

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21239

研究課題名(和文) 腫瘍生物学的因子と患者の肥満や糖・脂質代謝異常を背景とした新規乳癌亜型分類の構築

研究課題名(英文) Associations between obesity, abnormal glucose/lipid metabolism, and clinico-biological factors in patients with breast cancer

研究代表者

林 光博 (Hayashi, Mitsuhiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：50735628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳癌患者における肥満、糖・脂質代謝異常と臨床病理学的因子との関係、及び乳癌進展に関わるメカニズムを明らかにするべく検討を行った。閉経後の女性ホルモン受容体陽性乳癌ではBMI高値例が多く、また肥満は乳癌の組織硬度に関与することが示された。この乳癌の組織硬度は腋窩リンパ節転移の頻度と関係があり、Lysyl Oxidase遺伝子発現との相関が示唆された。また培養細胞・動物モデルを用いた検討では、脂質経路が乳癌の進展に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between obesity, abnormal glucose/lipid metabolism, and clinicopathological factors in patients with breast cancer. In postmenopausal estrogen receptor-positive breast cancer, there were many cases with high body mass index. Furthermore, obesity was involved in the tumor stiffness of breast cancer by elastographic evaluation, and tumor stiffness significantly correlated with lymph node metastasis and high gene expression of lysyl oxidase. In vitro/vivo experiments suggested that lipid pathway contributed to the behavior of breast cancer.

研究分野：乳癌トランスレーショナルリサーチ

キーワード：乳癌 肥満 腫瘍硬度 Elastography 脂質

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性で最も罹患率が高い悪性腫瘍であり、年間の新規患者数は76,041人(2010年全国推計値)この30年間で5倍増加しており、その発症年齢のピークが40歳代と60歳代の閉経期をまたぐ二峰性であり、また悪性腫瘍としては比較的若年者に多いのも特徴である。更に年間の死亡者数は13,148人(2013年女性)にのぼり、30歳から64歳女性の死因第1位であることから、乳癌生物学的亜型分類の細分化と、そこに連携する治療戦略の向上が急務である。

欧米をはじめ世界規模においても乳癌患者数は増加の一途であり、2013年の米国新規乳癌患者数は232,340人(女性悪性腫瘍の第1位) 米国人女性の約8人に1人が生涯で乳癌に罹患する計算であり、罹患率も日本の約2倍となっている(SEER program 2013)。欧米では肥満率の増加が乳癌を含めた近年の悪性腫瘍増加の一因とされ、肥満に伴う様々な脂肪関連サイトカイン(アディポカイン)の変動とそれに伴う慢性炎症、インスリン抵抗性や糖・脂質代謝異常が強い発癌・病勢進行要因となることが明らかとなってきている。加えて乳癌領域では、肥満に伴う末梢脂肪組織アロマトラーゼ活性増加による閉経後エストロゲンレベルの上昇も乳癌増加要因の一つと捉えられている。

しかしながら、疾患感受性に関するGWAS研究からも示されるように、日本と欧米では乳癌においてもその生物学的特徴が異なっており(乳癌リスクSNP、発症年齢ピーク、エストロゲン受容体陽性症例率の違いなど) 肥満率についても違いが存在する。つまり、欧米では現在も年次に伴う肥満率の増加を認め、米国では過体重と肥満人口が既に7割近くを占めているのに対し、日本ではむしろ減少傾向であり(平成24年国民栄養健康調査) 閉経前後の女性肥満率で分けて検討しても近年は増加を認めていない。

従って、欧米との相違点に着目し、日本人での肥満及び環境要因を考慮した乳癌進展の分子基盤研究を行うことで、乳癌亜型分類の細分化(Metabolic-related breast cancer) 及び発症予防も含めた新しい乳癌治療戦略の構築につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究ではまず、乳癌患者における肥満、糖・脂質代謝異常と臨床病理学的因子との相関を解析する。次にこれら因子について基礎的検討、トランスレーショナルリサーチを行い、環境要因と乳癌進展に関する分子基盤解明を目的とする。

3. 研究の方法

乳癌診断時のBMI (Body mass index)、血

中糖・脂質レベル(FBS, HbA1c, T-CHO, LDL/HDL, TG)、女性ホルモン(エストロジオール, FSH, LH)等を調査し、乳癌サブタイプを含めた臨床病理学的因子(エストロゲン受容体発現ER, プロゲステロン受容体発現PgR, HER2発現, Nuclear grade, Ki67 index, 腫瘍径, リンパ節転移)との相関解析を行う。また、マンモグラフィでの背景乳腺濃度、超音波エラストグラフィでの腫瘍組織硬度、各種遺伝子発現(IGF1R, HIF1A, Lysyl oxidase, SPP1, RANKL, CYLD等)と上記因子との相関も探索する。

乳癌細胞株を用いて、*In vitro/vivo*での検討を行う。脂肪酸受容体発現(mRNA, Protein)をスクリーニング、受容体アゴニスト及びアンタゴニストを用いて、種々の栄養条件下でのMTSアッセイ、BrdUアッセイにおける増殖能を評価する。また3D培養でのmammosphereアッセイ、がん幹細胞マーカーの評価を行う。免疫不全マウスに乳癌細胞株を移植したゼノグラフトモデルを用いて、受容体刺激と抗腫瘍効果を解析する。臨床検体でのmRNA発現、免疫染色評価を行い、臨床病理学的因子、予後(disease free survival, overall survival)との関係を解析する。

4. 研究成果

乳癌患者865名において、BMI中央値は22.8(IQR 20.6-25.4)であり、BMI 25以上の患者は21.5%、BMI 30以上の患者は6.6%であった。乳癌臨床病理学的因子との関係では、閉経後乳癌において、ER陽性例、及びPgR陽性例がBMI 25以上の患者で多い割合を占めていた($P=0.02$, $P=0.01$, respectively in Chi-square test)。また興味深いことに、超音波Elastographyにおける乳癌組織硬度が、BMI 25以上の患者では有意に高い結果であった(Fat lesion ratio: FLR中央値, BMI <25群 6.7 versus BMI 25群 12.4, $P<0.0001$ in Wilcoxon test)。

そこで乳癌組織硬度に着目し、解析を行った。相対的に硬い乳癌では潜在性を含めた腋窩リンパ節転移陽性例の頻度が高く、Collagenのクロスリンクに働くLysyl oxidaseの発現が高い結果であった(Hayashi et al. *Medicine* 2015)。

Characteristics		Odds ratio	95% confidence interval	P
Lymph node metastasis	positive vs. negative	1.95	1.31-2.93	0.0010
Tumor size	large vs. small	1.27	0.87-1.86	0.2052
Progesterone receptor status	positive vs. negative	1.28	0.87-1.90	0.2119
Body mass index	high vs. low	2.02	0.97-4.44	0.0608

表1. 乳癌組織硬度に関する多変量解析

またBMI高値の患者では血中コレステロール値、及び中性脂肪値がともに有意に高かったが、コレステロール値はER・PgR発現に関わらず比較的一定であった一方、中性脂肪値は受容体発現による変動が観察された。従って、乳癌における脂肪酸の役割を検討した。

脂肪酸受容体 (FFAR) の発現が確認された乳癌細胞株 MDA-MB-231 を用いて、培養液中の脂質レベルをコントロールしたうえで受容体アゴニストにて刺激を行うと、細胞増殖が亢進し、また 3D 培養におけるスフィア形成数の増加を認めた。一方で脂肪酸受容体の阻害を行うと、細胞増殖が抑制された。次に乳癌細胞株 MDA-MB-231 を SCID-Beige mouse に移植したゼノグラフトモデルにおいて、選択的受容体阻害剤を用いた抗腫瘍性試験を行うと、一時的な増殖抑制効果を認めた一方で、その後は再増大を示した。従って *In vivo* においては、脂肪酸受容体経路の阻害に対する代償・耐性機構が働いていることが推測された。

そこでメタボローム解析にて、脂肪酸受容体阻害時の代謝変動を解析すると、乳癌細胞は脂肪酸枯渇に伴う変動と酸化ストレス状態を呈する一方で、代償経路の存在が示唆された。乳癌患者アーカイブ検体、及びパブリックデータベースを用いて、脂肪酸受容体遺伝子発現と臨床転帰との相関を検討すると、ER 陽性例において高発現が予後不良因子であった ($P=0.002$ in Log-rank test)。

今後は強制発現・抑制系での検討、日本人乳癌患者から樹立した患者組織移植モデル (Patient-derived xenograft: PDX) を用いた検討を行っていくことで、脂肪酸受容体の乳癌進展に関する分子基盤が明らかになると期待される。

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 4 件)

(1) Hayashi M, Yamamoto Y, Sueta A, Tomiguchi M, Yamamoto-Ibusuki M, Kawasoe T, Hamada A, Iwase H. Associations between elastography findings and clinicopathological factors in breast breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 査読あり, 94(50), 2015, e2290.

Doi: 10.1097/MD.0000000000002290

(2) Alkawa H, Hayashi M, Ryu S, Yamashita M, Otsuka N, Nishidate M, Fujiwara Y, Hamada A. Visualizing spatial distribution of alectinib in murine brain using quantitative mass spectrometry imaging. *Scientific Reports*. 査読あり, 30, 2016, 23749.

Doi: 10.1038/srep23749.

(3) Sueta A, Hayashi M, Fukugawa Y, Shimizu H, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H. Successful ethinylestradiol therapy for a metastatic breast cancer patient with heavily pre-treated with endocrine

therapies. *International Cancer Conference Journal*. 査読あり, 5, 2016, 126.

Doi: 10.1007/sl3691-015-0241-7.

(4) Tomiguchi M, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Goto-Yamaguchi L, Fujiki Y, Fujiwara S, Sueta A, Hayashi M, Takeshita T, Inao T, Iwase H. Fibroblast growth factor receptor-1 protein expression is associated with prognosis in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor-2-negative primary breast cancer. *Cancer Science*. 査読あり, 107, 2016, 491.

Doi: 10.1111/cas.12897.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)Hayashi M, Iwase H. Correlation between elastographic evaluation and clinicopathological factors in breast cancer. 日本超音波医学会第 89 回学術集会・アジア超音波医学生物学会第 12 回学術集会合同シンポジウム, May 28, 2016, 国立京都国際会館, 京都市, 京都

(2) 林 光博, 岩瀬 弘敬. 術前化学療法開始前の Elastography FLR 評価と治療効果との関係, 日本超音波医学会第 89 回学術集会, 2016 年 5 月 29 日, 国立京都国際会館, 京都市, 京都

(3) 林 光博, 富口 麻衣, 未田 愛子, 藤原 沙織, 山本 聡子, 竹下 卓志, 稲尾 瞳子, 指宿 陸子, 村上 敬一, 山本 豊, 岩瀬 弘敬. 乳癌硬度評価と臨床病理学的因子に関する検討、特にリンパ節転移との関係について、第 23 回日本乳癌学会学術総会、2015 年 7 月 3 日、東京国際フォーラム、千代田区、東京都

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 光博 (HAYASHI Mitsuhiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：50735628

(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

()