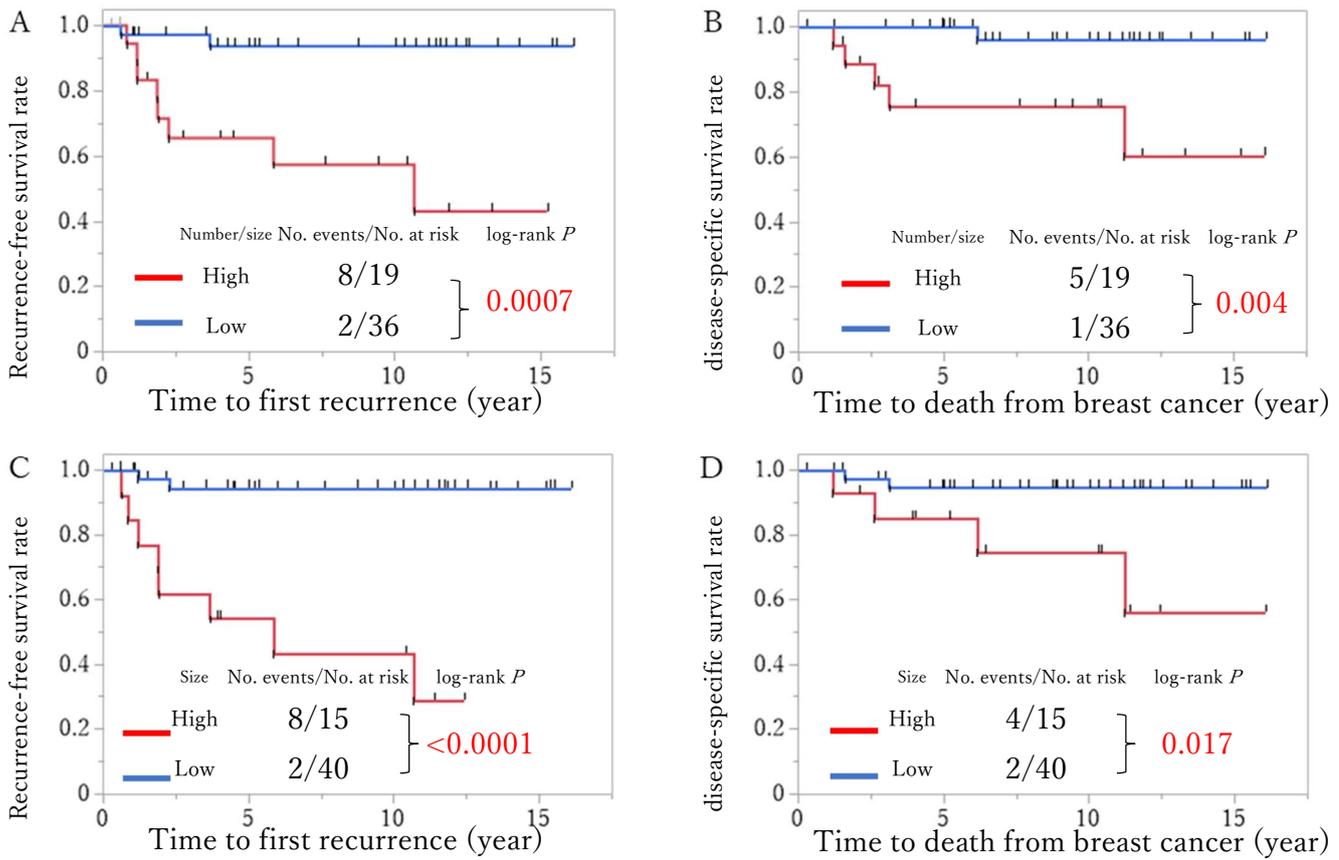


Figure 6. Kaplan-Meier curves of 55 patients with triple-negative breast cancer stratified by the status of abnormal pericentrin spots.

(A) ペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の RFS 曲線

(B) ペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の DSS 曲線

(C) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の RFS 曲線

(D) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の DSS 曲線

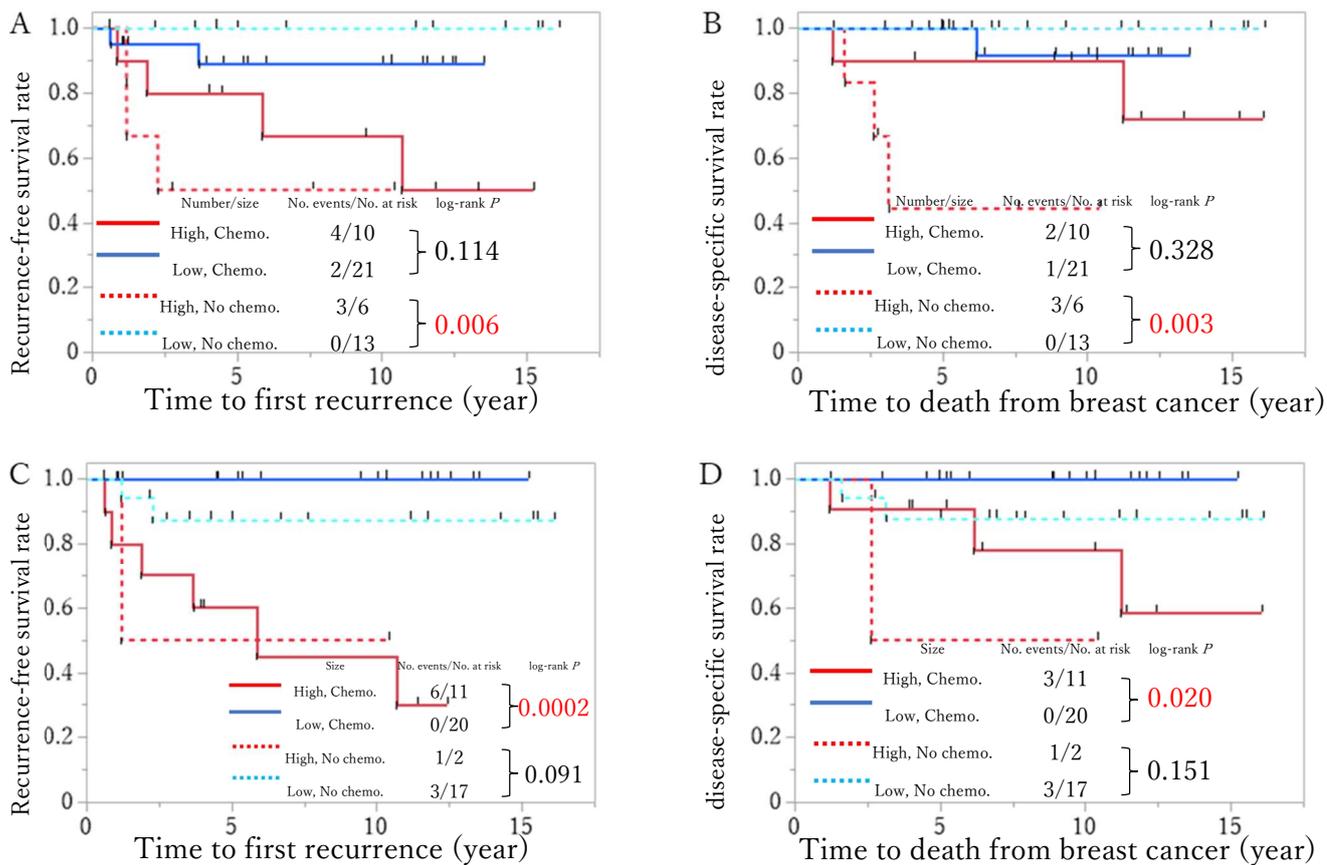


Figure 7. Kaplan-Meier curves of 50 patients with triple-negative breast cancer stratified by adjuvant chemotherapy and the statuses of abnormal pericentrin spots.

(A) 術後化学療法 施行群と未施行群の各々をペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群で層別化した RFS 曲線

(B) 術後化学療法 施行群と未施行群の各々をペリセントリンの数かつ/または大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群で層別化した DSS 曲線

(C) 術後化学療法 施行群と未施行群の各々をペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群で層別化した RFS 曲線

(D) 術後化学療法 施行群と未施行群の各々をペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群で層別化した DSS 曲線

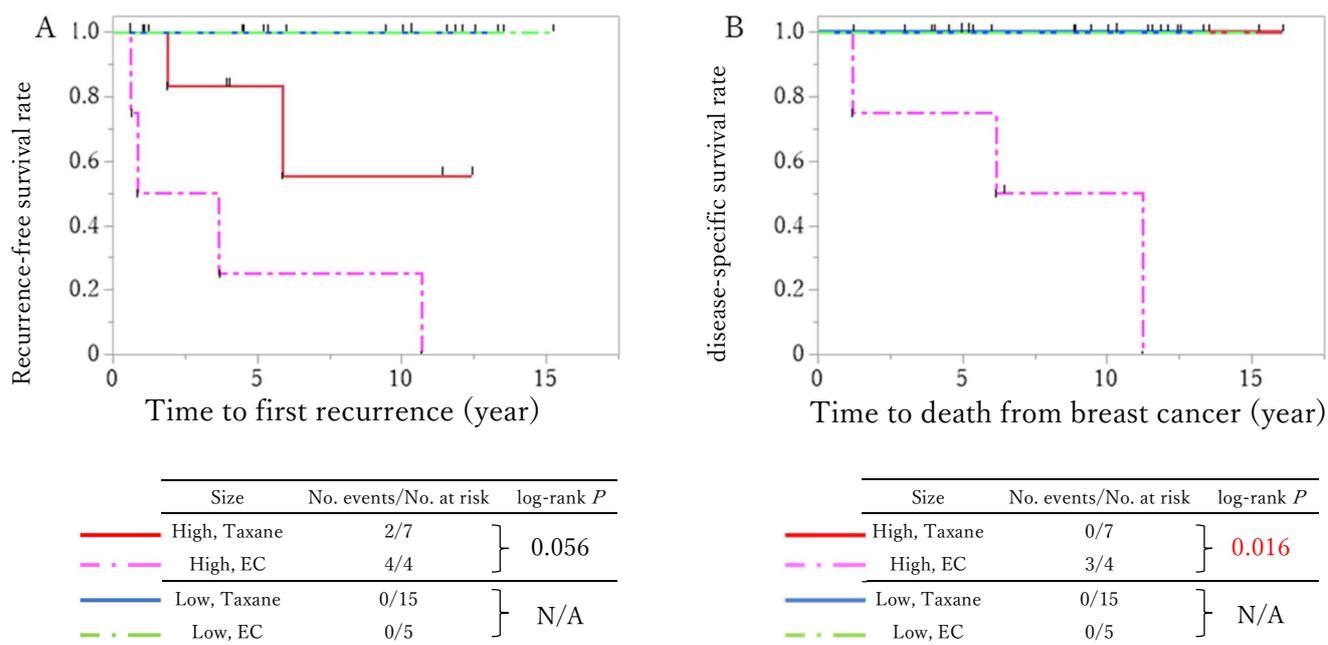


Figure 8. Kaplan-Meier curves of 31 patients with triple-negative breast cancer stratified by the statuses of abnormal pericentrin spots and adjuvant chemotherapy regimens.

(A) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の各々を術後化学療法のレジメンごとに層別化した RFS 曲線

(B) ペリセントリンの大きさの異常を有する細胞割合 高値群と低値群の各々を術後化学療法のレジメンごとに層別化した DSS 曲線

N/A, not applicable.

Table 1. Reagents and protocols in immunohistochemical analysis.

Protein	Host (Clone)	Antigen retrieval	Dilution	Autostainer	Cellular localization	Positive control
Ki-67	Rabbit monoclonal (SP6) (N)	Autoclave, 121°C 11 min, EDTA	Ready-to-use	manual	Nucleus	Colon cancer
D2-40	Mouse monoclonal (D2-40) (D)	Autoclave, 121°C 10 min, Sodium Citrate	1:100	manual	Cell membrane	Lymphatic vessels
Estrogen receptor	[2002-2011] Mouse monoclonal 1D5 (D)	Boil, 95°C 60 min, EDTA	1:50	manual	Nucleus	Breast cancer
	[2011-2013] Rabbit monoclonal (SP1) (N)	HEAT PRO II (N), 100°C 40 min, HEAT PROCESSOR solution pH9(N)	Ready-to-use	HISTOSTAINER48A (N)		
	[2013-] Rabbit monoclonal (SP1) (R)	(Auto. staining system) CC1 (R)	Ready-to-use	Ventana BenchMark XT(R)		
Progesterone receptor	[2002-2011] Mouse monoclonal PgR636 (D)	Boil, 95°C 60 min, EDTA	1:400	manual	Nucleus	Breast cancer
	[2011-2013] Mouse monoclonal (A9621A) (N)	HEAT PRO II (N), 100°C 40 min, HEAT PROCESSOR solution pH9(N)	Ready-to-use	HISTOSTAINER48A (N)		
	[2013-] Rabbit monoclonal (1E2) (R)	(Auto. staining system) CC1 (R)	Ready-to-use	Ventana BenchMark XT(R)		
HER2	[2002-2013] Rabbit polyclonal (D)	Boil, 95°C 60 min, EDTA	1:1000	manual	Cell membrane	Breast cancer
	[2013-] Rabbit monoclonal (4B5) (R)	(Auto. staining system) CC1 (R)	Ready-to-use	Ventana BenchMark XT(R)		

Manufacturer: (D), Dako, Glostrup, Denmark; (N), Nichirei, Tokyo, Japan; (R), Roche
Diagnostics, Basel, Switzerland

EDTA, 10mM TRIS-1mM EDTA, pH = 9; HER2, human epidermal growth factor receptor
2; Sodium Citrate, 10 mM Sodium Citrate-0.05% Tween 20, pH = 6

Table 2. Patient characteristics of 46 breast cancers subjected to pericentrin immunocytochemistry/immunofluorescence analysis

Parameter	No. of cases (%)		<i>P</i> -value [†]
	Triple negative* (n=19)	Luminal A-like** (n=27)	
Age (years)			
Mean ± SD	65.5 ± 11.5	63.6 ± 13.6	0.688
Mastectomy			
Partial	6(32)	7(26)	0.462
Total	13(68)	20(74)	
Histological classification			
IDC	13(68)	24(89)	0.090
Special type	6(32)	3(11)	
Pathological T(pT)			
pT1a	0(0)	1(4)	0.171
pT1b	1(5)	3(11)	
pT1c	6(32)	11(41)	
pT2	12(63)	12(44)	
Pathological N(pN)			
pN0	17(90)	21(77)	0.195
pN1mic	1(5)	1(4)	
pN1a	0(0)	5(19)	
pN2a	1(5)	0(0)	
Lymphatic invasion			
Negative	15(79)	19(70)	0.514
Positive	4(21)	8(30)	
Ki-67 labeling index (%)			
Mean ± SD	37.6 ± 19.3	5.1 ± 2.4	< 0.0001
Nuclear grade			
NG1	1(5)	15(56)	< 0.0001
NG2	2(11)	10(37)	
NG3	16(84)	2(7)	

IDC, invasive ductal carcinoma; SD, standard deviation

*Triple negative: ER(-)/PgR(-)/HER2(-), **Luminal A-like: ER(+)/PgR(+)/HER2(-)/Ki-67 labeling Index<14%

† comparison between triple negative and luminal A-like breast cancers

Table 3. Patient characteristics of 110 breast cancers subjected to pericentrin immunohistochemical analysis

Parameter	No. of cases		<i>P</i> -value [†]
	Triple negative* (n=55)	Luminal A-like** (n=55)	
Age (years)			
Mean ± SD	62.9 ± 10.2	62.8 ± 12.2	0.988
Mastectomy			
Partial	21(38)	17(31)	0.274
Total	34(62)	38(69)	
Histological classification			
IDC	46(84)	52(95)	0.062
Special type	9(16)	3(5)	
Pathological (pT)			
pT1a	1(2)	2(4)	0.126
pT1b	4(7)	6(11)	
pT1c	18(33)	22(40)	
pT2	32(58)	25(45)	
Pathological N(pN)			
pN0	43(77)	38(69)	0.131
pN1mic	2(4)	1(2)	
pN1a	8(15)	15(27)	
pN2a	2(4)	1(2)	
Lymphatic invasion			
Negative	29(53)	22(40)	0.165
Positive	26(47)	31(56)	
Ki-67 labeling index (%)			
Mean ± SD	39.1 ± 21.3	4.4 ± 2.8	< 0.0001
Nuclear grade			
NG1	1(2)	20(36)	< 0.0001
NG2	6(11)	26(48)	
NG3	48(87)	9(16)	

IDC, invasive ductal carcinoma; SD, standard deviation

*Triple negative: ER(-)/PgR(-)/HER2(-), **Luminal A-like: ER(+)/PgR(+)/HER2(-)/Ki-67 labeling Index<14%

† comparison between triple negative and luminal A-like breast cancers

Table 4. Percentage of cells with excess number of spots analyzed by ICC/IF

Cell type	Number of cases	Number of cells	Mean \pm SD	<i>P</i> -value
Normal breast epithelial cells	7	586	0	
Breast cancer cells	46	4,435	3.3 \pm 3.8	
Triple-negative	19	1,807	5.5 \pm 4.5	} 0.0009
Luminal A-like	27	2,628	1.7 \pm 2.1	

ICC/IF, immunocytochemistry/immunofluorescence; SD, standard deviation

Table 5. Comparisons of status of pericentrin spots between triple negative and luminal A-like breast cancer groups analyzed by IHC

Cell type	Number of cases	Number of cells	Mean \pm SD	<i>P</i> -value
A. Percentage of cells with excess number (≥ 3 spots) and/or increase in diameter ($\geq 2 \mu\text{m}$)				
Breast cancer cells	110	22,000	11.8 \pm 11.6	
Triple negative	55	11,000	20.8 \pm 10.2	} <i>< 0.0001</i>
Luminal A-like	55	11,000	2.8 \pm 2.1	
B. Percentage of cells with excess number (≥ 3 spots)				
Breast cancer cells	110	22,000	6.0 \pm 8.3	
(46*)		9,200	3.9 \pm 4.9	
Triple negative	55	11,000	11.2 \pm 9.1	} <i>< 0.0001</i>
Luminal A-like	55	11,000	0.8 \pm 0.9	
C. Percentage of cells with increase in diameter ($\geq 2 \mu\text{m}$)				
Breast cancer cells	110	22,000	5.9 \pm 6.1	
Triple negative	55	11,000	9.7 \pm 6.5	} <i>< 0.0001</i>
Luminal A-like	55	11,000	2.1 \pm 1.7	

ICC/IF, immunocytochemistry/immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; SD, standard deviation

*Forty-six cases that are identical with those analyzed by immunocytochemistry/immunofluorescence (ICC/IF).

Table 6. Relationship of percentage of cells with excess in number of pericentrin spots between ICC/IF and IHC in 46 breast cancers

Parameter	Number of cases (%)		<i>P</i> - value
	IHC		
	≧ Mean (3.9 %) (n=16)	< Mean (3.9 %) (n=30)	
ICC/IF			
≧ Mean (3.3 %)	11(65)	6(35)	} 0.002
< Mean (3.3 %)	5(17)	24(83)	

ICC/IF, immunocytochemistry/immunofluorescence

IHC, immunohistochemistry

Table 8. Relationship between the status of Feulgen-nuclear DNA contents and chromosome X abnormalities in 17 cases of TNBC

Parameter*	Number of cases (%)		<i>P</i> -value†
	Copy number of CEP X		
	Abnormal (n=10)	Normal (n=7)	
a. Range of the maximum peak			
2c	2(20)	5(72)	} } } } } 0.052
2cH	3(30)	0(0)	
3c	2(20)	1(14)	
Near 4c	3(30)	1(14)	
Over 4c	0(0)	0(0)	
b. Percentage of cells in the maximum peak range			
≥20%	2(20)	6(86)	0.013
<20%	8(80)	1(14)	
c. Number of peak(s)			
Only 1 peak	7(70)	6(86)	0.441
Multiple peaks	3(30)	1(14)	
d. The maximum range of peak(s)			
2c	1(10)	5(72)	} } } } } 0.018
2cH	2(20)	0(0)	
3c	3(30)	1(14)	
Near 4c	3(30)	1(14)	
Over 4c	1(10)	0(0)	

* Each DNA index classification is defined as $0.8 \leq 2c < 1.2$, $1.2 \leq 2cH < 1.4$, $1.4 \leq 3c < 1.6$, $1.6 \leq \text{near } 4c < 2.4$ and $2.4 \leq \text{over } 4c$.

† comparison between abnormal and normal groups

Table 9. Parameters of nuclear DNA content according to the status of abnormal pericentrin spots in 55 triple negative breast cancers

Parameter***	(A)* Pericentrin spots ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$			(B)** Pericentrin spots $\geq 2 \mu\text{m}$		
	Number of cases (%)			Number of cases (%)		
	High	Low	<i>P</i> -value†	High	Low	<i>P</i> -value†
	19(35)	36(65)		15(27)	40(73)	
a. Range of the maximum peak						
Near 2c						
2c	3(16)	13(36)	0.037	2(13)	14(35)	0.377
2cH	4(21)	9(25)		5(33)	8(20)	
3c	5(26)	6(17)		4(27)	7(17)	
Near 4c	4(21)	8(22)		4(27)	8(20)	
Over 4c	3(16)	0(0)		0(0)	3(8)	
b. Percentage of cells in the maximum peak range						
$\geq 20\%$	4(21)	20(56)	0.014	6(40)	18(45)	0.491
$<20\%$	15(79)	16(44)		9(60)	22(55)	
c. Number of peaks						
Only 1 peak	11(58)	31(86)	0.024	9(60)	33(83)	0.085
Multiple peaks	8(42)	5(14)		6(40)	17(17)	
d. The maximum range of peak(s)						
Near 2c						
2c	2(11)	13(36)	0.036	2(13)	13(33)	0.212
2cH	3(16)	7(19)		3(20)	7(17)	
3c	5(26)	6(17)		3(20)	8(20)	
Near 4c	5(26)	8(22)		6(40)	7(17)	
Over 4c	4(21)	2(6)		1(7)	5(13)	

*percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

**percentage of cells with $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

*** Each DNA index classification is defined as $0.8 \leq 2c < 1.2$, $1.2 \leq 2cH < 1.4$, $1.4 \leq 3c < 1.6$, $1.6 \leq \text{near } 4c < 2.4$ and $2.4 \leq \text{over } 4c$.

† comparison between high and low groups

Table 10. Patient characteristics according to the status of abnormal pericentrin spots in 110 breast cancers

Parameter	(A)*			(B)**		
	Pericentrin spots ≥ 3 spots and/or ≥ 2 μ m			Pericentrin spots ≥ 2 μ m		
	Number of cases (%)		<i>P</i> -value [†]	Number of cases (%)		<i>P</i> -value [†]
High (n=19)	Low (n=91)	High (n=15)		Low (n=95)		
Age						
Mean ± SD	64.4 ± 12.4	62.5 ± 11.0	0.365	60.1 ± 9.9	63.3 ± 11.4	0.252
Pathological T						
pT1a	0(0)	3(3)	0.072	0(0)	3(3)	0.132
pT1b	0(0)	10(11)		0(0)	10(11)	
pT1c	6(32)	34(38)		5(33)	35(37)	
pT2	13(68)	44(48)		10(67)	47(49)	
Pathological N factor						
pN0	12(63)	69(76)	0.118	11(73)	70(74)	0.494
pN1mic	0(0)	3(3)		0(0)	3(3)	
pN1a	6(32)	17(19)		3(20)	20(21)	
pN2a	1(5)	2(2)		1(7)	2(2)	
Lymphatic invasion						
Negative	6(32)	45(51)	0.105	4(27)	47(51)	0.074
Positive	13(68)	44(49)		11(73)	46(49)	
Nuclear grade						
1	0(0)	21(23)	<0.0001	0(0)	21(22)	<0.0001
2	1(5)	31(34)		0(0)	32(34)	
3	18(95)	39(43)		15(100)	42(44)	
Ki-67 labeling index (%)						
Mean ± SD	35.7 ± 20.2	18.8 ± 22.6	0.0002	44 ± 22.8	18.2 ± 21.1	<0.0001
Subtype						
Triple negative	19(100)	36(40)	<0.0001	15(100)	40(42)	<0.0001
Luminal A-like	0(0)	55(60)		0(0)	55(58)	

Histological classification

IDC	17(90)	81(90)		15(100)	83(88)	
Special, mucinous	0(0)	3(3)	} 0.655	0(0)	3(3)	} 0.155
Special, lobular	0(0)	1(1)		0(0)	1(1)	
Special, matrix-producing	1(5)	0(0)		0(0)	1(1)	
Special, medullary	0(0)	1(1)		0(0)	1(1)	
Special, apocrine	1(5)	4(4)		0(0)	5(5)	
Special, adenoid cystic	0(0)	1(1)		0(0)	1(1)	

Postoperative chemotherapy

With taxane	7(37)	17(19)	} 0.027	7(47)	17(18)	} 0.0003
With only EC	3(16)	11(12)		4(27)	10(11)	
No chemotherapy	6(31)	57(63)		2(13)	61(64)	
No data	3(16)	6(6)	excluded	2(13)	7(7)	excluded

EC, epirubicin and cyclophosphamide; IDC, invasive ductal carcinoma; SD, standard deviation

*percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

**percentage of cells with $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

† comparison between high and low groups

Table 11. Patient characteristics according to the status of abnormal pericentrin spots in 55 triple-negative breast cancers

Parameter	(A) *			(B)**		
	Pericentrin spots ≥ 3 spots and/or ≥ 2 μ m			Pericentrin spots ≥ 2 μ m		
	Number of cases (%)			Number of cases (%)		
	High (n=19)	Low (n=36)	<i>P</i> -value [†]	High (n=15)	Low (n=40)	<i>P</i> -value [†]
Age						
Mean ± SD	64.4 ± 12.4	62.2 ± 8.9	0.292	60.1 ± 9.9	64.0 ± 10.2	0.176
Pathological T						
pT1a	0(0)	1(3)	} 0.108	0(0)	1(2.5)	} 0.189
pT1b	0(0)	4(11)		0(0)	4(10)	
pT1c	6(32)	12(33)		5(33)	13(32.5)	
pT2	13(68)	19(53)		10(67)	22(55)	
Pathological N factor						
pN0	12(63)	31(85)	} 0.014	11(73)	32(80)	} 0.265
pN1mic	0(0)	2(6)		0(0)	2(5)	
pN1a	6(32)	2(6)		3(20)	5(12.5)	
pN2a	1(5)	1(3)		1(7)	1(2.5)	
Lymphatic invasion						
Negative	6(32)	23(64)	} 0.022	4(27)	25(62.5)	} 0.019
Positive	13(68)	13(36)		11(73)	15(37.5)	
Nuclear grade						
1	0(0)	1(3)	} 0.228	0(0)	1(2.5)	} 0.092
2	1(5)	5(14)		0(0)	6(15)	
3	18(95)	30(83)		15(100)	33(82.5)	
Ki-67 labeling index (%)						
Mean ± SD	35.7 ± 20.2	40.8 ± 21.9	0.376	44.1 ± 22.8	37.2 ± 20.6	0.354

Histological classification					
IDC	17(90)	29(80)		15(100)	31(77.5)
Special, lobular	0(0)	1(3)	} 0.330	0(0)	1(2.5)
Special, matrix-producing	1(5)	0(0)		0(0)	1(2.5)
Special, medullary	0(0)	1(3)		0(0)	1(2.5)
Special, apocrine	1(5)	4(11)		0(0)	5(12.5)
Special, adenoid cystic	0(0)	1(3)		0(0)	1(2.5)
					} 0.043
Postoperative chemotherapy					
With taxane	7(36)	15(41)	} 0.607	7(47)	15(37.5)
With only EC	3(16)	6(17)		4(27)	5(12.5)
No chemotherapy	6(32)	13(36)		2(13)	17(42.5)
No data	3(16)	2(6)	excluded	2(13)	3(7.5)
					} 0.049
					excluded

EC, epirubicin and cyclophosphamide; IDC, invasive ductal carcinoma; SD, standard deviation

*percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

**percentage of cells with $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

† comparison between high and low groups

Table 12. Cox univariate and multivariate analyses for recurrence-free survival in 110 breast cancer

Parameter (Favorable vs. Unfavorable)	Cox univariate		Cox multivariate ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}^*$		Cox multivariate $\geq 2 \mu\text{m}^{**}$	
	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value [†]	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value [†]	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value [†]
Age (≥ 60 vs. <60)	2.92 (0.62-13.7)	0.18				
Subtype (Triple-negative vs. Luminal A-like)	11.8 (1.50-92.9)	0.02				
Pathological T factor (pT2, pT3 vs. pT1)	1.21 (0.36-3.99)	0.75				
Nuclear grade (3 vs. 1, 2)	10.5 (1.35-82.4)	0.03				
Lymphatic invasion (Positive vs. Negative)	3.52 (0.75-16.5)	0.110				
Ki-67 labeling index (≥ 20 vs. <20)	10.2 (2.16-47.8)	0.003	6.43 (1.23-33.8)	0.028	4.24 (0.76-23.5)	0.098
Pathological N factor (pN2 vs. pN0, pN1)	4.79 (0.60-38.1)	0.139				
Percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots (High vs. Low)	17.8 (4.61-68.4)	<0.0001	12.5 (3.01-52.2)	0.0005		
Percentage of cells with $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots (High vs. Low)	36.1 (7.65-170.5)	<0.0001			21.3 (4.20-108.3)	0.0002
Adjuvant chemotherapy ^{††} (Chemo. vs. No chemo.)	4.0 (1.02-15.4)	0.047				

Chemo, chemotherapy; CI, confidence interval

*percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots**percentage of cells with $\geq 2 \mu\text{m}$ of pericentrin spots

† Wald test, †† tested in 101 patients

Table 13. Cox univariate analyses for recurrence-free survival in 55 triple-negative breast cancer

Parameter (Favorable vs. Unfavorable)	Univariate Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value †
Age (≥ 60 vs. <60)	2.10 (0.44-9.90)	0.349
Pathological T factor (pT2, pT3 vs. pT1)	1.23 (0.35-4.35)	0.752
Lymphatic invasion (Positive vs. Negative)	4.65 (0.98-21.9)	0.052
Ki-67 labeling index (≥ 20 vs. <20)	3.96 (0.50-31.5)	0.194
Pathological N factor (pN2 vs. pN0, pN1)	5.74 (0.66-49.6)	0.112
Percentage of cells with ≥ 3 spots and/or $\geq 2 \mu$ m of pericentrin spots (High vs. Low)	9.2 (1.95-43.5)	0.005
Percentage of cells with $\geq 2 \mu$ m of pericentrin spots (High vs. Low)	15.2 (3.21-71.5)	0.0006
Adjuvant chemotherapy* (No chemotherapy vs. Chemotherapy)	0.80 (0.19-3.19)	0.746
Chemotherapy with taxane** (No chemotherapy vs. with taxane)	1.61 (0.27-9.62)	0.604

CI, confidence interval

* tested in 50 TNBC, **tested in 41 TNBC, † Wald test

Nuclear grade was excluded from the parameters because 7 patients with NG1,2 did not have recurrent events.

Table 14. Patient characteristics in 10 recurrent triple negative breast cancers

	Age at surgery	Histological classification	pT	pN	NG	Ly	Ki-67 LI	$\cong 3$ spots / $\cong 2 \mu m^*$	$\cong 2 \mu m^{**}$	Range of the max. peak	% of cells in the max. peak range	Number of peak(s)	Max. range of peak(s)	Adjuvant chemotherapy	Time to first recurrence (year)	Site of recurrence	Time to death (observation period from surgery, year)
Case 1	66	IDC	pT1c	pN0	3	+	37.0	H	H	3c	<20%	1 peak	$\cong 3c$	With taxane	1.9	Residual breast	Alive (16.1)
Case 2	40	IDC	pT1c	pN1a	3	+	30.4	H	H	Near 2c	$\cong 20\%$	1 peak	\cong near 2c	With taxane	5.9	Pleura, distant lymph node	Alive (10.3)
Case 3	60	IDC	pT2	pN0	3	+	74.0	L	H	3c	<20%	1 peak	$\cong 3c$	EC only	0.6	Residual breast	Alive (6.4)
Case 4	64	IDC	pT2	pN0	3	+	75.8	H	H	3c	<20%	Multiple	over 4c	EC only	0.8	Bone, lung, liver, brain	1.2
Case 5	60	IDC	pT1c	pN0	3	+	41.6	L	H	Near 2c	<20%	Multiple	\cong near 4c	EC only	3.7	Lung, distant lymph node	6.2
Case 6	68	IDC	pT2	pN0	3	-	18.4	H	H	Near 4c	<20%	1 peak	\cong near 4c	EC only	10.7	Bone, chest wall, pleura, regional lymph node	11.2
Case 7	78	IDC	pT1c	pN0	3	+	24.1	H	L	Near 2c	<20%	1 peak	\cong near 2c	None	1.2	Lung, bone, liver, meninges, distant lymph node	1.6
Case 8	68	IDC	pT2	pN1a	3	+	40.1	H	H	Near 2c	<20%	Multiple	\cong near 4c	None	1.2	Liver	2.6
Case 9	80	Special, matrix-producing	pT2	pN0	3	-	29.7	H	L	3c	<20%	1 peak	$\cong 3c$	None	2.3	Lung	3.1
Case 10	46	IDC	pT2	pN2a	3	+	72.1	H	H	Near 4c	<20%	Multiple	\cong near 4c	No data	1.9	Pericardium, pleura	Alive (2.1)

H, high; IDC, invasive ductal carcinoma; L, low; LI, labeling index; Ly, Lymphatic invasion; max., maximum; NG, nuclear grade; -, negative; +, positive

*percentage of the cells with $\cong 2 \mu m$ of pericentrin spots, **percentage of the cells with $\cong 3$ spots and/or $\cong 2 \mu m$ of pericentrin spots