



## S100A14・A16の発現は乳癌の不良な予後と相関し、乳癌細胞の浸潤を促進する

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 瑞子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000093">https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000093</a>

S100A14・A16 の発現は乳癌の不良な予後と相関し、

乳癌細胞の浸潤を促進する

田中 瑞子

福島県立医科大学 大学院医学研究科

分子細胞病理学専攻

## 概要

**背景：** S100 ファミリータンパクは近年，癌のバイオマーカーや癌の進展に重要な役割を担う分子として注目されている．本研究は乳癌における S100A14・A16 発現の臨床的な意義や悪性形質との関連を明らかにすることを目的とした．

**方法：** 乳癌症例の検討では，手術標本 167 例における S100A14・A16 の発現を免疫組織化学法によって評価し，臨床病理学的因子及び予後との関連を検討した．実験的解析では，複数の乳癌細胞株を用いてその発現や細胞内局在を免疫蛍光染色によって解析し，さらに各分子の発現を siRNA を用いて発現抑制し細胞の増殖や浸潤，運動に与える影響を検討した．

**結果：** 乳癌症例 167 例の解析では，S100A14 は 88 例，S100A16 は 52 例において細胞膜に局在する強い発現を認め，両者の発現は有意に相関していた．これらのタンパクの高発現は低年齢，ER 陰性，HER2 陽性，さらに不良な予後と有意な相関を示した．乳癌細胞株 MCF7 を用いた実験的解析では，両タンパクは隣接する細胞との接着面と遊走先端部における接着斑に局在を示した．免疫蛍光染色及び免疫沈降法によって，S100A14 は F-actin に結合し，共局在することが示された．乳癌細胞株 MCF7，SK-BR-3 を用いた *in vitro* invasion assay 及び傷つけ assay では，S100A14・A16 のノックダウンにより細胞の浸潤能及び遊走能が著明に抑制された．

**結語:** 我々は S100A14・A16 の発現レベルが患者の不良な予後と相関することを明らかにした. 細胞株を用いた実験から両タンパクは F-actin と結合し細胞骨格系タンパクの動態を調節することで癌細胞の運動・浸潤を促進していることが示唆された. S100A14・A16 は乳癌の予後を予測するバイオマーカーとして, また治療の標的分子としての可能性が期待できる.

## 緒言

乳癌の発症率は世界的にも増加しており，女性の代表的な死亡原因の一つである [1]．多剤併用化学療法や **HER2** に対する分子標的治療薬であるトラスツズマブによって生存率は向上したが，未だ予後不良の症例が多い．そのため，患者の予後を正確に判定できるマーカーや，治療効果が高く副作用の少ない薬剤の開発が望まれており，標的となる新規分子の探索が課題である [2, 3]．

筆者の所属する研究室では、がん転移関連遺伝子探索プロジェクトとして マウスの乳癌モデルから低転移性及び高転移性の細胞株を分離し，両者に発現する遺伝子の比較解析を行ってきた。高転移株に特異的に高発現する分子を転移関連遺伝子候補として抽出し，機能や癌における発現を解析することによって，癌の新しいバイオマーカーや分子標的治療のターゲットを探索することを目的としている。本研究では，候補として挙げられた遺伝子産物のうち **S100A14** と **S100A16** に着目し，これらの分子発現の臨床的意義や悪性形質との関わりを解明した。

**S100A14**・**A16** の属する **S100** ファミリータンパクは，現在 **25** のメンバーから構成される。これらのタンパク群に共通する性質は分子的に **EF-hand** ドメインによりカルシウムに結合すること，他の分子とカルシウム依存性または非依存性に結合し得ることである。しかし，結合するタンパクが多様であるために生

体内における分布や、臓器・細胞特異的な発現パターンはそれぞれのメンバーによって大きく異なる [4]. その機能も、細胞の増殖や分化を調節するもの、細胞外に分泌されサイトカインとして働くものなど多種多様である. 癌との関わりについて現在までに報告されている S100 ファミリーのメンバーは、S100A1 [5], S100A2 [6, 7], S100A4 [8, 9], S100A6 [10], S100A7 [11, 12], S100A8/A9 [13], S100A11 [14], S100B [15], S100P [16]である. その中で特に、S100A4 を中心とした研究が多く、癌細胞の増殖、運動や上皮間葉移行などの調節に関わることで癌の転移や進展に重要な役割を担う分子として注目されている [17].

S100A14 は 2002 年にヒト肺癌細胞株からクローニングされた [18]. このタンパクは、正常組織では消化管、肝臓、膵臓、腎臓、肺、乳腺、子宮、前立腺、甲状腺、胸腺に発現している. 癌においては肺癌、乳癌、子宮癌では発現が亢進しているが、一方で大腸癌、直腸癌、腎癌では発現が減弱しているとされる [18].

S100A14 と癌患者の予後との相関についても対照的なデータがあり、大腸癌や小腸癌では高発現症例の予後が良好であるが、乳癌・肝癌においては高発現患者の不良な予後と相関すると報告されている [19-22]. S100A14 の癌における機能については、増殖や運動を促進するという報告が多いが、一部の癌では増殖を抑制するとされており、その分子メカニズムは十分に解明されていない [23-25].

S100A16 は、2004 年にアストロサイトーマから分離された分子である [26].

この分子に関する研究報告は脂質や糖，骨の代謝に関わるものが多い [27-29].  
しかし，S100A16 と癌との関連についての論文は極めて少なく，生体内に広く  
分布し，様々な癌でその発現が上昇しているという報告のみである [26]. また，  
S100A14 との相互作用が報告されているが [30, 31]，そのメカニズムについて  
はほとんど分かっていない.

本研究では S100A14・A16 発現と癌患者の予後を特に乳癌に絞って解析し，  
両タンパクの細胞膜での発現亢進が乳癌患者の予後を不良にするという結果を  
得た. 次に，これらの分子が不良な予後をもたらすメカニズムを明らかにするた  
めに，乳癌細胞株を用いて実験的な検討を行い，細胞における局在，分子間の相  
互作用，分子機能を検討した. この結果，我々は S100A14 及び A16 が乳癌細胞  
の悪性形質を促進することを見出した. 本論文では，乳癌における S100A14・  
A16 発現の臨床的な意義と悪性形質への分子的関わりについて述べる.

## 材料と方法

### 症例と検体

症例は 1990 年 1 月から 1996 年 12 月に福島県立医科大学付属病院にて原発性乳管癌と診断され乳房切除術または乳房部分切除術を施行された 167 例で、全例女性、手術時の年齢は 21 歳から 86 歳、平均年齢 52 歳である。手術標本のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて HE 染色及び免疫組織化学を行った。生存率については手術日を起算日として 10 年間の追跡調査を行い、累積生存率を Kaplan-Meier 法にて求めた。尚、本研究における人体組織の解析については福島県立医科大学倫理委員会により承認を得た（承認番号 1203）。

### 乳癌標本の免疫組織化学

乳癌の手術摘出標本は、抗 S100A14 (Sigma, St. Louis, MO, USA)、抗 S100A16 (Proteintech, Chicago, IL, USA) ポリクローナル抗体を一次抗体として酵素抗体法による免疫組織化学を行った。10%ホルマリン固定後のパラフィンブロックから 3  $\mu\text{m}$  に薄切したパラフィン切片を脱パラフィン後、10 %クエン酸バッファー (S100A14: pH 9.0, S100A16: pH 6.0)に浸漬し、マイクロウェーブ処理を 15 分間行い、抗原を賦活化した。一次抗体を 4 °Cで一晩反応させた後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン・ビオチンとヒストファイニン



プルステイン (共にニチレイ, 東京)を用いて反応させ diaminobenzidin (DAB, Dako, Glostrup, Denmark)で発色した. 核染色はヘマトキシリンを用いた.

## 細胞株

実験に用いた乳癌細胞株は MCF7, ZR75-1, SK-BR-3, MDA-MB231 (共に理化学研究所・バイオリソースセンター, 茨城)である. MCF7 と SK-BR-3 は 10%牛胎児血清 (FBS)添加 DMEM 培地, ZR-75-1 と MDA-MB231 は 10%FBS 添加 RPMI 1640 培地を用い, 37 °C, CO<sub>2</sub> 5%の条件下で培養を行った.

## リアルタイム RT-PCR 法

RNA は Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)により抽出し, cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて cDNA 合成を行った. 遺伝子の定量は Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 目的遺伝子のプライマーを用い, StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して増幅条件 95°C10 分(AmpliTaq Gold activation hot start), 95°C15 秒 / 60°C1 分を 40 サイクルで, リアルタイム PCR 法を行った. 使用したプライマーの配列を以下に示す.

S100A14 F: 5'-TCACCAAAGGACCAGGACACA-3',

R: 5'-CACAGTCTCTCCCAACACC-3'

S100A16 F: 5'-CAGGGAGATGTCAGACTGCTACAC-3'

R: 5'-CATCAGGCCAGTGCCTGGAA-3'

RNA 干渉(RNAi)による遺伝子ノックダウン

S100A14 及び A16 を標的とした siRNA 及びネガティブコントロール siRNA (Invitrogen) を使用した。24 ウェルプレート内の各ウェル内で 2 本鎖 siRNA 6 pmol を 0.1 ml の OptiMEM (Invitrogen) で希釈し、Lipofectamine RNAi MAX reagent (Invitrogen) を各ウェルに添加した。室温で 10 分静置した後、 $1 \times 10^5$  個/ml に調整した細胞懸濁液 0.5 ml を各ウェルに加えた。RNAi によるノックダウンの効果は、リアルタイム RT-PCR と、蛍光免疫法、Western blotting にて確認した。

細胞の増殖能、浸潤能及び運動能の測定

細胞増殖の測定には XTT assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた。96 ウェルプレートに細胞数  $3 \times 10^3$  個/well を播種し、10% BSA 含有 DMEM で培養した。48 時間後各ウェルに 50  $\mu$ l の XTT labeling mixture を添加し、37 °C でさらに 4 時間培養した後に、吸光度を microplate

reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて波長 490 nm で測定した。がん細胞の運動能及び浸潤能の解析はカルチャーインサートを用いた *in vitro* invasion assay と、傷つけ assay の 2 つの方法により行った。 *In vitro* invasion assay では、24 ウェルプレート用の BioCoat コントロール カルチャーインサート (pore size 8.0  $\mu\text{m}$ , BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を 8.7  $\mu\text{g}/\text{filter}$  のマトリゲルでコートし風乾した後、PBS で膨潤した。チャンバー上室には 10% FBS 添加 DMEM にて  $2 \times 10^5$  個/ml (MCF7),  $5 \times 10^4$  個/ml (SK-BR-3) に調整した細胞浮遊液を 0.2 ml, チャンバー下室には 10% FBS 添加 DMEM を 0.7 ml 入れ、37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5% の条件で培養した。48 時間培養後、ギムザ染色しフィルター下面に浸潤した細胞数を光学顕微鏡下にて計測した。傷つけ assay では、24 ウェルプレートの各ウェルに  $1 \times 10^5$  個/ml に調整した細胞浮遊液を 0.5 ml 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下で培養した。翌日 confluent になった単層の細胞に、200  $\mu\text{l}$  チップで同じ幅の傷をつけ、上記と同じ条件で培養を行った。傷つけ直後と 24 時間培養後の傷の幅を測定し、細胞の移動距離を算出した。

#### 免疫蛍光染色及びウェスタンブロッティング

細胞株の免疫蛍光染色のため、8 ウェルスライドチャンバー (BD) に細胞を播き、24~48 時間培養した。細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後、0.1 % Triton-X に室温で 5 分間浸漬し透過処理を行った。5 % スキムミルクに

浸漬し，室温で 1 時間ブロッキング反応を行い，一次抗体を 4℃で一晩反応させた．洗浄後，FITC 標識の 2 次抗体を室温で一時間反応させた．DAPI 添加封入材 (DAKO) で封入し，倒立位相差蛍光顕微鏡 (オリンパス，東京) 及びレーザー共焦点顕微鏡 (オリンパス) で観察した．使用した S100A14 及び A16 の一次抗体は免疫組織化学で用いたものと同様である．F-actin はローダミン標識ファロイジン (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて染色を行った．ウェスタンブロッティング法は Cell lysis reagent (Sigma) により培養細胞から抽出したタンパクを用いて行った．メルカプトエタノールで還元状態にしたサンプルを SDS-PAGE により 200 V で泳動後，PVDF トランスファーメンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) にブロッティングし，Immunoblot ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE healthcare, 東京) を用いて検出した．S100A14 と A16 の検出には免疫染色と同じ抗体，アクチンの検出には抗アクチンモノクローナル抗体 (Sigma) を使用した．

#### 免疫沈降法

S100A14 抗体 (ウサギ宿主)，コントロールとしてウサギ IgG (Sigma) をそれぞれ PBS で懸濁した Protein A sepharose ビーズ (GE healthcare) に添加し，室温で 2 時間反応させた．このビーズを DMP (dimethyl pimelimidate

dihydrochloride) 添加ホウ酸バッファーで懸濁し，室温で 30 分間架橋反応を行った後，0.1 M glycine-HCl (pH 2.8)で未反応抗体を除去した．ここに 1 % NP-40 添加 HEPES バッファーで希釈した細胞溶解液を加え，4 °Cで一晩抗原抗体反応を行った．洗浄後，0.1 M glycine-HCl (pH 2.0)で結合タンパクの溶出を行い，Western blotting で検出した．

#### 統計学的解析

統計学的解析は，因子間の解析について  $\chi^2$  検定及び Fisher の検定を行った．累積生存率は Kaplan-Meier 法で算出し，log-rank test を行った．予後予測因子については Cox の比例ハザードモデルで単変量及び多変量解析を行った．多変量解析の変数選択には変数増加法（尤度比）を用いた．統計ソフトは SPSS Statistics 21 (IBM)を使用し，危険率 5 % 未満をもって有意差ありと判定した．

## 結果

### 1. 乳癌症例における S100A14 及び S100A16 発現の臨床病理学的解析

#### 1) 乳癌摘出標本における S100A14・A16 の発現

正常乳管上皮において、S100A14・A16 はいずれも染色されないか、細胞質に限局する弱い染色のみであった (Fig. 1A, B). 間質では形質細胞に S100A14 の染色性がみられた. 一方、乳癌組織においては、半数程度の症例で細胞膜の全周を縁取るような染色像を示した (Fig. 1C-F). この染色パターンは、乳癌における HER2 の染色像と類似していることから、我々は American society of clinical oncology/college of American pathologists (ASCO / CAP) の HER2 検査ガイドライン[32]を参考に S100A14・A16 発現の評価基準を作成した (Table 1). まず、細胞膜が染色された腫瘍細胞の割合を 10%区切りでカウントした. 次に、その染色強度について intensity score (IS)を Score 2 (細胞膜が全周性に強く染色されている), Score 1 (全周性でない, または弱く染色されている), Score 0 (全く染色されていない) の 3 段階に分類した. 陽性細胞の割合 (%) と IS をかけた labeling index (LI) が、S100A14 については 100 以上、S100A16 については 40 以上のものを陽性 (+) と判定した. 乳癌手術標本 167 例中、S100A14 は 88 例、S100A16 は 52 例が陽性と判定された.

#### 2) S100A14・A16 の発現と臨床病理学的因子、予後との相関

S100A14 及び S100A16 の発現と臨床病理学的因子との関連を Table 2 に示す。S100A14 陽性は、患者の年齢 (60 歳未満,  $p=0.016$ ), ER 陰性 ( $p=0.014$ ), HER2 陽性 ( $p=0.001$ ) と有意に相関していた。

一方 S100A16 陽性は、低年齢 ( $p=0.002$ ), 腫瘍径 ( $p=0.009$ ), リンパ節転移 ( $p<0.001$ ), TNM stage ( $p=0.025$ ), ER 陰性 ( $p=0.025$ ), HER2 陽性 ( $p<0.001$ ) と相関していた。さらに、S100A14 陽性と S100A16 陽性は互いに相関していた ( $p<0.001$ )。

### 3) S100A14 及び S100A16 の発現と予後との相関

全 167 例のうち追跡調査が可能であったのは 147 例で、10 年生存率は 67.3% (99/147 例) であった。Kaplan-Meier 法により解析した累積生存率を Fig. 2 に示す。S100A14 陽性群の 10 年生存率は 53.3% で、陰性群の生存率 81.9% と比較して有意に低かった (Log-rank 法,  $p<0.001$ , Fig. 2A)。S100A16 陽性群の 10 年生存率は 53.3%, 陰性群 73.5% で有意差が認められた ( $p=0.011$ , Fig. 2B)。S100A14 陰性かつ S100A16 陰性症例(14-/16-) は 64 例, (14+/16-) は 38 例, (14-/16+) は 8 例, (14+/16+) は 36 例で、それぞれの群の 10 年生存率は 81.3%, 60.5%, 87.5%, 45.9% であり, (14+/16+) の症例が最も低く, 他の群との有意差が認められた ( $p<0.001$ , Fig. 2C)。Stage ごとの全生存率の解析では, S100A14 では Stage I および II, S100A16 では Stage I の症例にお

いて、陽性群の生存率が有意に低かった (Sup. Fig. 1, 2). 術後無再発期間について追跡できたのは 85 例で、10 年無再発生存率は 35.3% (30/85 例)であった. S100A14 陽性例では、陰性例と比較して術後から一時再発までの期間が有意に短かった( $p < 0.003$ , sup. fig.3).

#### 4) 多変量解析による S100A14・A16 の予後予測因子としての評価

S100A14 及び S100A16 に、一般的な乳癌の臨床病理学的予後因子 (年齢, 腫瘍径, リンパ節転移, 組織学的グレード, ER, PgR, HER2) を加えた 9 項目について Cox の比例ハザードモデルを用いて解析を行った. 単変量および多変量解析の結果を table 3 に示す. 多変量解析の結果, 組織学的グレード( $p < 0.001$ ), S100A14 ( $p < 0.001$ ), 及び PgR ( $p = 0.033$ )に有意差を認め, この 3 つが独立した予後予測因子として選択された. それぞれのハザード比は組織学的グレード (4.347), S100A14 (3.156), PgR (2.013)であった.

## 2. 乳癌細胞株を用いた S100A14・A16 の機能解析

### 1) 乳癌細胞株における S100A14・A16 の発現

代表的な 4 種の乳癌細胞株 MCF7, SK-BR-3, ZR75-1, MDA-MB-231 における S100A14 及び A16 mRNA の発現を リアルタイム RT-PCR を用いて解析した MCF7, SK-BR-3, ZR75-1 では S100A14・A16 とともに強い発現を認めた



が、MDA-MB-231 では S100A14 は発現せず S100A16 のみが発現していた (Fig. 3A). 次にタンパクレベルでの発現を解析するために、免疫蛍光染色を行った. S100A14・A16 タンパクともに MCF7, SK-BR-3, ZR75-1 では細胞膜に局在する発現が認められたが、MDA-MB-231 では発現が観察されなかった (Fig. 3B).

## 2) MCF7 における S100A14, S100A16 の細胞内局在

S100A14・A16 タンパクの細胞内局在をさらに詳細に調べるために、*in vitro* で高度の細胞極性を保持する細胞株 MCF7 を用いて免疫蛍光染色を行った. 隣接する細胞と接着する細胞では S100A14・A16 はともに、細胞間接着部の細胞膜に沿って連続性に観察された (Fig. 4A, C). さらにレーザー共焦点顕微鏡を用いた Z 軸方向の観察では、これらのタンパクは細胞の側方接着面に局在し、基底面や頂面にはほとんど認められなかった (Fig. 4B). また遊走細胞においては、その先端部の葉状仮足や接着斑に線状構造物としての局在が認められた (Fig. 4A). また、これらのタンパクの局在が細胞膜の外側か内側かの検討をするために、Triton X での透過処理の有無による免疫蛍光染色の違いを観察した. Triton X 処理をせず、抗体の膜透過性を阻害すると、S100A14・A16 ともに染色性が大幅に減弱したことから、これらの分子は細胞膜の内側に存在することが示唆された (Fig. 4C). さらに S100A14 と S100A16 の 2 重蛍光染色を行うと、両タンパクは細胞境界と遊走先端部のいずれにおいても局在部位が一致し、共局在

することが確認された (Fig. 5A).

### 3) S100A14 と S100A16 の相互作用

S100A14 と S100A16 の相互作用をみるため、siRNA を用いて MCF7 の一方の遺伝子をノックダウンし、他方の分子の発現や局在の変化を観察した。mRNA を定量したところ、いずれの siRNA もそのターゲット分子の発現のみを阻害し、他方の mRNA の発現量には影響を与えなかった (Fig. 5B)。次に、タンパク発現の相互作用を Western blotting で検討した。いずれの分子も、一方の発現を抑制することにより、他方のタンパク量が減少した (Fig. 5C)。免疫蛍光染色による観察では、S100A14 を発現抑制した MCF7 において、S100A16 タンパクの細胞膜への局在が失われ、細胞質に局在が移行していた。一方 S100A16 の発現抑制では S100A14 タンパクの発現が低下し、細胞膜、細胞質ともに染色性が著しく低下した (Fig. 5D)。

### 4) S100A14 と F-actin の相互作用

免疫蛍光染色において S100A14 は MCF7 の側方接着面と遊走先端部の葉状仮足に局在しており、特に接着斑に集中した発現パターンが特徴的であった。このような局在は細胞骨格成分の 1 つである actin filament と極めて類似している [33]。このため F-actin と S100A14 の二重染色を行ったところ、細胞間の接

着面，遊走先端部のいずれにおいても両者の局在はほぼ一致していた (Fig. 6A). S100A14 とアクチンの結合を証明するため，抗 S100A14 抗体を結合した Protein A Sepharose ビーズを用いて免疫沈降法を行った．その結果，S100A14 の結合タンパクとしてアクチンが同定された (Fig. 6B).

#### 5) S100A14・A16 の浸潤促進作用

S100A14・A16 の乳癌細胞における機能を解析するため，各分子に特異的な siRNA を導入した乳癌細胞株 MCF7 及び SK-BR-3 を用いて，細胞機能の変化を観察した．まず，*in vitro* における細胞増殖を解析するために XTT assay を行った．S100A14・A16 の siRNA を導入した MCF7 は，48 時間後に細胞数が有意に減少したが，その増殖抑制効果は 7 - 17% 程度であった．SK-BR-3 では siRNA 導入により 5-10% の増殖抑制がみられたが有意差は無かった (Fig. 7A). 次に浸潤能の解析のために行った *in vitro* invasion assay では，S100A14・A16 いずれのノックダウンによっても有意な浸潤抑制効果を示し，MCF7 ではチャンバー下面に浸潤した細胞が 65 - 84%，SK-BR-3 では 56 - 79% 減少した (Fig. 7B). S100A14 と A16 が同様の局在・機能を示すと推測されたことから実験対象を S100A14 に絞り，細胞の遊走/運動能を解析するために傷つけ assay を行った．その結果，S100A14 のノックダウンにより MCF7, SK-BR-3 はともに遊走能が有意に減弱した (Fig. 8 A, B).



## 考察

本研究により次のことが明らかになった。1) S100A14・A16 は乳癌において発現する症例と発現しない症例があり, 高発現症例は生存率が有意に低い。2) 乳癌における S100A14・A16 タンパクの発現に相互作用があり, 細胞膜への局在もほぼ一致する。3) 両タンパクは F-actin との結合を介してヒト乳癌細胞の運動や浸潤を促進する。これらの事象は S100A14・A16 が乳癌細胞の悪性形質に関わり, 乳癌患者の予後を不良にする作用があることを示している。それぞれの項目について考察する。

## 臨床病理学的検討について

今回我々は, S100A14 及び S100A16 が乳癌症例において一般的な臨床病理学的予後因子と一部で相関を示すこと, さらに各タンパクを高発現する症例の 10 年生存率が有意に低いことを報告した。これらの分子の発現と癌との関連を記した報告は S100A14 については多数みられるが [19-25, 34-41], S100A16 に関する報告はわずかである [39, 40, 42]。S100A14 の癌における発現は由来する臓器によって大きく異なり, 癌患者の予後との関連も癌の種類によって異なる。癌における S100A14 発現に関して多様な結果が出る要因は, この分子の属する S100 ファミリータンパクに共通する多様な分子特性によると推定される。S100 ファミリータンパクは EF-hand を持つカルシウム結合タンパクである。

り、そのメンバーの多くはカルシウム依存性または非依存性に複数の結合標的タンパクを有し、その結果として多様な機能を示すことが知られている [4].

S100A14 分子発現の多様性については3つの要因が考えられる。1つは、細胞内局在の多様性である。正常・腫瘍組織における S100A14 タンパクの細胞内局在は臓器によって大きく異なる (The Human Protein Atlas [43])。正常扁平上皮では細胞膜に限局して発現するが、腎尿細管上皮では細胞質に、また、大腸の腺窩上皮では膜と細胞質の両方に局在する。腫瘍組織でも臓器によって発現の頻度やレベルだけではなく、その局在部位も異なる。

S100A14 の第2の多様性はその結合ターゲット分子である。S100A14 が結合する分子として現在、receptor for advanced glycation end products (RAGE)が同定され、ERK 経路を介して増殖を促進すると報告されている [36]。本研究では乳癌において S100A14 が細胞膜直下のアクチン線維と結合して細胞運動を促進することを示した。これによってこの分子は現在のところ RAGE, F-actin の2つの標的タンパクに結合し、異なる経路で細胞機能に関わっていることが明らかになった。S100A14 がさらに他の分子と結合し得るかは今後の研究課題である。

第3の多様性は S100A14・A16 タンパクの相互作用と脆弱性である。本研究では S100A14・A16 の一方の遺伝子発現を抑制すると他方の分子は mRNA レ

ベルでは変動しないが、タンパクの膜局在の消失と発現量の低下が誘導されることを示した（後に詳述）。

このように、S100A14・A16は他のS100ファミリーのメンバーと同様、複数の結合ターゲットを持ち、分子局在や機能が多様であるため、臨床病理学的解析においてもその分子特性を加味した評価が求められる。我々の臨床病理学的解析では、パラフィン標本での免疫染色を用い、S100A14タンパクの膜への局在を指標として判定を行い、予後不良との相関を見出した。S100A14の多様な機能の中で、細胞膜に局在し、細胞運動との関連が推測されるS100A14の局在が乳癌の悪性度に強く関与していることが示唆される。

本研究では乳癌におけるS100A14・A16の発現は複数の予後不良因子と有意に相関していたが、特にHER2の過剰発現との相関が際だっていた。S100A14・A16とHER2との関連については現在のところ全く報告がなく、今後mRNAの発現調節やタンパクの局在等、分子間相互作用の解析が必要である。

我々が行ったHER2を含む9因子を用いた多変量解析ではS100A14は独立した予後因子であることが示された。ステージI、IIの比較的早期の症例や、無再発生存期間の解析においても陽性例で予後不良となることから、S100A14は乳がんの進展や再発に関与しており、患者の予後を予測する有用なバイオマーカーとなりうる分子であると考えられる。今回は約20年前の症例を対象とした

後ろ向き研究であり、術後化学療法に関する情報が十分に収集できなかった。現在、術前化学療法の効果や、選択した化学療法などを含めた治療との関連について解析を行っている。また S100 ファミリー分子は細胞外への分泌シグナル配列を持たないが、そのいくつかのメンバーは細胞外に分泌されることが知られている [44]。我々の研究では一部の乳癌患者の血清に S100A14 蛋白が検出されており（データ未掲載）、血清マーカーとしても応用できる可能性がある。

#### 実験的検討について

**1) S100A14・A16 タンパクの局在：**ヒト乳癌症例の免疫組織化学的解析では S100A14・A16 とも細胞膜の全周に沿った局在パターンが優勢であった。乳癌細胞でも両タンパクは細胞膜に局在するが、レーザー顕微鏡による Z 軸方向の観察ではこのタンパクは接着細胞の外側面に沿う線状の局在や遊走先端部の接着斑に集中する線維状の局在を示していた。このことはこれらのタンパクが細胞間接着分子やその裏打ちタンパクまたは細胞の遊走や運動に関わる細胞骨格系タンパクと密接な関係があることを示唆している。実際、免疫沈降法ではアクチンと共沈し、免疫蛍光染色では S100A14・A16 と F-actin との共局在が確認された。既述したように、S100A14 が結合する分子としては現在まで RAGE が知られている [36]。本研究では S100A14 が結合する第二のターゲットとして F-actin が同定された。S100A14 タンパクが乳癌の細胞膜に局在する要因とし



て、F-actin との結合が重要な役割を果たしていると考えられた。

**2) S100A14 と S100A16 の相互作用 :** S100A14 と S100A16 は細胞膜において共局在しているだけでなく、発現レベルや局在においても相互に影響を及ぼしている。MCF7 細胞では S100A14 と S100A16 の一方の発現を抑制すると他方の mRNA 発現は変化しないがタンパクレベルでは発現の減弱がみられた。さらに免疫蛍光染色ではパートナーを失ったタンパクは細胞膜から細胞質へ移行し、消失していくと考えられる像が観察された。Sapkota らは扁平上皮癌細胞において S100A14 と S100A16 は相互に結合し、S100A14 は S100A16 タンパク発現を翻訳後修飾により制御していると報告している [31]。S100A14 と S100A16 の結合や共存は両タンパクの細胞膜への局在と分子の安定性を保持するために重要であると考えられる。乳癌症例では S100A14 (+)/S100A16 (-) 症例 38 例に対して、S100A14 (-)/S100A16 (+) の症例が 8 例と極めて少なかったことも両分子の相互作用が関わっている可能性がある。両分子の相互依存度の違いを解明し、乳癌症例における陽性判定基準などに応用していく必要がある。

**3) S100A14・A16 の浸潤促進作用 :** 我々の siRNA を用いた実験では、S100A14・A16 とともにノックダウンによってヒト乳癌細胞の浸潤が抑制され、これらの分子に癌細胞の浸潤を促進する作用があることが証明された。癌細胞の浸潤は、細胞外基質への接着、基質の分解、運動能の促進の 3 つのステップから成るとされ

ている [45]. 我々の実験により S100A14 は F-actin との相互作用により細胞骨格を修飾して細胞の運動を活性化し、浸潤能を促進する可能性が示された. S100A14 が癌の浸潤を促進することはすでに報告があり、この分子が p53 依存性に matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の転写を促し、浸潤を促進するとしている [24]. S100A14 は他の S100 ファミリーのメンバーと同様に多機能であり、基質分解、運動能の促進など癌の悪性形質への関与のメカニズムも多様であるが、総じて癌の浸潤を促進する作用があることは一致している.

本研究において我々は、S100A16 にも浸潤促進機能があることを初めて報告した. S100A16 は、癌の悪性形質への関与を示唆する報告がわずかにあるのみで [46, 47]、浸潤に関する具体的な機序についての研究報告は無い. 乳癌症例における予後の解析及び細胞株を用いた解析では S100A16 と S100A14 の発現や局在が相関し、相互作用があったことから、S100A16 は S100A14 と共通した機序で浸潤を促進している可能性がある.

## 結語

我々は乳癌手術症例において S100A14 及び S100A16 の発現レベルが患者の予後不良と相関することを明らかにし、さらに細胞株を用いた実験でこれらの分子が癌細胞の運動、浸潤を促進することを実験的に示した. これらのタンパ

クは予後マーカーとして，また乳癌治療の新しい分子ターゲットとしての両方の可能性をもっており，さらなる研究と今後の臨床応用が期待される．

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切なお助言を賜り、また丁寧なご指導を頂いた静岡県立静岡がんセンター病理部 杉野隆先生、福島県立医科大学基礎病理学講座 千葉英樹教授に感謝いたします。

乳癌の症例研究にあたり、手術検体の提供と臨床情報の収集にご尽力頂いた福島県立医科大学器官制御外科学講座 竹之下誠一教授、大竹徹教授をはじめとする乳腺外科の先生方に感謝いたします。

そして、筆者が実験を施行するにあたって的確なお助言と技術的なご指導を賜りました基礎病理学講座 富川直樹講師、多くのご協力を頂いた同 MD-PhD 学生 穴戸奈美子さん、同 医療技師 穂積あゆみさん、三浦富子さんに心より感謝いたします。

## 文献

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
2. Galanina, N., V. Bossuyt, and L.N. Harris, *Molecular predictors of response to therapy for breast cancer*. Cancer J, 2011. **17**(2): p. 96-103.
3. Ellsworth, R.E., et al., *Breast cancer in the personal genomics era*. Curr Genomics, 2010. **11**(3): p. 146-61.
4. Santamaria-Kisiel, L., A.C. Rintala-Dempsey, and G.S. Shaw, *Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family*. Biochem J, 2006. **396**(2): p. 201-14.
5. Li, G., et al., *S100A1 and KIT gene expressions in common subtypes of renal tumours*. Eur J Surg Oncol, 2005. **31**(3): p. 299-303.
6. Feng, G., et al., *Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of human lung carcinogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7999-8004.
7. Liu, D., et al., *Expression of calcium-binding protein S100A2 in breast lesions*. Br J Cancer, 2000. **83**(11): p. 1473-9.
8. Boye, K. and G.M. Maelandsmo, *S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles*. Am J Pathol, 2010. **176**(2): p. 528-35.
9. Mishra, S.K., H.R. Siddique, and M. Saleem, *S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(1-2): p. 163-72.
10. Lesniak, W., L.P. Slomnicki, and A. Filipek, *S100A6 - new facts and features*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1087-92.
11. Emberley, E.D., L.C. Murphy, and P.H. Watson, *S100A7 and the progression of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(4): p. 153-9.
12. Moubayed, N., et al., *Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. **133**(4): p. 253-61.
13. Arai, K., et al., *S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 243-52.
14. Liu, X.G., et al., *Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A11: a novel diagnostic marker for breast carcinoma*. Oncol Rep, 2010. **23**(5): p. 1301-8.
15. Harpio, R. and R. Einarsson, *S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma*. Clin Biochem, 2004. **37**(7): p. 512-8.
16. Jiang, H., et al., *Calcium-binding protein S100P and cancer: mechanisms and clinical*

- relevance*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(1): p. 1-9.
17. Salama, I., et al., *A review of the S100 proteins in cancer*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(4): p. 357-64.
  18. Pietas, A., et al., *Molecular cloning and characterization of the human S100A14 gene encoding a novel member of the S100 family*. Genomics, 2002. **79**(4): p. 513-22.
  19. Kim, G., et al., *Loss of S100A14 expression is associated with the progression of adenocarcinomas of the small intestine*. Pathobiology, 2013. **80**(2): p. 95-101.
  20. Wang, H.Y., et al., *Expression status of S100A14 and S100A4 correlates with metastatic potential and clinical outcome in colorectal cancer after surgery*. Oncol Rep, 2010. **23**(1): p. 45-52.
  21. McKiernan, E., et al., *The role of S100 genes in breast cancer progression*. Tumour Biol, 2011. **32**(3): p. 441-50.
  22. Zhao, F.T., et al., *S100A14 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(6): p. 3831-6.
  23. Chen, H., et al., *Functional role of S100A14 genetic variants and their association with esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3451-7.
  24. Chen, H., et al., *Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2012. **287**(21): p. 17109-19.
  25. Sapkota, D., et al., *S100A14 regulates the invasive potential of oral squamous cell carcinoma derived cell-lines in vitro by modulating expression of matrix metalloproteinases, MMP1 and MMP9*. Eur J Cancer, 2011. **47**(4): p. 600-10.
  26. Marenholz, I. and C.W. Heizmann, *S100A16, a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(2): p. 237-44.
  27. Liu, Y., et al., *Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells*. Endocrinology, 2011. **152**(3): p. 903-11.
  28. Zhang, R., et al., *S100A16 mediation of weight gain attenuation induced by dietary calcium*. Metabolism, 2012. **61**(2): p. 157-63.
  29. Li, D., et al., *S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(5): p. 3465-73.
  30. Rual, J.F., et al., *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1173-8.
  31. Sapkota, D., et al., *S100A14 Interacts with S100A16 and Regulates Its Expression in Human Cancer Cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76058.
  32. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American*

- Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.* Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(1): p. 18-43.
33. Hu, K., et al., *Differential transmission of actin motion within focal adhesions.* Science, 2007. **315**(5808): p. 111-5.
  34. Folgueira, M.A., et al., *Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer.* Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(8): p. 1101-13.
  35. Ji, J., et al., *Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(8): p. 480-6.
  36. Jin, Q., et al., *S100A14 stimulates cell proliferation and induces cell apoptosis at different concentrations via receptor for advanced glycation end products (RAGE).* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19375.
  37. Sapkota, D., et al., *Expression profile of the S100 gene family members in oral squamous cell carcinomas.* J Oral Pathol Med, 2008. **37**(10): p. 607-15.
  38. Sapkota, D., et al., *S100A14 inhibits proliferation of oral carcinoma derived cells through G1-arrest.* Oral Oncol, 2012. **48**(3): p. 219-25.
  39. Smirnov, D.A., et al., *Global gene expression profiling of circulating tumor cells.* Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 4993-7.
  40. Yao, R., et al., *Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors.* Anticancer Res, 2007. **27**(5A): p. 3051-8.
  41. Leth-Larsen, R., et al., *Functional heterogeneity within the CD44 high human breast cancer stem cell-like compartment reveals a gene signature predictive of distant metastasis.* Mol Med, 2012. **18**: p. 1109-21.
  42. Valladares-Ayerbes, M., et al., *Bioinformatics approach to mRNA markers discovery for detection of circulating tumor cells in patients with gastrointestinal cancer.* Cancer Detect Prev, 2008. **32**(3): p. 236-50.
  43. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
  44. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins.* Microsc Res Tech, 2003. **60**(6): p. 540-51.
  45. Liotta, L.A., *Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture.* Cancer Res, 1986. **46**(1): p. 1-7.
  46. Bianchi, L., et al., *Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction.* Proteomics, 2005. **5**(9): p. 2433-42.
  47. Szeliga, M., et al., *Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells.* Glia, 2009. **57**(9): p. 1014-23.





## 図説明

**Figure 1:** ヒト乳腺組織における S100A14・A16 の免疫組織化学. A), B) 正常乳腺組織では S100A14・A16 はいずれも乳管上皮にほとんど染色されなかった. C), D) 一方で S100A14 または A16 が細胞膜に強く染色される乳癌症例. E), F) S100A14 または S100A16 陰性の乳癌症例.

**Figure 2:** 乳癌患者の予後(全生存率)についての Kaplan-Meier 解析. A) S100A14 発現の有無による患者の予後. B) S100A16 発現の有無による患者の予後. C) S100A14 と S100A16 発現の有無により 4 群に分けた場合の患者の予後. 統計学的有意差の検定には Log-rank 法を用いた.

**Figure 3:** 乳癌細胞株 MCF7, SK-BR-3, ZR75-1, MDA-MB-231 における S100A14・A16 の発現. A) Real-time RT-PCR 法による mRNA の発現. S100A14・A16 の mRNA 発現量は GAPDH の mRNA 発現量により標準化した. 誤差範囲は同一検体で実験を 3 回繰り返した平均を反映している. B) 免疫蛍光染色によるタンパクの局在と発現. MCF7, SK-BR-3, ZR75-1 は S100A14・A16 タンパクともに細胞膜に局在する発現が認められたが, MDA-MB-231 は S100A14・A16 ともに発現が観察されなかった.

**Figure 4:** MCF7 の蛍光免疫染色. A) S100A14・A16 はともに細胞間接着部の細胞膜と遊走先端部の葉状仮足や接着斑に局在が認められた. B) レーザー共焦点顕微鏡を用いた観察では, これらのタンパクは細胞の側方接着面に局在し, 基底面や頂面にはほとんど認められなかった. C) Triton X 処理を省略し, 抗体

の膜透過性を阻害すると、S100A14・A16ともに染色性が大幅に減弱した。

**Figure 5: MCF7 における S100A14 と S100A16 の相互作用.** A) S100A14 と S100A16 の二重蛍光染色. 両タンパクは細胞境界と遊走先端部のいずれにおいても局在部位が一致していた. B) siRNA を用いた各遺伝子のノックダウンによる mRNA の変動. S100A14・A16 いずれの siRNA もそのターゲットの発現のみを阻害し、もう一方の mRNA の発現量には影響を与えなかった. S100A14・A16 の mRNA 発現量は GAPDH の mRNA 発現量により標準化した. 誤差範囲は同一検体で実験を 3 回繰り返した平均を反映している. C) siRNA を用いた各遺伝子のノックダウンによるタンパクの変動. S100A14・A16 のいずれか一方の発現を抑制すると、他方のタンパク量が減少した. D) 免疫蛍光染色によるタンパク局在の変化. 一方のタンパクの発現抑制により、他方のタンパクは細胞膜から細胞質に局在が移行し、タンパクの発現が低下した.

**Figure 6: MCF7 における S100A14 とアクチンの相互作用.** A) F-actin と S100A14 の蛍光二重染色. 両者の局在は細胞間の接着面、遊走先端部のいずれにおいてもほぼ一致していた. B) 抗 S100A14 抗体を用いた免疫沈降法. S100A14 の結合タンパクとしてアクチンが同定された.

**Figure 7: MCF7, SK-BR-3 の増殖能、浸潤能に対する S100A14・A16 ノックダウンの影響** A) XTT assay. S100A14・A16 各々に対する siRNA を導入した後、96 ウェルプレートに細胞数  $3 \times 10^3$ /well を播種し、48 時間後各ウェルに 50  $\mu$ l の XTT labeling mixture を添加し、さらに 4 時間培養した後に、吸光度を microplate reader (Bio-Rad) にて 490 nm で測定した. B) in vitro invasion

assay. マトリゲルをコートした pore size 8.0  $\mu\text{m}$  のチャンバーに 40,000 個 (MCF7), 10,000 個 (SK-BR-3) の細胞を入れ, 48 時間後の通過細胞数をカウントした. S100A14・A16 ノックダウンによって, チャンバー下面に浸潤した細胞が MCF7 では 65 - 84%, SK-BR-3 では 56 - 79% 減少し, 浸潤抑制効果が認められた.

**Figure 8: MCF7, SK-BR-3 の遊走能に対する S100A14 ノックダウンの影響.**

A), B) 傷つけアッセイ. 24 ウェルのプレートにコンフルエントになった細胞に傷をつけ, 24 時間後にその幅を計測し, 細胞の遊走速度を計算した. S100A14 のノックダウンにより MCF7, SK-BR-3 はともに遊走能が有意に減弱した. 誤差範囲は同一検体で実験を 3 回繰り返した平均を反映している. 統計学的有意差の検定には Student's *t*-test を行った.

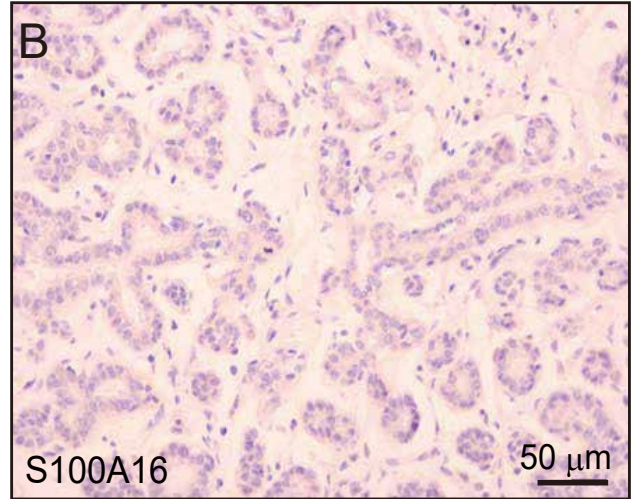
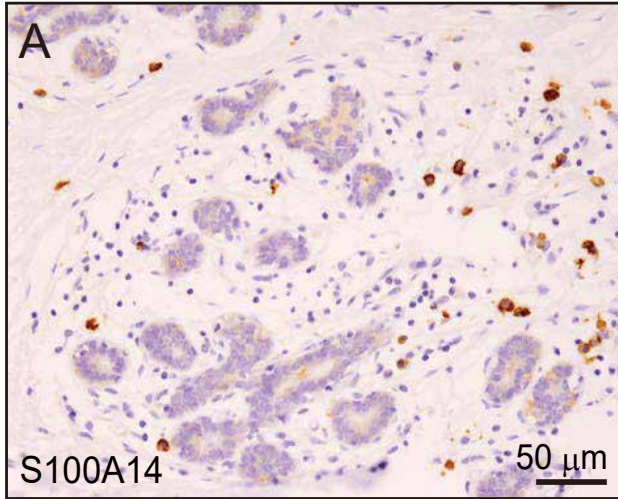
**Supplemental figure 1** : S100A14 発現の有無による乳癌患者の予後(全生存率) についてのステージ別の **Kaplan-Meier** 解析. 統計学的有意差の検定には Log-rank 法を用いた.

**Supplemental figure 2** : S100A16 発現の有無による乳癌患者の予後(全生存率) についてのステージ別の **Kaplan-Meier** 解析. 統計学的有意差の検定には Log-rank 法を用いた.

**Supplemental figure 3** : S100A14 発現の有無による乳癌患者の予後(無再発生存率)についての **Kaplan-Meier** 解析. A) S100A14 発現の有無による患者の予後. B) S100A16 発現の有無による患者の予後. C) S100A14 と S100A16 発現の有無により 4 群に分けた場合の患者の予後. 統計学的有意差の検定には Log-rank 法を用いた. 統計学的有意差の検定には Log-rank 法を用いた.

Figure 1

Normal breast



Breast cancer

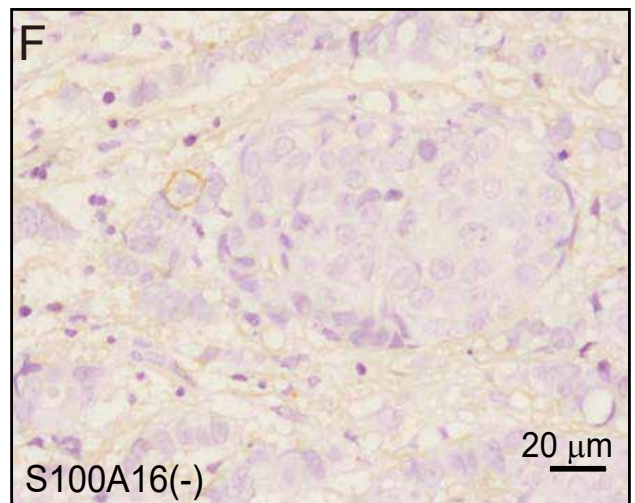
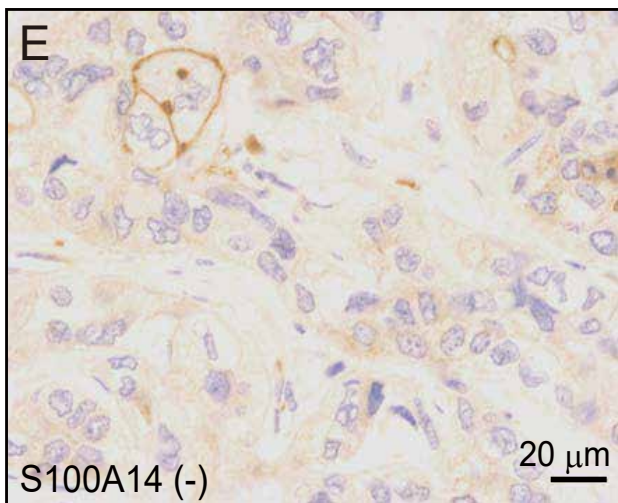
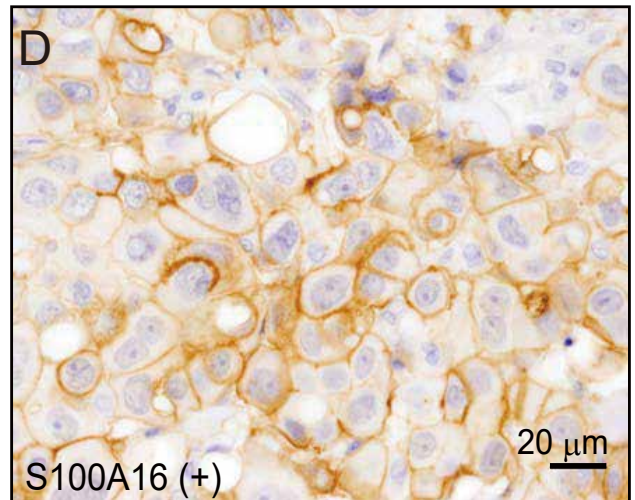
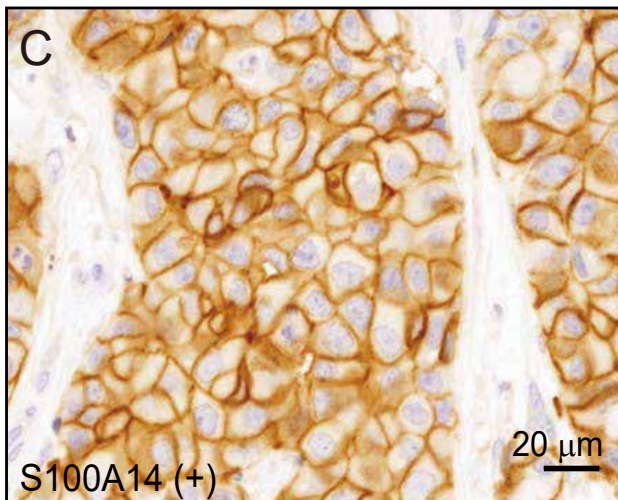


Figure 2

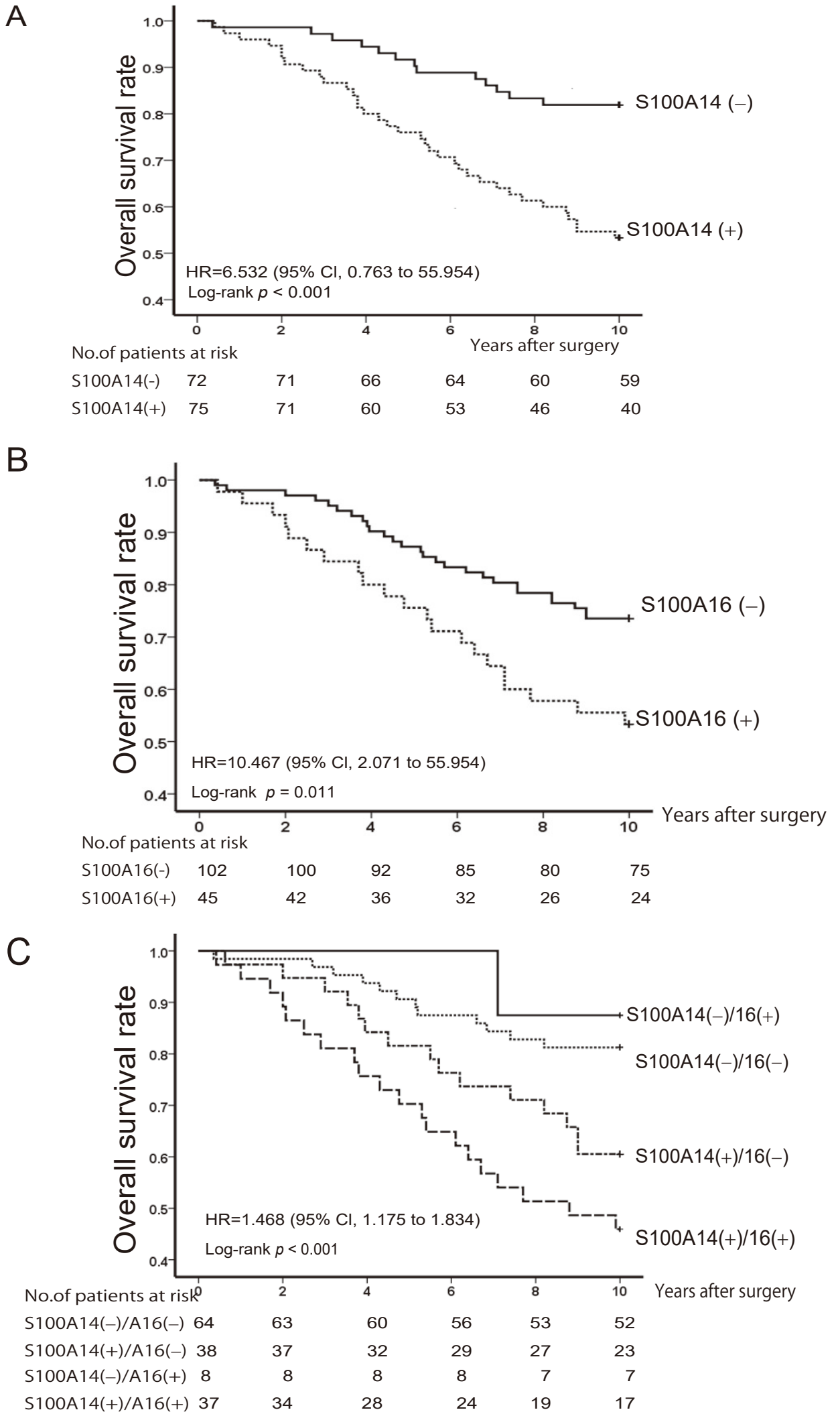
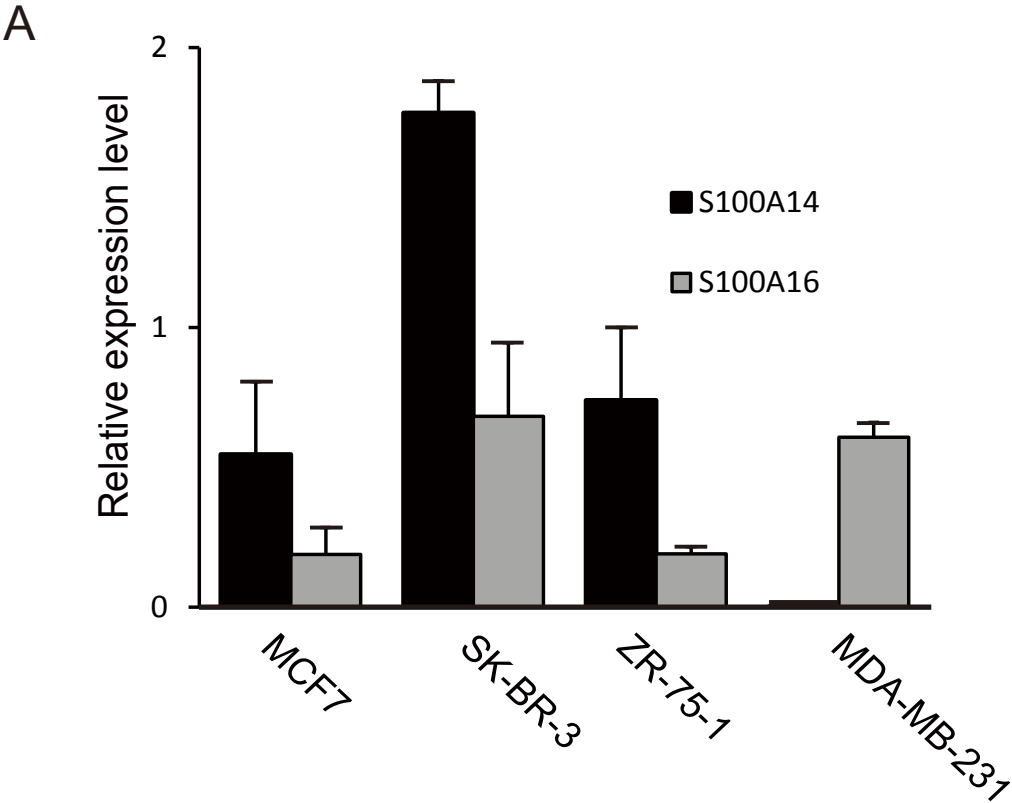


Figure 3



**B**

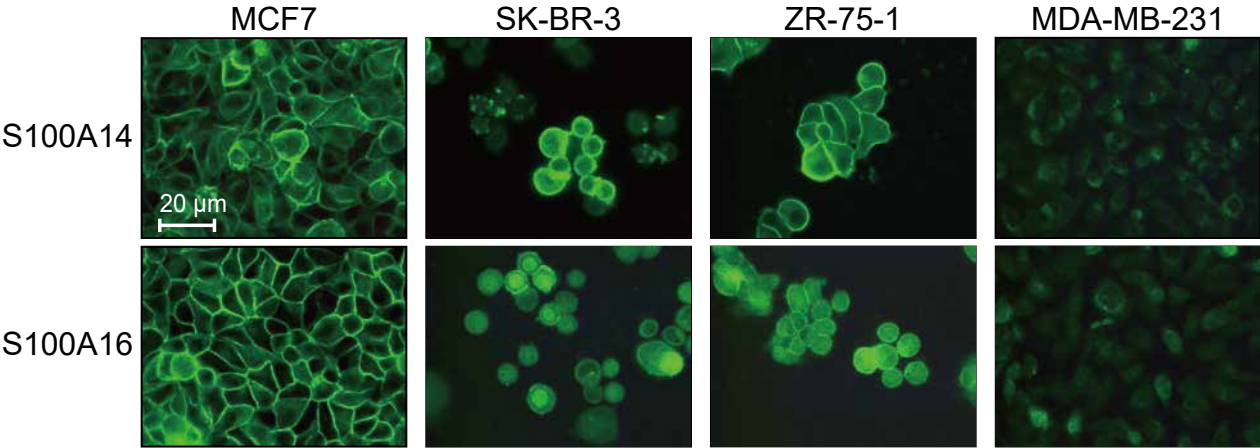


Figure 4

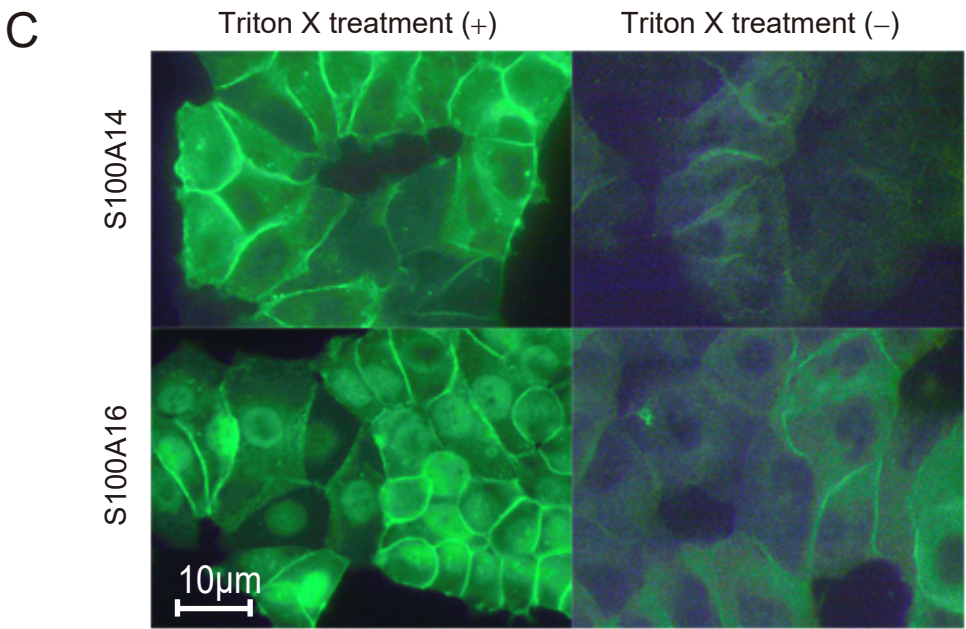
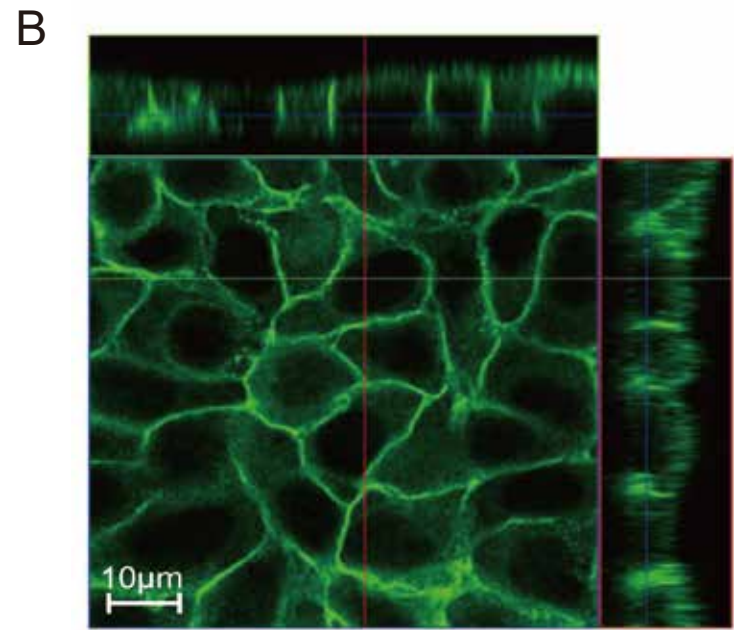
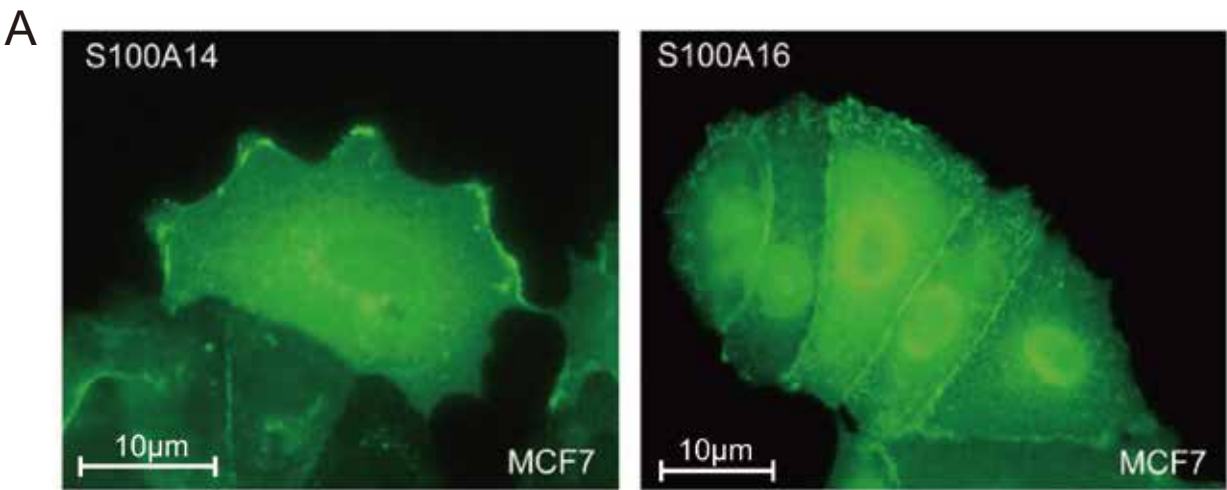
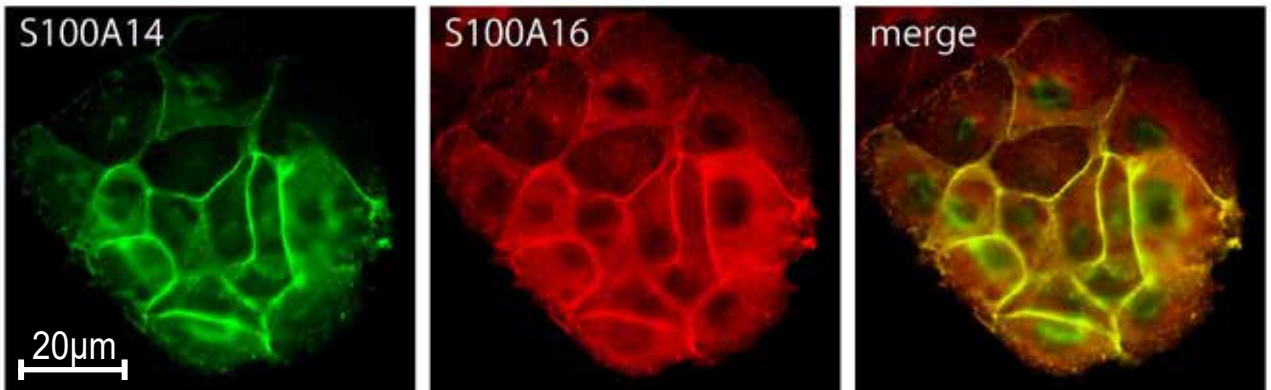


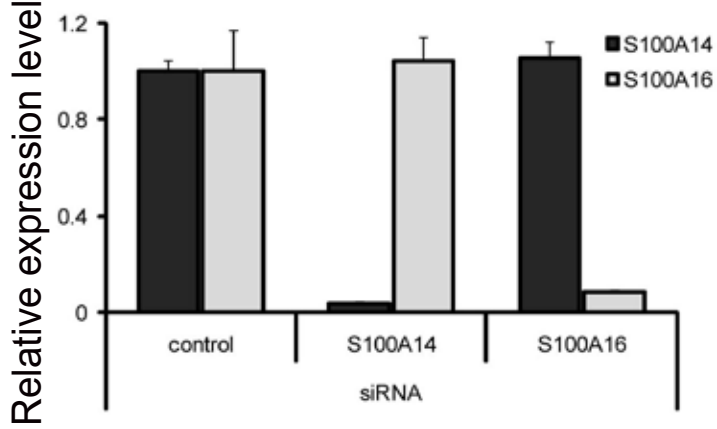


Figure 5

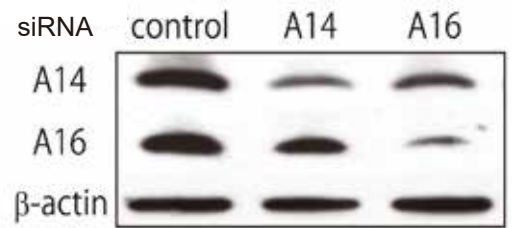
A



B



C



D

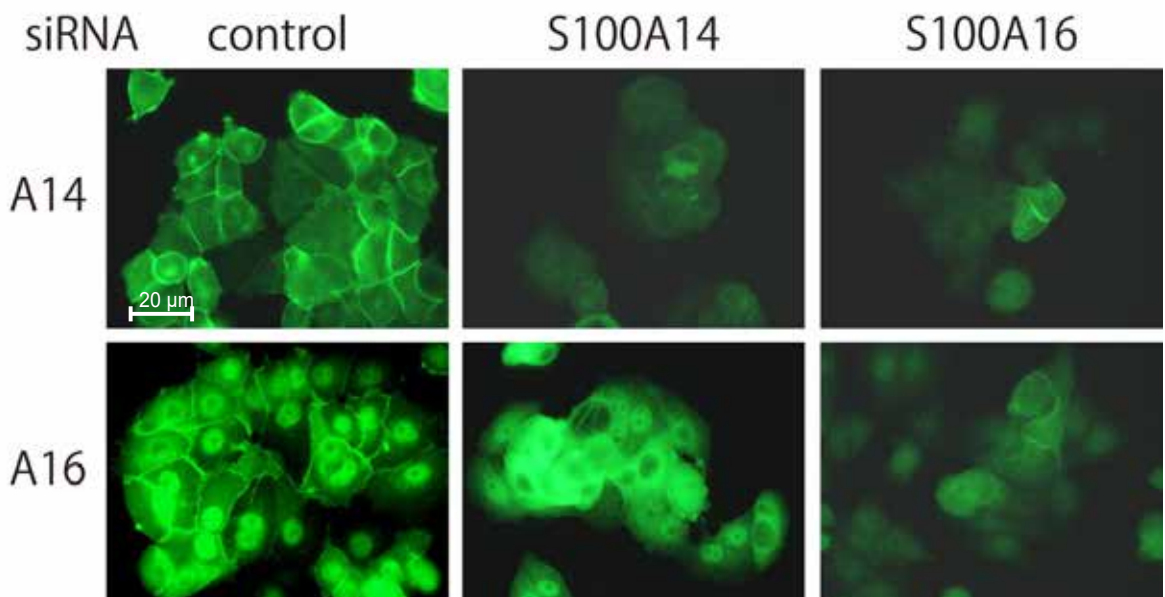
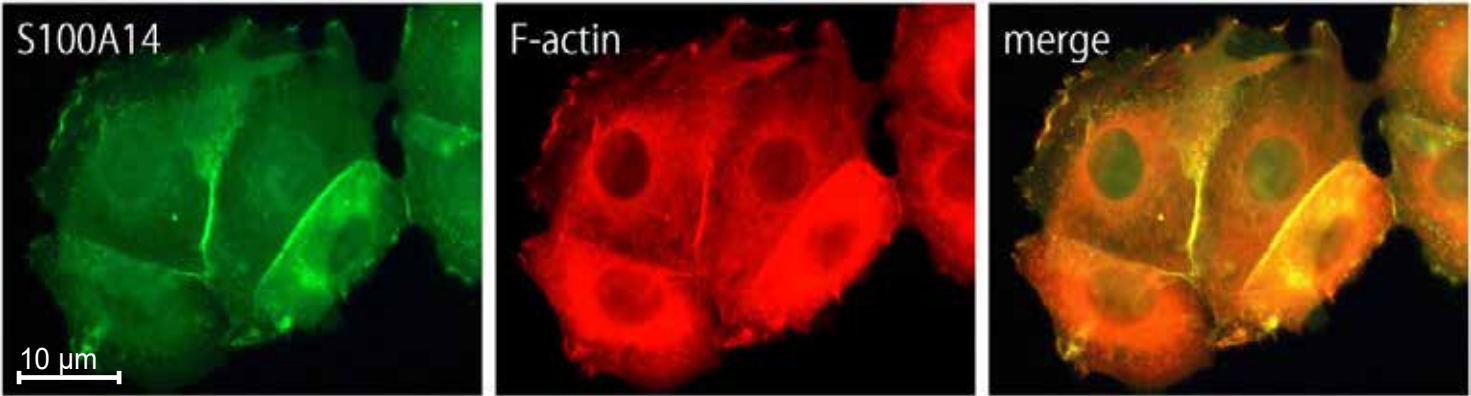


Figure 6

A



B

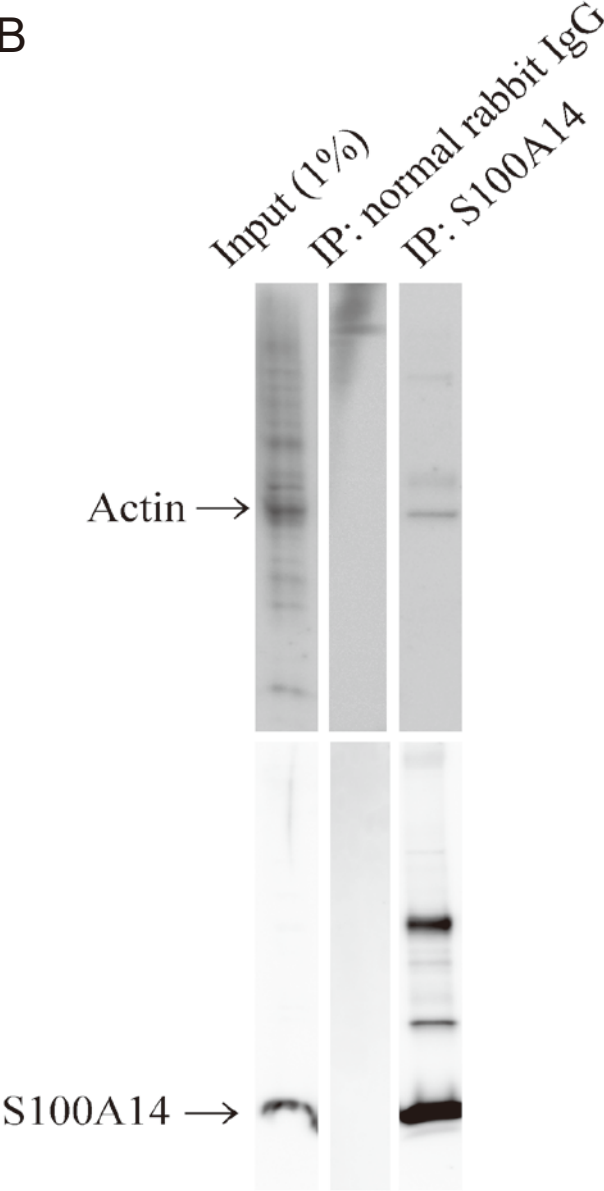
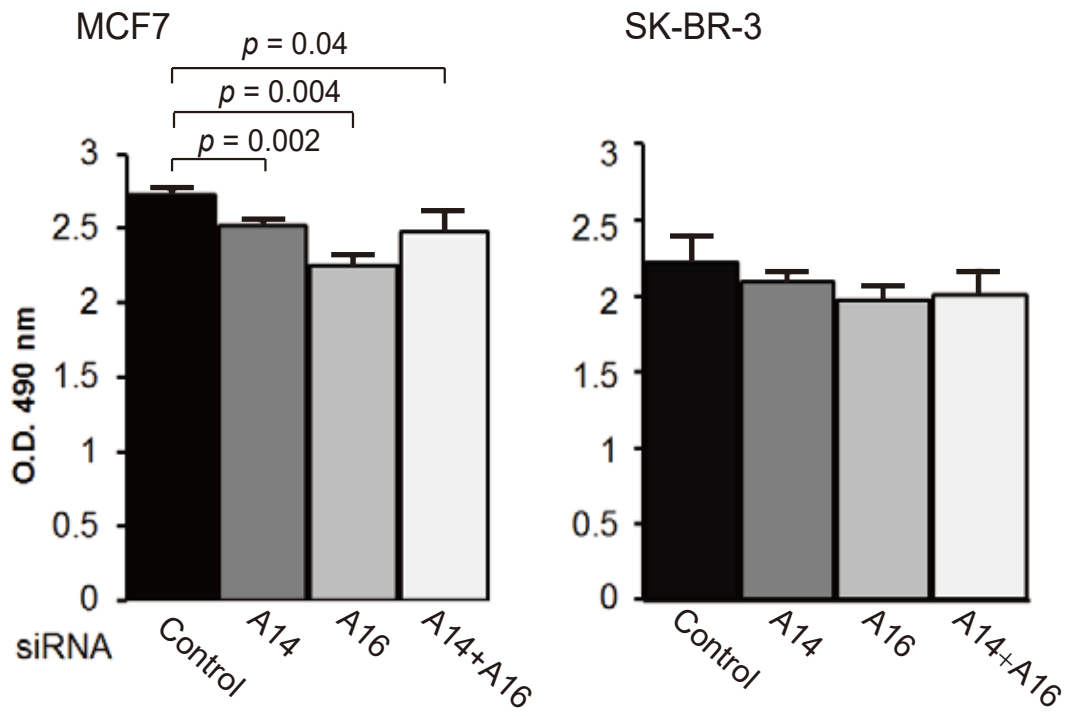


Figure 7

A



B

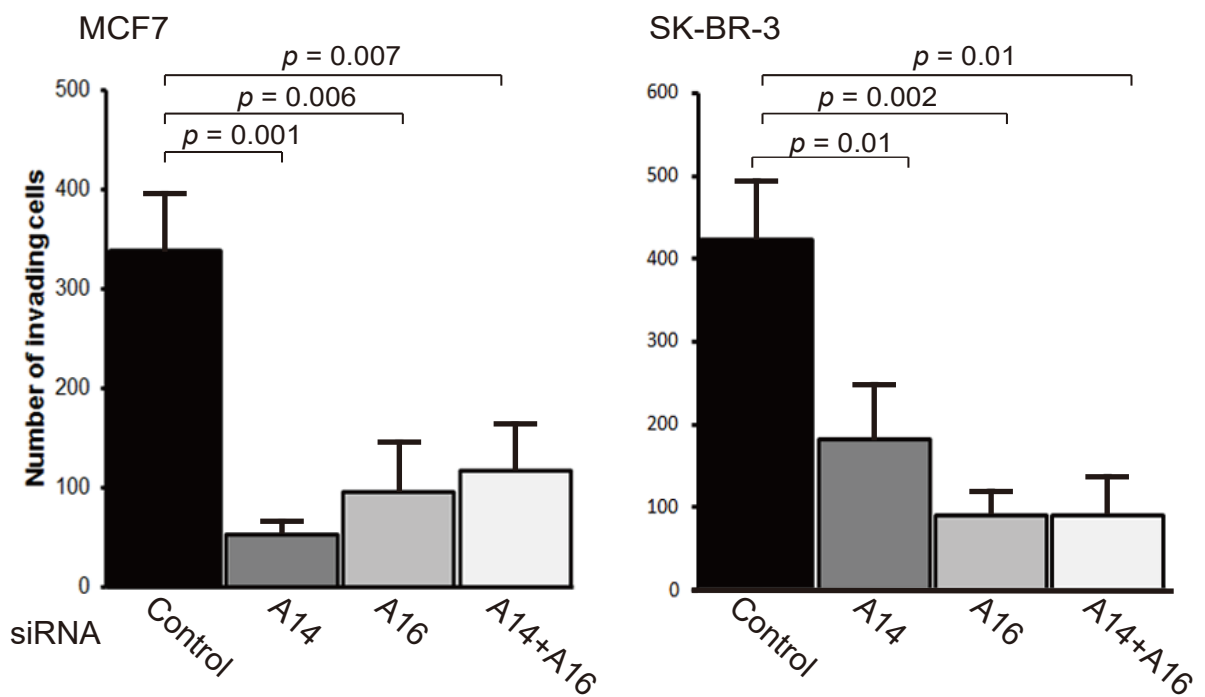
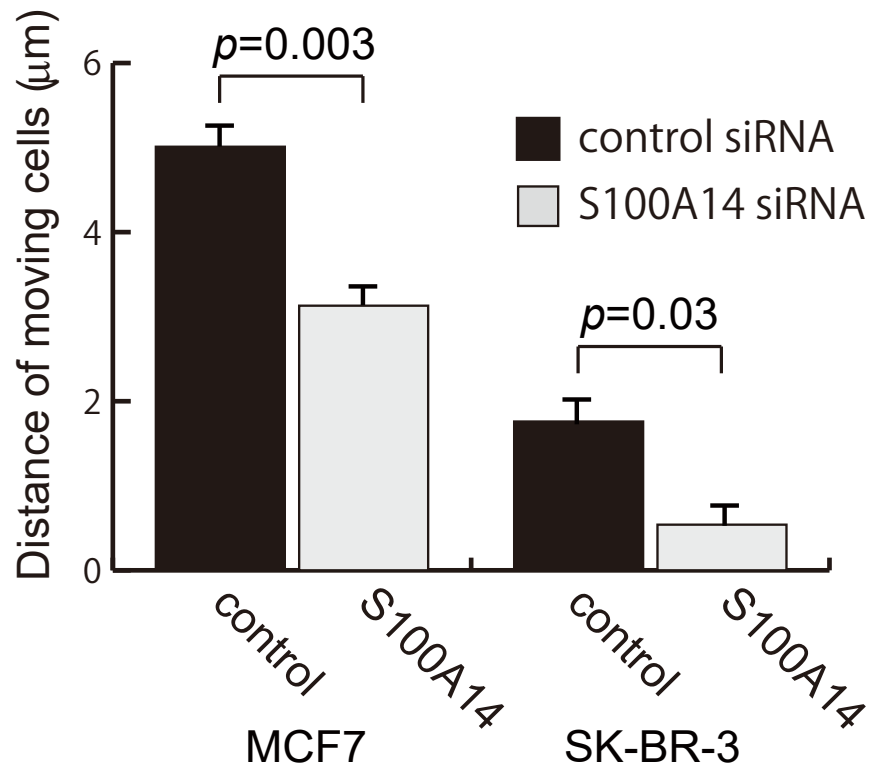


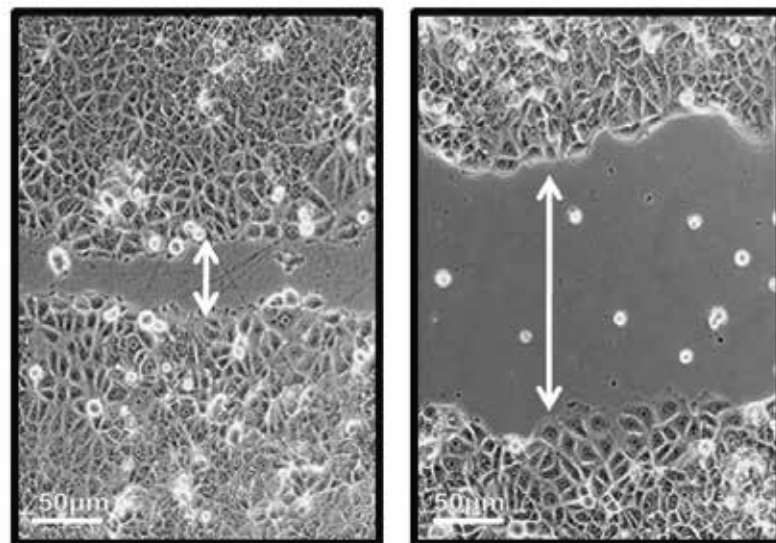
Figure 8

A



B

MCF7

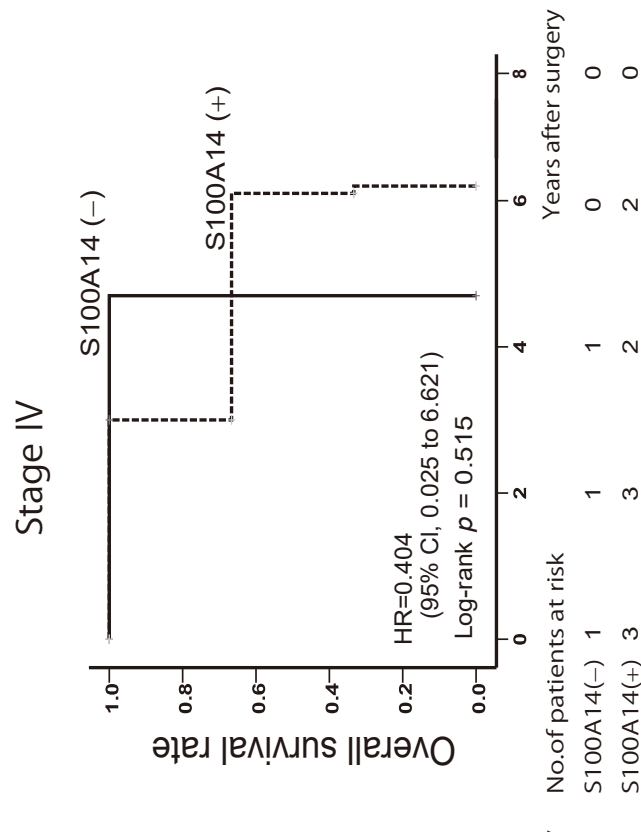
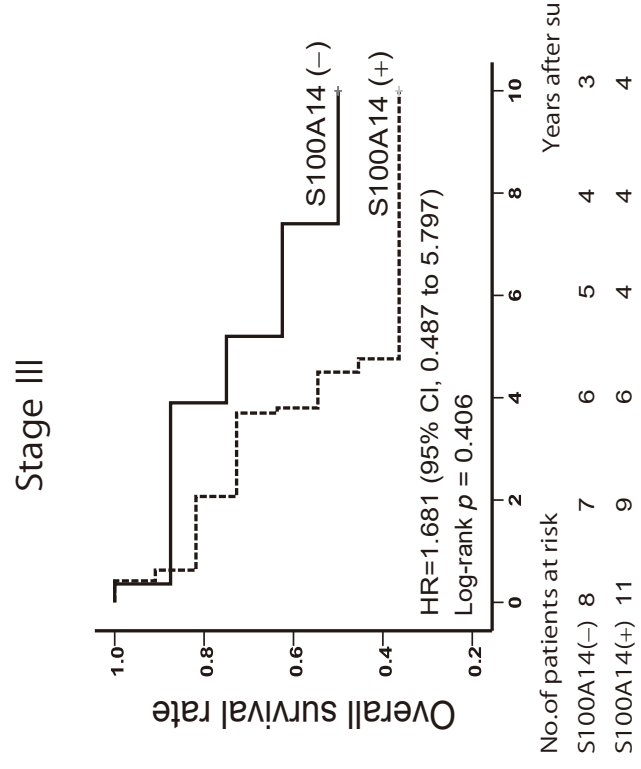
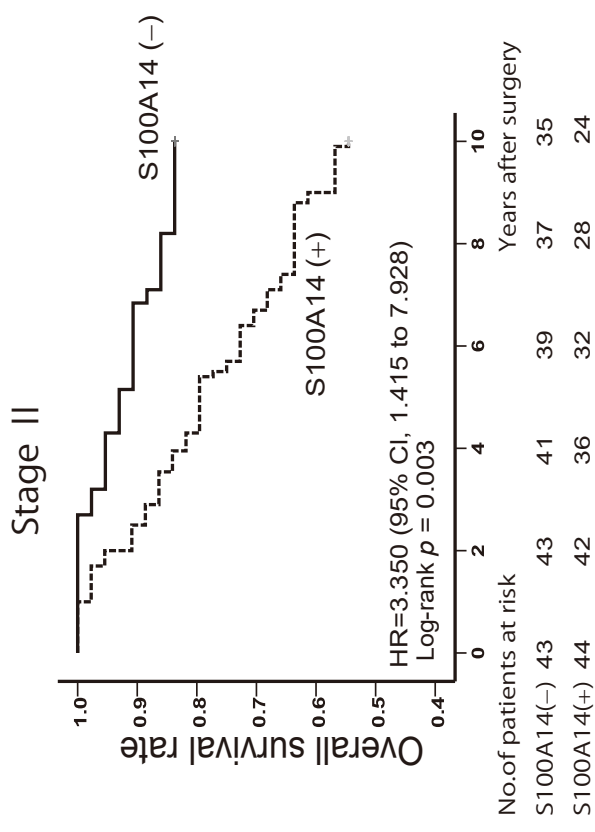
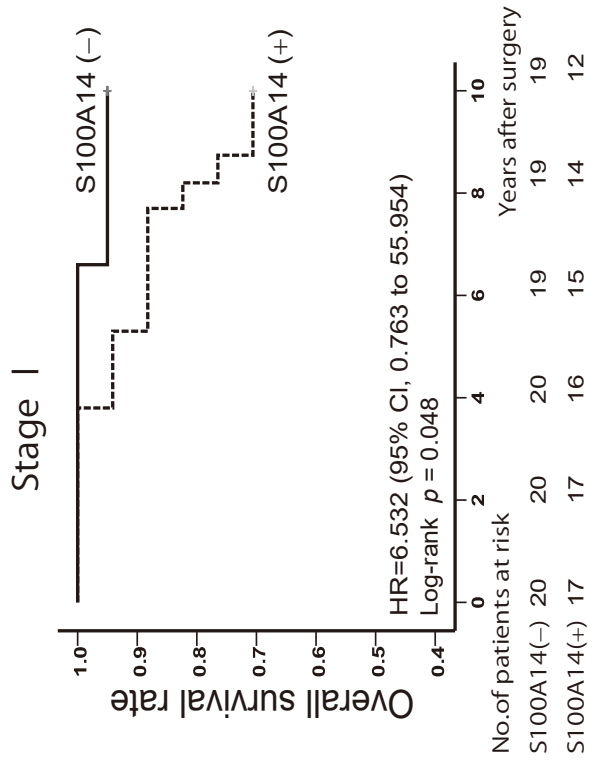


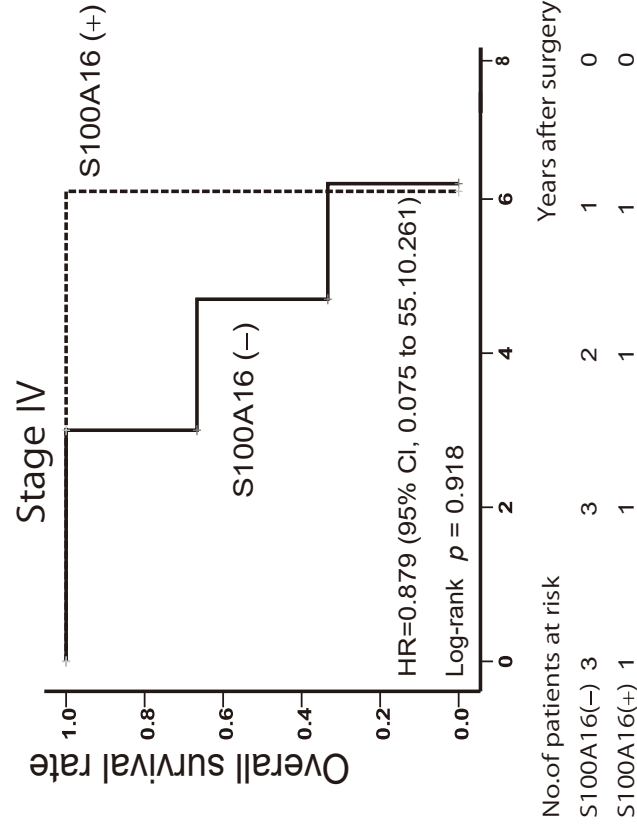
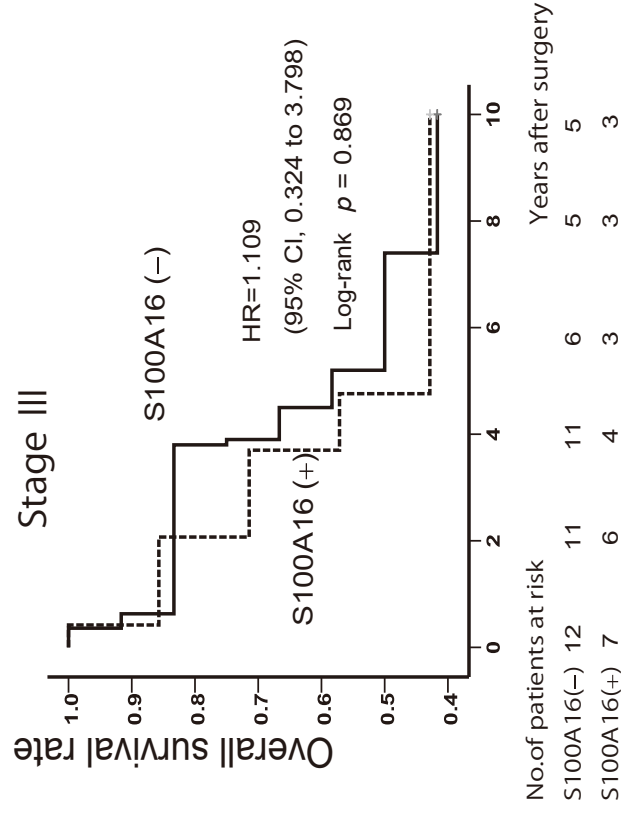
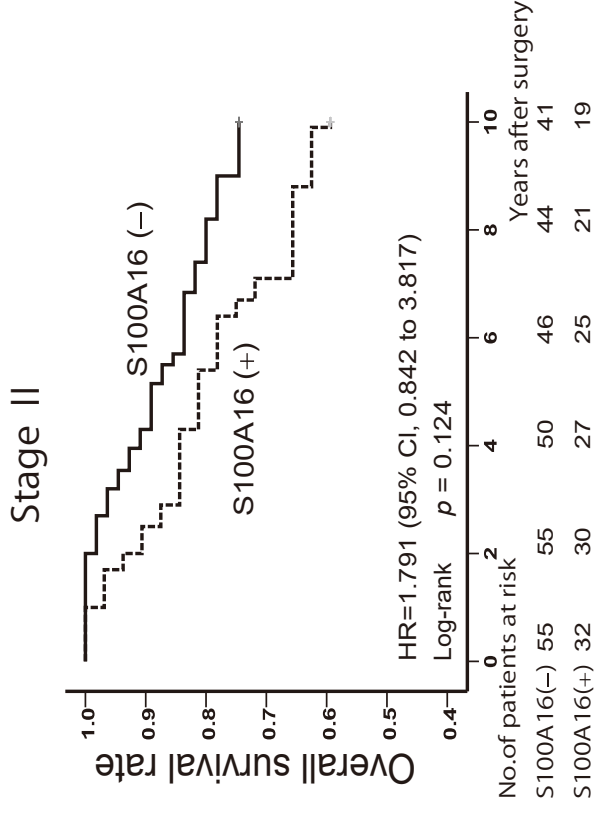
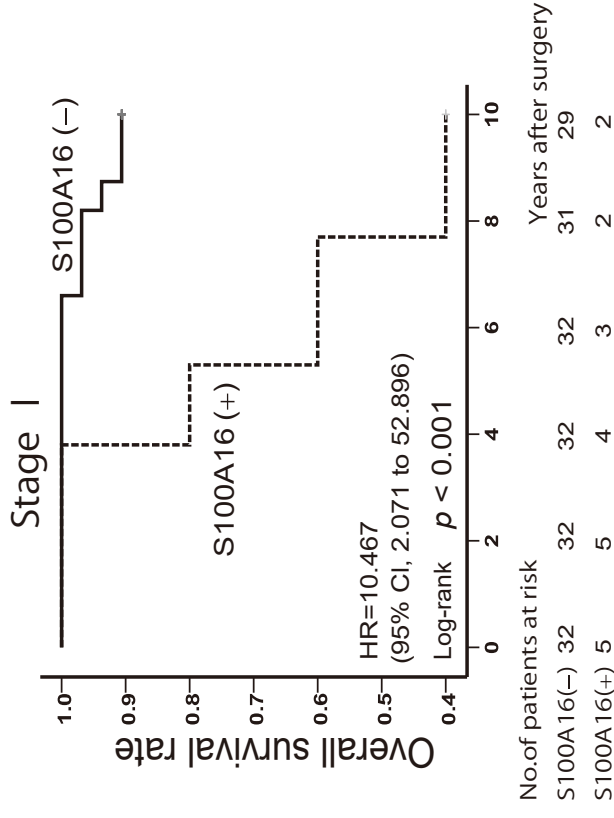
siRNA

control

S100A14

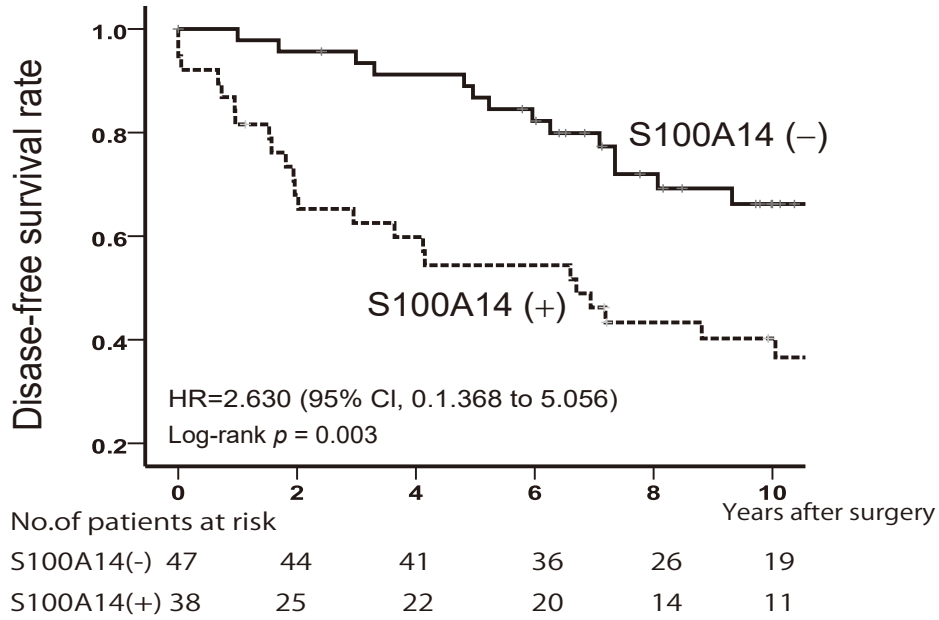
Sup. fig.1



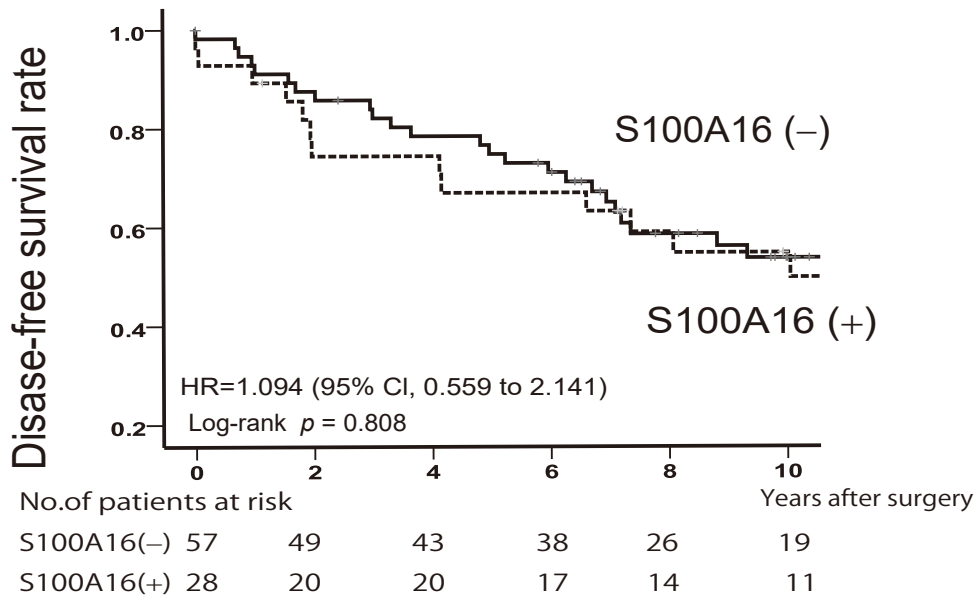


Sup. fig.3

A



B



C

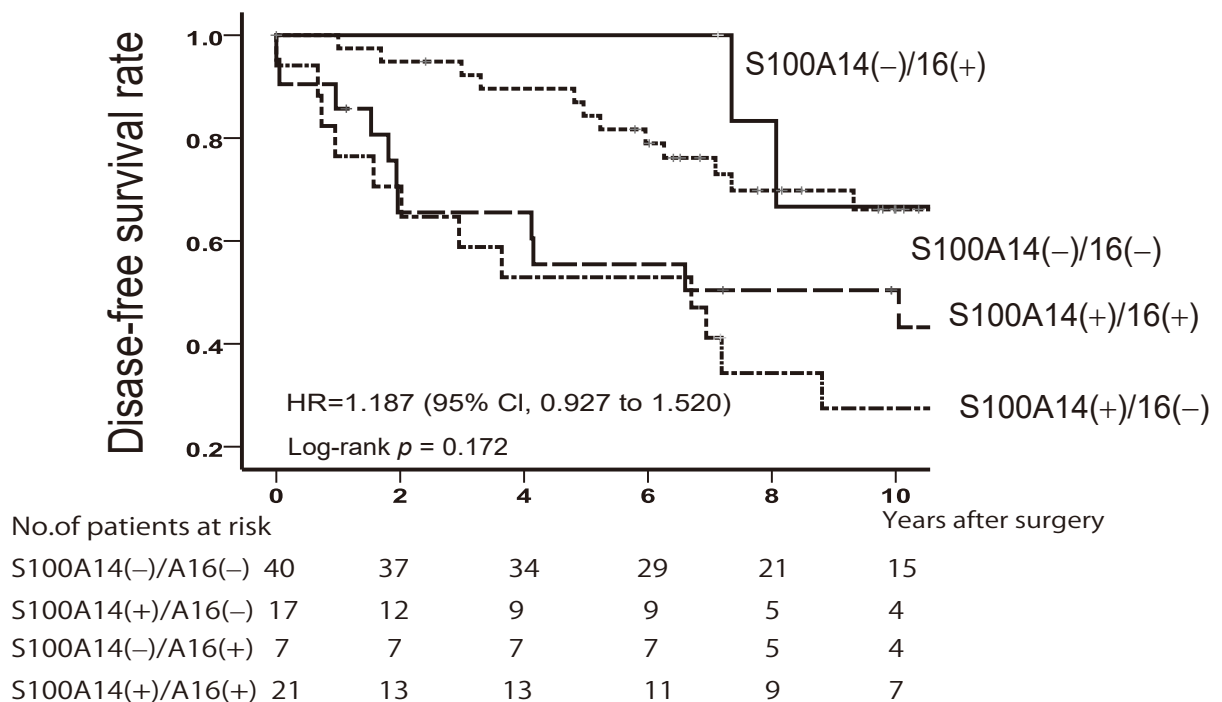


Table 1. S100A14・A16発現の免疫組織化学による判定基準

1. Intensity score (IS)		
	0	全く染色されていない
	1	細胞膜への染色が弱い、または全周性でない
	2	細胞膜が全周性に強く染色される
2. 判定区分		
1) S100A14	陰性 (-)	LI : 0 - 99
	陽性 (+)	LI : 100 - 200
2) S100A16	陰性 (-)	LI : 0 - 39
	陽性 (+)	LI : 40 - 200

Labeling index (LI) = 陽性細胞率 (%) × IS



**Table 2. S100A14・A16の発現と臨床病理学的因子との関連**

Clinical data	S100A14		P	S100A16		P
	negative	positive		negative	positive	
	n = 79 (%)	n = 88 (%)		n = 115 (%)	n = 52 (%)	
Patient age (y)						
<60	49 (29.3)	69 (41.3)	0.016*	73 (43.7)	45 (26.9)	0.002*
≥60	30 (18.0)	19 (11.4)		42 (25.1)	7 (4.2)	
pT						
1	27 (16.2)	22 (13.2)	0.248	43 (25.7)	6 (3.6)	0.009*
2	46 (27.5)	55 (32.9)		61 (36.5)	40 (24.0)	
3	6 (3.6)	8 (4.8)		9 (5.4)	5 (3.0)	
4	0 (0)	3 (1.8)		2 (1.2)	1 (0.6)	
pN						
0	27 (13.8)	25 (15.0)	0.343	48 (28.7)	4 (2.4)	<0.001*
1	48 (28.1)	52 (31.1)		59 (35.3)	41 (24.6)	
2	4 (4.8)	10 (6.0)		8 (4.8)	6 (3.6)	
3	0 (0)	1 (0.6)		0 (0)	1 (0.6)	
TNM staging						
I	23 (13.8)	17 (10.2)	0.238	35 (21.0)	5 (3.0)	0.025*
II	47 (28.1)	53 (31.7)		63 (37.7)	37 (22.2)	
III	8 (4.8)	14 (8.4)		13 (7.8)	9 (5.4)	
IV	1 (0.6)	4 (2.4)		4 (2.4)	1 (0.6)	
Histological grade						
1	25 (15.0)	14 (8.4)	0.056	29 (17.4)	10 (6.0)	0.526
2	33 (20.0)	46 (27.5)		55 (32.9)	24 (14.4)	
3	21 (12.6)	28 (16.8)		31 (18.6)	18 (10.8)	
ER						
Negative	22 (13.2)	40 (24.0)	0.014*	36 (21.6)	26 (15.6)	0.025*
Positive	57 (34.1)	48 (28.7)		79 (47.3)	26 (15.6)	
PgR						
Negative	50 (30.1)	52 (31.3)	0.571	69 (41.6)	33 (20.0)	0.746
Positive	29 (17.5)	35 (21.1)		45 (27.1)	19 (11.4)	
HER2						
score 0&1	71 (42.5)	61 (36.5)	0.001*	102 (61.1)	30 (18.0)	<0.001*
score 2&3	8 (4.9)	27 (16.6)		13 (7.8)	22 (13.5)	
S100A16						
low	71 (42.5)	44 (26.3)	<0.001*			
high	8 (4.8)	44 (26.3)				

$\chi^2$  test for trends

pT: 原発腫瘍, 1: <2cm, 2: 2-5cm, 3: 5cm≤, 4: 大きさを問わず胸壁、皮膚への浸潤

pN: 転移リンパ節数; 0: 0個, 1: 1-3個, 2: 4-9個, 3: 10個以上

Histological grade; 組織学的異型度を乳管癌の管腔形成度, 核異型, 核分裂数から算出.

Histopathology. 1991 Nov;19(5):403-10

Table 3. 乳癌患者の全生存期間に影響する因子についての単変量および多変量解析

Parameter	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	P	Hazard Ratio	95% CI	P	Hazard Ratio	95% CI
S100A14 (positive vs negative)	< 0.001	3.111	1.645 to 5.884	< 0.001	3.156	1.660 to 6.000
S100A16 (positive vs negative)	0.013	2.061	1.164 to 3.647	NS		
Age (< 60 vs ≥ 60 years)	0.475	1.269	0.660 to 2.439	NS		
Tumor size (≥ 2cm vs < 2cm)	0.852	1.060	0.576 to 1.951	NS		
Lymph node metastasis (yes vs no)	< 0.001	2.746	1.770 to 4.261	NS		
ER (negative vs positive)	0.003	2.351	1.333 to 4.143	NS		
PgR (negative vs positive)	0.040	1.948	1.030 to 3.685	0.033	2.013	1.057 to 3.836
HER2 score (2, 3 vs 0, 1)	0.001	2.680	1.492 to 4.815	NS		
Histological grade (3 vs 1, 2)	< 0.001	4.782	2.653 to 8.618	< 0.001	4.347	2.401 to 7.870

NS: not significant.