

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2017～2022  
課題番号：17K10565  
研究課題名（和文）乳癌の乳管内進展に関する画像評価と分子生物学的切除断端マーカー開発に向けた研究  
研究課題名（英文）Imaging evaluation of intraductal spread of breast cancer and research for the development of molecular biomarkers for resection margins  
研究代表者  
蒔田 益次郎（Makita, Masujiro）  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10229338  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌の取り残しを減らす部分切除法の開発と断端の正確な評価法としての生物学的マーカーの確立について研究を行った。造影超音波による広がり診断をもとに水系エマルジョン樹脂塗料によって切除範囲をモデル化する方法を開発した。非浸潤性乳管癌症例の癌部と非癌部のペアサンプルの細胞診検体からRNAを抽出しアレイ解析を行い、乳管内進展に関連するRNAをリストアップした。乳管内進展に関わる生物学的マーカーは乳管内に高濃度に存在すると考えられるので、乳管内視鏡施行時の乳管内洗浄細胞診を用いRNAの分析を行った。前述のリストにあるCARTPTとBRCAT54を乳管洗浄細胞診サンプルでも検出することができた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

部分切除で乳癌の取り残しを減らす切除法としての切除範囲のモデル化（「マスキングカラーシミュレーション」として報告）は手術時と同じ体位で行った造影超音波の結果が元になるので位置の再現性が高く、断端陰性率で従来法と遜色なく、残った模型を参照することで病理所見との対比ができ、手術手技の向上、断端陰性率の向上が期待できる。乳管内洗浄の細胞診サンプルから乳管内進展に関連するRNAが確認できたことから、CARTPTとBRCAT54は生物学的切除断端マーカーの候補になり得ると思われる。乳管内から採取される細胞は腫瘍などから採取される場合に比べて間質の混在が少ないことが利点で、マーカー探索に有用と思われた。

研究成果の概要（英文）：Research was conducted on the development of partial resection methods to reduce residual breast cancer and the establishment of biological markers as accurate evaluation methods for margins. We have developed a method to model the excision range with water-based emulsion resin paint based on the diagnosis of intraductal spread by contrast-enhanced ultrasound. RNA was extracted from cytological specimens of paired samples of cancerous and non-cancerous areas of ductal carcinoma in situ, and array analysis was performed to list RNAs associated with intraductal spread. Since biological markers related to intraductal spread are thought to be present at high concentrations in the ducts, RNA analysis was performed using intraductal wash cytology samples by mammary ductoscopy. CARTPT and BRCAT54, listed above, could also be detected in ductal washing cytology samples.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 広がり診断 造影超音波 細胞診 マイクロRNA 部分切除 切除範囲 シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌の治療法は乳癌の早期発見と薬物療法の進歩を背景に、乳房温存療法(乳腺部分切除+乳房照射)が定着してきた。乳房温存療法は生存率の長期成績で見ても乳房切除術に劣らないと報告されている<sup>1)</sup>。しかし、乳房温存療法では温存した乳房での局所再発(温存乳房内再発)が問題となる。局所再発の機序として考えられる点は次の3つである。A. 腫瘍から乳管内を進展した部分を手術中に取り残すことで起こる場合、B. 腫瘍の悪性度・進行度によりリンパ管侵襲などを起こして乳房内に再発する場合、C. 新しい乳癌が発生する場合である。Cへの対応としては新しい乳癌の発生に関してもホルモン療法剤を使用することで抑制できることが示されている<sup>2)</sup>。Bに対して、乳癌の悪性度はホルモン感受性、核異型度、HER2発現といった要素によりサブタイプ分類として定着し、サブタイプごとに治療法がほぼ確立した。一方で進行した症例では必要となる治療も多くなるので、安全な治療の縮小は早期乳癌に限定される。実際グレードの低い非浸潤癌に対して非照射の試みが行われ、局所再発率も照射群に比べれば高いが許容できる範囲に近づいた<sup>3)</sup>。サブタイプを考慮し、適応を吟味すれば術後照射の省略も安全にできるものと考えられる。当院でもホルモン感受性があり、HER2陰性、核異型度の弱いサブタイプで部分切除の断端が陰性の症例に、術後ホルモン剤内服下に乳房照射を省略する臨床研究を開始している。

局所再発を減らすためには、病変的的確な切除法の確立と断端の正確な評価が課題と思われた。取り残しの手術と術中の取り残しの正確な評価が可能となれば、最終的に断端陰性となる症例が増加して乳癌の手術成績の向上につながる。

(2) 乳管内進展を含めて的確に切除するために現在問題となるのは、広がり診断のために行う造影MRIが腹臥位で手術時の体位と違うためずれること、手術時は造影でないといわからない病変をうまく切除できないことである。先行研究でソナゾイド造影超音波検査がMRIと同等で切除ラインの決定に有用であることが示唆された。造影超音波であれば造影部位に穿刺吸引細胞診することも容易で、術前に穿刺吸引細胞診で進展と診断されれば乳房切除へ切り替えるなど、適切な術式選択につながる。手術時と同じ体位でできることなどから、乳癌の広がり診断については造影超音波を元にして切除範囲を手術時に再現させる方法を確立することを目指した。

癌の取り残しの評価に関して現状では通常病理組織標本を多数作って評価している。標本作成に時間を要し、病理医の経験に基づいた判定となっている。リンパ節転移検索に開発されたOSNA(One step nucleic acid amplification)法のサイトケラチン19のように、乳管内進展の分子生物学的マーカーがあれば断端の検索も効率的に行われると思われる。

マイクロRNAは転写後の遺伝子発現調節をしていて、様々な癌において新しいバイオマーカーとして注目されている。癌の乳管内進展も調節された遺伝子発現の結果として起こっているものと思われ、そのカギとなるマイクロRNAの存在が予想される。研究の進歩により細胞診から得た検体<sup>4)</sup>やホルマリン固定パラフィンブロック<sup>5)</sup>からでも酵素処理を施すことで、RNAの抽出も可能となった。そこで、切除標本から得た細胞検体からRNAを抽出し、癌と非癌の検体に含まれるマイクロRNAのプロファイルの違いをみることで、乳管内進展に特異的なマイクロRNAが存在すれば術中切除断端の分子生物学的検索法の開発につながる考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 乳癌の乳房温存療法で癌の取り残しをなくすには広がり診断が重要で、広がり診断を正確に実際の切除範囲に反映させた乳房部分切除の方法を確立する。

(2) 乳管内進展に特異的な RNA を探求し、術中切除断端の分子生物学的マーカーを開発する。マイクロ RNA は転写後の遺伝子発現調節をしていて、様々な癌において新しいバイオマーカーとして注目されている。細胞診検体からの RNA 抽出を可能とする手法が確立されたことから、穿刺吸引細胞診や切除標本で採取した細胞検体における RNA を指標とし、癌と非癌部の違いを分析することで断端のマーカーの候補を見いだしていく。

## 3. 研究の方法

(1) 造影超音波で広がり診断を行い、造影から切除までの方法・手順の確立を目指す。広がり診断法に簡便で精度の高い乳管内進展の評価法を検討する。術前の検査時に画像で表示されたものを手術時に再現する方法も検討する。すでに熱可塑性プラスチックの応用<sup>6)</sup>など行ってきたが、さらに安価で位置の再現が得られるように水系エマルジョン樹脂塗料やハイドロゲルフィルム剤を実用化し、診断から切除までの一連の方法を確立し、普及につなげていく。また、この方法の有用性を検討する。

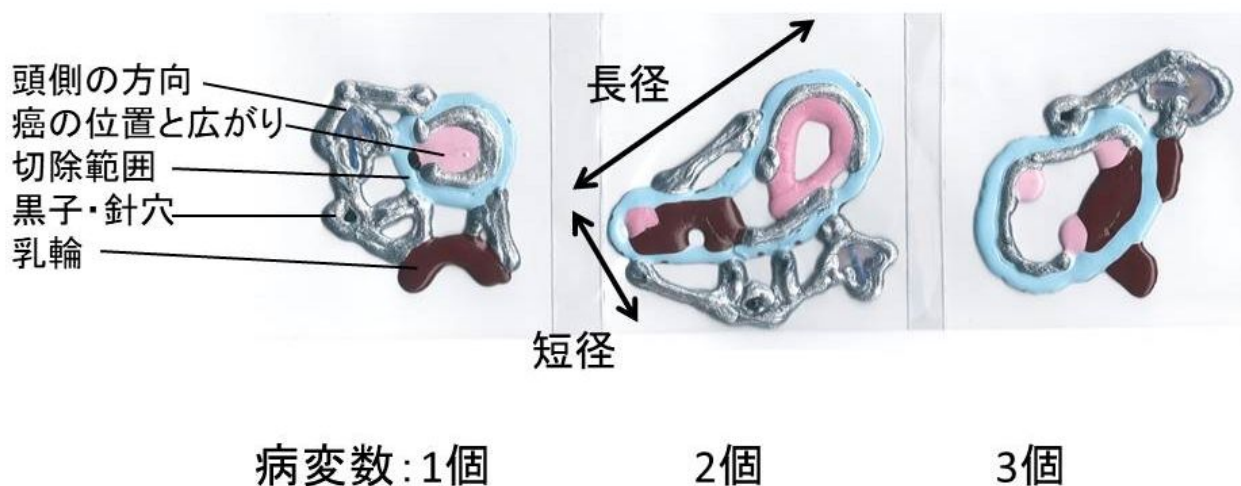
(2) 乳管内進展の予想される部位への穿刺吸引細胞診検体や切除標本での穿刺吸引細胞診で採取した検体を対象として RNA 抽出を行い、マイクロ RNA 解析を実施する。各症例から癌・非癌のペアとなったサンプルを収集し、検体ごとにリアルタイム PCR にて発現量を定量解析し、乳癌の発現に特徴のあるマイクロ RNA について統計解析を行い評価する。候補となるマイクロ RNA を絞り込み、候補の Validation study を行い、候補マイクロ RNA が切除断端のマーカーとなりうるかを検証する。

## 4. 研究成果

(1) 広がり診断における造影超音波の診断法：乳癌の乳管内進展は生体内では血流を伴うために造影 MRI による評価が一般的である。われわれは乳癌の乳管内進展の超音波所見は正常乳腺で見られる豹紋状の低エコー域と異なる低エコー域で、造影超音波により造影されると考え、造影剤投与後に低エコー域内に血流が確認できた時を乳管内進展と評価した。術前診断における MRI および造影超音波の乳癌の乳管内進展による広がり長径を切除標本での乳癌の広がり（組織学的広がり長径）との一致率で比較した。21 例で解析し、MRI と組織学的広がり長径の一致率 57.1% に対して、造影超音波のそれは 52.4% で、造影超音波は術前広がり診断に有用であると結論づけた。

(2) 切除範囲の模型化：広がり診断をどのように切除範囲に反映させて切除してくるかについては、水系エマルジョン樹脂塗料（商品名：マスキングカラー）を用いて模型を作成する方法を開発し、「マスキングカラーシミュレーション」として報告した。この方法は 造影超音波検査を行う際に、患側乳房の切除範囲の予想される位置に、通常は創傷に対して使用されるハイドロゲルフィルム剤を貼付し、乳頭乳輪、針生検の針穴、黒子などの位置情報に加えて、癌の主病巣と上述のように乳管内進展となりうる低エコー域を実物大に書き込む。造影超音波を実施して血流の確認できる低エコー域を乳管内進展部位として評価する。フィルム剤を乳房から剥がした後、主病変と乳管内進展部位の全てを含めるように切除範囲を決定する。フィルム剤に書かれた病変と切除範囲、位置情報を水系エマルジョン樹脂塗料で上書きして乾燥させた後、1 枚の模型として保管する。手術当日、模型を患者の乳房の位置情報に合わせて装着し、切除範囲をマジックで乳房に写し取る。

切除範囲に点墨（色素とゼリーを混合した液を注入する） 執刀直前に注入部位を紙（不織布覆布テープの糊面についた紙）に写し取って、切除範囲を型紙としておく。 執刀後は皮弁作成後、色素に沿って皮膚面から胸壁面に垂直に切って、切除範囲を切り抜く。その際に色素の注入が不明確な場合に上述の型紙を利用し、切除範囲に忠実に切除するようにする。この一連の方法を 92 例に適用し、主病変と乳管内進展部位の数（病変数、下図のピンク色の印の数）と断端陰性率との関係を解析した。断端の定義は切除標本を固定後、5 ミリ間隔に切り出して全ての切片で切離端から 5 ミリ以上の場合に陰性とした。その結果、全体では断端陰性率 53.3%で、病変数単一で 75%、2 個 55%、3 個以上 30.6%と有意に低下した。乳房部分切除の断端陰性率を比較するには病変数を単一のものとして比較すべきであり、また、単一病変の断端陰性率を高い水準に維持していくことは手術の質を維持することにつながると報告した。



また、上述のハイドロゲルフィルム剤は保険適用外使用となるため、保険適用のある超音波検査用ハイドロジェルパッドを用いることにより、この手術方法の普及を目指した。正方形（10 cm × 10 cm）のハイドロゲルフィルム剤、円形（直径 12 cm）のハイドロジェルパッドいずれも症例ごとに貼付の仕方を工夫することにより、1 症例に対して 1 枚で切除範囲と位置情報を含めることが可能であった。術前の広がり診断を模型として作製し手術時に再現する方法としては、入手しやすく安価であり、普及可能な方法が確立できた。作製した模型は切除標本の切り出し図と対応させることで広がり診断との対応ができ、病理所見と対応させることで乳管内進展の診断能の向上も期待できる。

（3）乳房部分切除後乳房照射の省略に関する研究：ホルモン感受性があり、HER2 陰性、核異型度の弱いサブタイプに術後ホルモン剤内服下に乳房照射を省略する臨床研究についても、本研究により確立された手術方法により、2015 年 10 月から 7 年間の症例集積期間に上記サブタイプに合致した病理学的 Stage I 以下の部分切除症例 162 例中、断端陰性率は 279 例中 162 例 58.1%で、適応となる症例の増加に貢献したと思われた。乳房照射の省略による成績も、同意が得られて研究に参加した 131 例で観察期間中央値 2.9 年とまだ短い、5 年累積温存乳房内再発率 4.5%（95%信頼区間 0～11.1%）と欧米の照射群 6.7%<sup>7)</sup>に比較して遜色のない結果であった。

（4）癌部・非癌部の穿刺吸引細胞診検体からの RNA 抽出：切除断端の分子生物学的マーカーの検索に関しては、癌部と非癌部からの細胞採取から着手した。試行錯誤の結果、切除標本から適切な部位に穿刺吸引して細胞を採取し、氷温下での保管後に RNA 抽出することとした。抽出物に対して RNA Integrity Number (RIN) を算

出し、RNAの品質の客観的評価を行った結果、RINが7以上の質の良いRNAを抽出することが可能であることを確認した。ペアサンプルのうち質の良い非浸潤性乳管癌症例3例に対して定量的RT-PCR法に基づくRNAアレイ解析をおこなったところ、癌部・非癌部間の発現強度が有意に異なる2066種類のトランスクリプトがリストアップされ、その上位には乳癌に関連するものも含まれていた。

(5)乳管内から採取される細胞検体でのRNA抽出:同一切除標本の癌と非癌のペアサンプル採取と並行して、乳管内からのサンプル採取も行った。すなわち、乳管内進展に関わる分子生物学的マーカーは乳管内に高濃度に存在すると考えられ、異常乳頭分泌症例に対する日常的な検査である乳管内視鏡に注目し、良性の乳管内乳頭腫と主に乳管内進展をする乳癌だった症例合計37例の乳管内視鏡施行時の乳管内洗浄細胞診検体を用いてRNAの分析を行ったところ、劣化の少ないRNAが得られることを報告した。

(6)生物学的切除断端マーカーの探索:前述の研究で乳管内進展に関連すると思われたRNAであるCARTPTとBRCAT54を乳管内からの細胞サンプルで検討した。RNAの質と量の観点から検討可能と思われた乳癌症例4例と良性(乳管内乳頭腫)2例で測定したところいずれも検出することができた。乳管内洗浄の細胞診サンプルから乳管内進展に関連するRNAが確認できたことから、CARTPTとBRCAT54は生物学的切除断端マーカーの候補になり得ると思われた。乳管内から採取された細胞サンプルでRNAを評価することは可能と思われ、今後生物学的切除断端マーカーの探索に役立つ可能性が示唆された。癌と非癌の違いを探求する上で乳管内から採取される細胞は腫瘍などから採取される場合に比べて間質が混在することが少ないことが利点であると思われた。

## 引用文献

- 1) Veronesi U, et al: Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347(16): 1227-1232. 2002
- 2) Cuzick J, et al: Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *Lancet Oncol.* 16(1): 67-75. 2015
- 3) McCormick B, et al: RT0G 9804: a prospective randomized trial for good-risk ductal carcinoma in situ comparing radiotherapy with observation. *J Clin Oncol.* 33(7): 709-715. 2015
- 4) 軸藺智雄: Liquid based cytology(LBC)を用いた甲状腺細胞診における遺伝子発現解析の可能性、第57回日本人間ドック学会学術大会、2016年7月
- 5) Jikuzono T, et al: The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Int J Oncol.* 2013;42:1858-68
- 6) 蒔田益次郎, ほか: 異常乳頭分泌を呈する乳癌に対する乳房温存手術-C T guided thermoplastic assisted segmentectomy-. *乳癌の臨床*, 19(2): 142-149, 2004
- 7) Clarke M, et al: Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 366: 2087-2106. 2005

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jikuzono Tomoo, Manabe Eriko, Kure Shoko, Akasu Haruki, Ishikawa Tomoko, Fujiwara Yoko, Makita Masujiro, Ishibashi Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Microarray analysis of ductal carcinoma in situ samples obtained by puncture from surgical resection specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-021-05760-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jikuzono Tomoo, Manabe Eriko, Kure Shoko, Akasu Haruki, Ishikawa Tomoko, Fujiwara Yoko, Makita Masujiro, Ishibashi Osamu	4. 巻 15
2. 論文標題 RNA recovery from specimens of duct-washing cytology performed contemporaneously with mammary ductoscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-022-05928-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 蒔田益次郎、眞鍋恵里子、許田典男、大橋隆治	4. 巻 35（1）
2. 論文標題 乳癌の乳房部分切除術で断端陰性率を向上させる因子について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 乳癌の臨床	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 蒔田 益次郎、赤須 東樹、軸園 智雄、市川 太郎、五味 直哉、菊池 真理、許田 典男、北山 康彦	4. 巻 79
2. 論文標題 造影超音波による乳癌の広がり診断	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 459-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 蒔田 益次郎	4. 巻 72
2. 論文標題 手術ステップごとに理解する標準術式アトラス 8.乳腺 1) 乳房部分切除	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床外科	6. 最初と最後の頁 326-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蒔田 益次郎、眞鍋 恵里子、佐藤 路子、呉 壮香、許田 典男
2. 発表標題 非照射による乳房部分切除の安全な実施に関する研究～症例集積進捗状況
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 軸藺智雄、眞鍋恵理子、石川朋子、赤須東樹、石橋宰、杉谷巖、蒔田益次郎
2. 発表標題 乳管内視鏡を用いた乳管内腫瘍性病変のRNA解析について
3. 学会等名 第53回日本内分泌外科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蒔田益次郎、眞鍋恵理子、許田典男、大橋隆治
2. 発表標題 術後に評価が可能な術前広がり診断の模型 マスキングカラーシミュレーション
3. 学会等名 第28回日本乳癌画像研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒔田益次郎、眞鍋恵理子、許田典男、大橋隆治
2. 発表標題 乳癌の乳房部分切除の切離線決定におけるシミュレーション模型の有用性
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 軸圍 智雄、眞鍋 恵理子、石川 朋子、赤須 東樹、石橋 宰、杉谷 巖、山田 哲、蒔田 益次郎
2. 発表標題 非浸潤性乳管癌の疑似細胞診検体を用いた次世代型アレイ解析について
3. 学会等名 第52回日本内分泌外科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒔田 益次郎、眞鍋 恵理子、許田 典男、大橋 隆治
2. 発表標題 乳癌の乳房部分切除における断端陰性率向上に向けて～画像診断をどう切除に生かすか～
3. 学会等名 第29回日本乳癌画像研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蒔田益次郎、眞鍋 恵理子、許田 典男、大橋 隆治
2. 発表標題 術後に評価が可能な術前広がり診断の模型 マスキングカラーシミュレーション
3. 学会等名 第28回日本乳癌画像研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 蒔田 益次郎、鈴木 えりか、赤須 東樹、軸菌 智雄
2. 発表標題 乳癌の広がり診断における造影超音波の有用性
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 えりか、蒔田 益次郎、許田 典男、北山 康彦
2. 発表標題 造影超音波による乳癌の広がり診断と樹脂塗料による広がりシミュレーション模型を使った乳腺部分切除
3. 学会等名 日本乳癌学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	軸菌 智雄  (Jikuzono Tomoo)  (10465312)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	
研究 分担者	石川 朋子  (Ishikawa Tomoko)  (70212850)	聖徳大学・人間栄養学部・教授   (32517)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------