

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19862

研究課題名(和文) 乳癌の薬物療法耐性への低酸素の関与についての研究

研究課題名(英文) The effect of hypoxia on the resistance of drug therapy for breast cancer

研究代表者

野田 諭 (NODA, Satoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20382103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内血流の不均一性やそれに起因する低酸素領域は癌の悪性度や浸潤・転移能と関連するとされている。純粋な腫瘍内血流を評価できる造影超音波検査は癌の悪性度を簡便に評価できる可能性がある。薬物療法奏功例に関しては腫瘍縮小と同時に腫瘍内血流の均一化を認めた。乳癌の病理学的背景と腫瘍内血流の関連を解析し、エストロゲンレセプターの発現が陰性の症例においては腫瘍内血流の不均一さを多く認めた。エストロゲンレセプターの発現は治療標的となる可能性があるため、治療効果が超音波検査所見と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The heterogeneity of blood flow and the hypoxia in tumor have been reported to be associated with malignant potential and metastatic potential of malignant neoplasms. Contrast enhancement ultrasonography is able to assess the blood flow in tumor. It might be easily able to evaluate the malignant potential of tumor. We found that the blood flow in tumor became homogenous when drug therapy had good response for tumor. We analyzed the association between pathological background of breast cancer and blood flow in tumor using contrast enhanced ultrasonography. It had been found that breast cancer without estrogen receptor more frequently had the heterogeneity of blood flow in tumor. The expression of estrogen receptor is target for endocrine therapy. It was suggested that endocrine therapy might not be useful for breast tumor with heterogeneity of blood flow.

研究分野：外科学一般

キーワード：乳癌 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍は正常組織と同様に、増殖する過程で酸素と栄養が必要であり、腫瘍近傍の毛細血管からそれらを獲得している。酸素の拡散距離は100~200umであるため、血管から遠い距離にある部位の腫瘍は低酸素に暴露される。この低酸素状態は血管内皮増殖因子(VEGF)などの発現を誘導し、血管新生が促進される。しかしながら腫瘍血管は無秩序に構築され、毛細血管の構造も一貫性がないため、低酸素状態が回復しない部位が腫瘍内部で不均一に存在する。

癌組織内部の低酸素状態に暴露される癌細胞の転移能や治療抵抗性は亢進しているとされる (Zhong H. et al. *Cancer Research* 59;5830-5. 1999)。これまで我々は胃癌細胞株を用いた研究により、低酸素環境に耐性を獲得した癌細胞は造腫瘍性を増し、低酸素状態にある腹腔内環境にて Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ )レセプターを介した細胞接着因子の発現亢進を認め腹膜転移能が亢進することを見出した (Noda S, et al. *European Journal of Cancer* 46; 995-1005, 2010)。また、低酸素環境に耐性を獲得した胃癌細胞は通常環境にある癌細胞と比較して抗癌剤感受性が低下しており、治療抵抗性を獲得していることを明らかにした。さらに胃癌細胞株と食道癌細胞株を用いた検討では、低酸素刺激により BRCA1 と BRCA2 の発現低下を介して細胞周期が調節され、放射線治療の感受性が低下することが見出された (Kato Y, Noda S, et al. *Anticancer Research* 10; 3369-75, 2011)。一方で臨床検体を用いた検討において、低酸素環境により誘導される低酸素マーカーである Carbonic anhydrase (CA-9)の発現は根治切除を受けたスキルス胃癌症例において予後予測因子であることが示唆され、CA-9発現亢進を認める症例では有意に予後不良であった (Kato Y, Noda S, et al. *Digestion* 82; 246-251, 2010)。

我々は過去に乳癌術前化学療法症例を対象に治療前の CA-9 発現を解析し、低酸素誘導性の CA-9 発現の高い症例は、化学療法の効果が低く予後も不良であったことを示し、低酸素環境が治療感受性に関与していることが示唆された (Aomatsu N, et al. *BMC Cancer* 14: 400. doi: 10.1186/1471-2407-14-400, 2014)。低酸素環境によって誘導される Hypoxia inducible factor-1a (HIF-1a)は転写因子として機能し、低酸素環境と密接に関与する血管新生に必要な因子の遺伝子発現を誘導することで重要な役割を担っている。HIF-1a が誘導する血管新生シグナルの代表は VEGF であり、近年 VEGF に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブは進行・再発乳

癌において化学療法と併用して使用され、化学療法単剤と比較しての有効性が示されている。その機序は、血管新生阻害による腫瘍増殖の抑制という直接的機序以外に、異常な腫瘍血管系により亢進した血管透過性を原因とする高い間質液圧を正常化することにより、薬剤の腫瘍への到達を改善するためでもあるとされる。これは低酸素環境によって活性化された HIF-1a-VEGF 経路を阻害することにより化学療法剤感受性を亢進させたことになる。

また、低酸素環境は治療標的因子の一つであるホルモン受容体の発現を抑制することで治療抵抗性を引き起こし、進行乳癌において腫瘍内 VEGF 濃度が高い症例は内分泌療法の効果が低いなどの報告がなされている。

薬物療法に対する感受性が比較的良好とされる乳癌のなかでも、治療に抵抗性を示すものがあり、乳癌治療における最も大きな問題の一つとなっている。薬剤抵抗性には de novo の不応だけでなく、治療過程において抵抗性を徐々に獲得する場合もしばしば経験される。近年、これらの治療抵抗性獲得に低酸素環境が関与する可能性についての知見が散見される。癌組織内部では低酸素環境により誘導される分子が存在し、癌細胞や腫瘍内微小環境に大きな影響をもたらす。

2012年8月より乳癌領域において造影超音波検査が保険適応となり、良悪性診断や病変の広がり診断に用いられている。使用する造影剤中のマイクロバブルは赤血球と同様に血管内を流れ、X線やMRIで使用される水溶性の造影剤とは異なり血管外には漏出しない。すなわち純粋に血流を把握でき、リアルタイムに観察することができる。これにより無秩序で不規則にねじれた血管構造が腫瘍内に観察され、酸素供給の不均一な状況を確認し、低酸素環境への暴露の状態を in vivo で把握できる。

## 2. 研究の目的

低酸素環境と密接に関連する腫瘍内部の血流の程度や不均一程度と乳癌の悪性度や薬物療法の効果の関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

乳癌における腫瘍内血流と薬物療法の関連を検討するため、2014年10月から2015年10月に当院で乳癌に対する術前化学療法後に手術を施行し、組織学的治療効果が Grade2b~3 (極めて高度の効果もしくは完全奏効)と診断された症例と Grade1 (やや有効)と診断された症例を対象とした。診断装置は GE Healthcare 社製 LogiqE9、プローブは ML6-15MHz を使用し、MI 値は 0.2

程度、フォーカスは病変の中央から深部に設定した。ソナゾイド 1ml を静注後、約 1 分間リアルタイムに観察した。周囲乳腺との染色強度の比較、腫瘍周囲の染色増強の有無、内部不染域の有無、拍動性染色の有無を評価した。

次に、乳腺造影超音波検査の所見と臨床病理学的因子との関連を解析した。2014 年 10 月から 2016 年 8 月の間に施行された 97 例を対象とした。染色所見として上記所見と Time Intensity Curve(TIC)を作成した上で最大染色強度までの時間、増幅強度、その傾きを測定した。臨床病理学的因子として ER 発現、HER2 発現、Ki67 値、リンパ節転移の有無と染色所見の関連性を解析した。

#### 4. 研究成果

薬物療法奏功例に関しては腫瘍縮小と同時に腫瘍内血流の均一化を認めた。非奏功においては腫瘍内血流の変化は乏しかった。奏功例においては同時に施行されている造影 MRI 所見との乖離を認め、造影 MRI で造影効果があると判定された症例も、造影超音波検査では染色を認めない症例が多かった。

症例	NAC前組織所見				NAC前腫瘍径 (mm)	組織学的治療効果 (Grade)	造影	
	ER	PR	HER2	Ki67			MRI	CEUS
1	-	-	-	high	38	3	(+)	(-)
2	-	-	+	high	40	3	(-)	(-)
3	-	-	-	high	18	3	(+)	(-)
4	-	-	-	low	17	3	(+)	(-)
5	-	-	+	high	21	3	(-)	(-)
6	-	-	-	high	25	3	(-)	(-)
7	-	-	-	high	35	2b	(-)	(-)
8	+	+	-	high	27	2b	(+)	(+)
9	+	-	-	high	23	2b	(+)	(-)
10	-	-	+	high	29	3	(-)	(-)
11	+	+	+	high	48	3	(+)	(-)

臨床病理学的所見との関連性の解析では、全例が浸潤性乳管癌で、腫瘍径の平均は 21mm であった。ER 陽性は 71 例、HER2 陰性が 83 例であった。造影超音波における内部の染色は全例不均一な染色であった。ER 発現が陰性の症例において内部不染域を認める腫瘍が有意に多かった。またリンパ節転移を伴う症例は内部不染域のある腫瘍が多い傾向であった。他の HER2 発現の有無、Ki67 値の高低では染色所見に差は認めなかった。TIC における測定値も臨床病理学的因子による差は認めなかった。

染色所見		ER		p
		positive	negative	
周囲の染色	なし	11	3	1
	あり	53	18	
周囲乳腺より	同等以下	10	2	0.71
	強い	37	13	
内部不染域	なし	21	1	0.008
	あり	39	19	
拍動性染色	なし	30	7	0.77
	あり	25	8	

染色所見		cN		p
		Positive	negative	
周囲の染色	なし	3	11	1
	あり	17	55	
周囲乳腺より	同等以下	0	12	0.18
	強い	9	42	
内部不染域	なし	2	20	0.07
	あり	18	41	
拍動性染色	なし	5	32	0.14
	あり	10	24	

内部血流が不均一な所見は、エストロゲンレセプター陰性やリンパ節転移などの悪性度が高い乳癌と関連する可能性が示され、エストロゲンレセプターの発現は治療標的となる可能性があるため、治療効果が超音波検査所見と関連する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

1)2017 年 第 117 回日本外科学会定期学術集会

「乳腺造影超音波検査による腫瘍内血流の評価と悪性度の関連」野田諭(発表者)

2)2017 年 第 25 回日本乳癌学会学術集会

「Grade 別に見た非浸潤性乳管癌のソナゾイド造影超音波検査所見の比較」  
発表者 福田雅代

3)2017 年 第 25 回日本乳癌学会学術集会

「粘液癌におけるソナゾイド造影超音波検査所見の特徴」  
発表者 中村佳子

4)2017 年 24<sup>th</sup> Asia Pacific Cancer Conference

「Characteristic of findings contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid for mucinous breast cancer」  
発表者 中村佳子

5)2016 年 Global Breast Cancer Conference 2016

「USEFULNESS OF CONTRAST-ENHANCED ULTRASOUND WITH SONAZOID FOR EVALUATION OF RESIDUAL TUMOR AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY FOR BREAST CANCER PATIENTS」  
発表者 中村佳子

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

野田諭 (NODA Satoru )  
大阪市立大学大学院・医学研究科・講師  
研究者番号：20382103

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )