

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22501056
 研究課題名(和文) 乳癌患者における骨髄微小転移と骨微小環境の相互作用についての検討
 研究課題名(英文) Elucidation of interaction between bone marrow micro-metastases in breast cancer patients
 研究代表者
 高橋 俊二 (TAKAHASHI SYUNJI)
 公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター臨床部・研究員
 研究者番号：90221358

研究成果の概要(和文)：

早期乳癌患者におけるDTC(骨髄微小転移)と骨微小環境との相互作用、ビスホスホネートの効果を明らかにする為、術前化学療法にゾレドロン酸(ZA)投与を併用し、病理学的効果、DTC、CTC(血中循環腫瘍細胞)、CEC(血中循環血管内皮細胞)の変化を検討した。30例の患者に投与し、9例でGrade 2-3の病理学的効果が得られた。CTCは治療開始前3例で陽性であったが治療後消失した。CECは治療に伴い上昇した。化学療法+ZAの併用によりCECが増加する可能性、更にCECの変動が治療効果のバイオマーカーになる可能性が示された。DTCは治療前3例のみ陽性であり細胞数も少なく、周囲微小環境の細胞との相互関係を検討するのは困難であった。骨転移病変での再検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：

To elucidate the interaction of disseminated tumor cells in bone marrow (DTC) and bone microenvironment and the effects of bisphosphonates in early breast cancer, we treated breast cancer patients with neoadjuvant chemotherapy with zoledronic acid (ZA), and examined pathological response and changes of DTC, circulating tumor cells (CTC) and circulating endothelial cells (CEC). We treated 30 patients and had Grade 2 to 3 response in 9 patients. CTC was positive in three patients and all became negative after chemotherapy. CEC increased with chemotherapy. Chemotherapy with ZA may increase CEC, and CEC may become a biomarker of neoadjuvant chemotherapy. DTC was positive in only three patients and tumor cells were few, so it was difficult to investigate interaction between tumor cells and cells in bone micro-environment. It should be necessary to investigate interaction between tumor cells and cells in bone micro-environment in the samples of bone metastases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：乳癌 骨転移 骨髄微小転移 骨微小環境 ビスホスホネート

1. 研究開始当初の背景

早期がん患者においても骨髄内に少量のがん細胞が存在し(DTC)、乳癌などで独立した予後因子であることが報告されている。さらにDTCはCK19+, CD24-/44+, epiCAM+, MUC1-などの表面マーカー、FGF-2を分泌またはFGFに反応して増殖すること、さらに長期間骨髄に存在すること、術後補助化学療法では減少しにくいことが報告され、癌幹細胞(cancer stem cell)の性格を持っていることが示唆されている。乳癌は骨転移を特異的に起こしやすい癌腫であるが、骨髄中のDTCと骨転移との関係、あるいはDTCがどのような刺激によって骨転移を引き起こすかについては明らかでない。一方、DTCを抑制する分子標的治療についても検討が開始され、HER1/HER2阻害小分子化合物であるlapatinibが骨髄DTCを減少させるとの報告があり、また最も活性の高いビスホスホネートであるゾレドロン酸(ZA)が骨髄DTCを減少させること、早期乳癌患者の術後補助内分泌療法にZAを追加することにより、再発が減少することが報告された。ZAは骨髄中のDTCが癌幹細胞となって増殖するのを阻害することで作用している可能性が考えられる。一方、術前化学療法にZA追加により病理学的な浸潤径は有意に縮小し、また病理学的完全寛解(pCR)率も有意に改善した(AZURE Study)。我々は以前より乳癌の骨転移の機序の解明と新たな治療法の開発について研究を行い、BPの骨転移に対する効果についての臨床研究、またアロマターゼ阻害剤にともなう骨量減少に対するZAの予防効果についての多施設臨床試験を遂行している。

2. 研究の目的

早期乳癌患者で術前化学療法を行う症例にZAを併用する臨床研究を行い、1)治療効果が増強するかどうか、2)DTCが減少するかどうかを検討するとともに、骨髄におけるDTCとその微小環境との関係について、明らかにするとともに、臨床検体の検討で重要性が示唆された分子について、骨転移形成での遺伝子発現の検討、あらたなDTCおよび骨転移に対する分子標的薬剤の開発をめざす。

1) 早期乳癌患者に対する術前化学療法とゾレドロン酸の併用：早期乳癌患者で術前化学療法(アンストラサイクリン+タキサン)を行う症例にZA(ゾメタ)4mg点滴4週毎(6ヶ月間)を併用し、1)臨床的に治療効果(臨床的奏効率および病理学的奏効率)が増強するかどうかを検討する。さらに、2)治療の前後で骨髄生検を行い、骨髄DTCが減少するかどうかを検討するとともに、末梢血循環腫瘍細胞(circulating tumor cells, CTC)、末

梢血循環血管内皮細胞(circulating endothelial cells, CEC)も測定しその変化を検討する。

2) 骨髄におけるDTCとその微小環境との関係：骨髄生検におけるDTCと微小環境細胞(骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮、血液細胞など)の関係、癌細胞と微小環境との相互作用に関連すると考えられる分子の発現を検討する。

③ DTCおよび骨転移に対する分子標的薬剤の開発：乳がん細胞株のマウス骨転移モデルにおいて、病理、BRI system等を用い、重要性が示唆された分子を抑制する治療方法について検討する。

3. 研究の方法

1) 早期乳癌患者に対する術前化学療法とZAの併用：T≥3cm, stage IIA-IIIIB, HER2陰性の早期乳癌患者で術前化学療法(CEF→パクリタキセル)を行う症例(30例)にゾメタ4mg点滴4週毎(6ヶ月間)を併用し、その効果を検討する。

A) 臨床的に治療効果(臨床的奏効率および病理学的奏効率)が増強するかどうかを検討する。Primary endpointは病理学的奏効率(grade 2+3/全症例)であり、secondary endpointは病理学的完全寛解率、乳房温存率、腋窩リンパ節転移消失率、無遠隔転移生存率、無病生存率、全生存率、有害事象である。AZURE studyにおける化学療法+ZAの術前化学療法症例では病理学的完全寛解(pCR)率は化療のみ5.8%対ZA群10.9%と有意に改善したと報告されており、ZA併用によって病理学的奏効率が1.5-1.8倍に上昇することが期待される。従って病理学的奏効率が45-50%と期待する。

B) 治療の前後で骨髄生検を行い、骨髄DTCが減少するかどうかを検討するとともに、CTC, CECを測定しその変化を検討する。

2) 骨髄におけるDTCとその微小環境との関係：骨髄生検におけるDTCと微小環境細胞の関係を検討する。

A) 病理学的検討：骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮、血液細胞を免疫染色も用いて特異的に染色し、DTCとの関係を明らかにする。

B) 相互作用に関連する分子の検討：DTCまたは癌幹細胞と微小環境の相互作用に関連すると考えられる分子の発現を網羅的に検討する。さらに治療の前後の骨髄生検を用いて、それらの分子の発現変化を検討する。

3) DTCおよび骨転移に対する分子標的薬剤の開発：ヒトまたはマウス乳がん細胞株およびその好骨転移性サブクローンを用いたマウス骨転移モデルにおいて、重要性が示唆された分子に対する抑制剤、中和抗体等を用いて抑制効果を検討する。その為に上記の骨転

移モデルを維持する。

4. 研究成果

H24年度において30例の早期乳癌患者に対するゾレドロン酸併用の術前化学療法を終了し、病理学的効果が明らかになった29例中3例でGrade 3、6例でGrade 2が得られた(図1)。CTCは治療開始前30例中3例で陽性であったが3例とも治療後消失した。CECは治療前 80 ± 88 から治療後 605 ± 428 と治療に伴い上昇し(図2)、効果が高い患者ではより増加する傾向があった(図3)。

化学療法とゾレドロン酸の併用による術前化学療法で高い病理学的効果が得られなかったが、化学療法+ゾレドロン酸の併用によりCECが増加する可能性、更にCECの変動が治療効果のバイオマーカーになる可能性が示された。

(図1-3)

図1. Pathological response

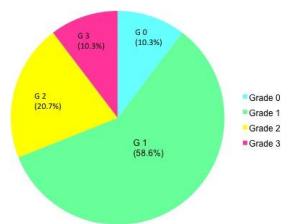


図2. 化学療法中のCEC数

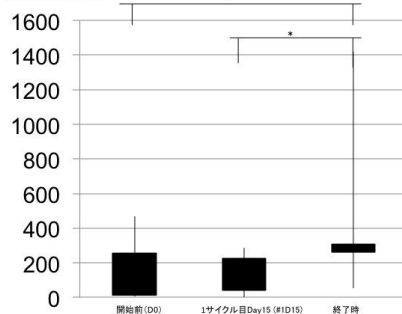
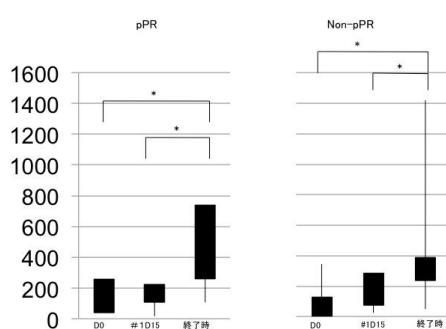


図3. Pathological PR (pPR) groupとnon-pPR groupのCEC数



2) 骨髄におけるDTCとその微小環境との関係: 骨髄生検におけるDTCと微小環境細胞の関係を検討する。

DTC陽性例は30例中で治療前に3例のみ陽性であり細胞数も少なく、周囲微小環境の細胞との相互関係を判断するのは困難であった。また癌幹細胞と微小環境の相互作用に関連すると考えられる分子を検討するのも困難であり、骨転移病変での再検討が必要と考えられ、準備を開始している。

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14件)

Kodaira M, Takahashi S, Yamada S, Ueda K, Mishima Y, Takeuchi K, Yamamoto N, Ishikawa Y, Yokoyama M, Saotome T, Terui Y, Hatake K. Bone metastasis and poor performance status are prognostic factors for survival of carcinoma of unknown primary site in patients treated with systematic chemotherapy. *Ann Oncol.* 2010 Jun;21(6):1163-7.

Osako T, Horii R, Matsuura M, Domoto K, Ide Y, Miyagi Y, Takahashi S, Ito Y, Iwase T, Akiyama F. High-grade breast cancers include both highly sensitive and highly resistant subsets to cytotoxic chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Sep;136(9):1431-8

Osako T, Horii R, Matsuura M, Ogiya A, Domoto K, Miyagi Y, Takahashi S, Ito Y, Iwase T, Akiyama F. Common and discriminative clinicopathological features between breast cancers with pathological complete response or progressive disease in response to neoadjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(2):233-41.

Yuasa T, Maita S, Tsuchiya N, Ma Z, Narita S, Horikawa Y, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I, Takahashi S, Hatake K, Habuchi T. Relationship between bone mineral density and androgen-deprivation therapy in Japanese prostate cancer patients. *Urology.* 2010 May;75(5):1131-7.

Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied

Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab.* 2010 Jul;28(4):365-83.

Yoshinori Ito, Koichi Nagasaki, Yoshio Miki, Takuji Iwase, Futoshi Akiyama, Masaaki Matsuura, Rie Horii, Masujiro Makita, Nahomi Tokudome, Masaru Ushijima, Masataka Yoshimoto, Shunji Takahashi, Tetsuo Noda and Kiyohiko Hatake. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. *Cancer Sci.* 2011 Jan;102(1):130-6

Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Saito K, Takahashi S, Hatake K, Fukui I. Treatment outcome and prognostic factors in renal cell cancer patients with bone metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2011 Apr;28(4):405-11.

Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L, Daniels A, Carrière P, Dansey R. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol.* 2012 May;23(5):1341-7

Takahashi S, Miyazaki M, Okamoto I, Ito Y, Ueda K, Seriu T, Nakagawa K, Hatake K. Phase I study of dasatinib (BMS-354825) in Japanese patients with solid tumors. *Cancer Sci.* 2011 Nov;102(11):2058-64.

Takahashi S, Iwase T, Kohno N, Ishikawa T, Taguchi T, Takahashi M, Horiguchi J, Nakamura S, Hozumi Y, Fukunaga M, Noguchi S. Efficacy of zoledronic acid in postmenopausal Japanese women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 12-month results. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(2):685-93.

Ito Y, Suenaga M, Hatake K, Takahashi S, Yokoyama M, Onozawa Y, Yamazaki K,

Hironaka S, Hashigami K, Hasegawa H, Takenaka N, Boku N. Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of Neratinib (HKI-272) in Japanese Patients with Advanced Solid Tumors: A Phase 1 Dose-escalation Study. *Jpn J Clin Oncol.* 2012 Apr;42(4):278-86.

Araki K, Ito Y, Takahashi S. Re: Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: A combined analysis of three pivotal, randomised, phase 3 trials. *Eur J Cancer.* 2013 Mar 27. [Epub ahead of print]

Takahashi S. [Bone metabolic markers for evaluation of bone metastases]. *Clin Calcium.* 2013 Mar;23(3):391-400. doi: CliCa1303391400. Japanese.

Takahashi S. [Clinical characteristics of bone metastases of breast cancer]. *Nihon Rinsho.* 2012 Sep;70 Suppl 7:118-23. Japanese.

[学会発表] (計 11 件)
中山美恵、高橋俊二、河合佑子、小林心、小林隆之、堤千寿子、田辺真彦、伊藤良則 早期乳癌患者に対するゾレドロン酸併用術前化学療法 第 2 相試験 中間報告 第 20 回 日本乳癌学会学術総会 2012. 6. 28 熊本

高橋俊二 デノスマブとゾレドロン酸を比較した第 III 相二重盲検比較試験の統合解析における顎骨壊死の発現率と転帰 第 20 回 日本乳癌学会学術総会 2012. 6. 30 熊本

高橋俊二 教育講演 支持療法 2 : 骨転移治療の新展開 第 10 回 日本臨床腫瘍学会 2012. 7. 26 大阪

高橋俊二 日本臨床腫瘍学会・日本乳癌学会合同シンポジウム Biology から考える乳がん治療戦略 Progress and future of bone-targeted therapy 第 20 回 日本臨床腫瘍学会 2012. 7. 27 大阪

S. Takahashi, T. Iwase, N. Kohno, T. Ishikawa, T. Taguchi, M. Takahashi, J. Horiguchi, S. Nakamura, M. Fukunaga, S. Noguchi. Zoledronic acid inhibits adjuvant letrozole-associated bone loss in postmenopausal Japanese women with early breast cancer. 米国臨床腫瘍学会 2011. 6. 4 シカゴ

高橋俊二 骨転移における RANK/RANKL 系の

役割 日本がん治療学会 2011. 10. 27 名古屋

高橋俊二 骨転移治療の重要性とビスフォスフォネート製剤のリスクベネフィット 日本口腔外科学会 2011. 10. 22 大阪

高橋俊二、徳留なほみ、伊藤良則、岩瀬拓士、畠清彦 アロマターゼ阻害剤による骨代謝障害の予測因子 日本乳癌学会総会 2010. 6. 25 札幌

高橋俊二 病態に基づいた骨転移に対する治療：臨床での実際 日本癌治療学会イブニングセミナー 2010. 10. 29 京都

高橋俊二、湯浅健、福井巖 前立腺癌骨転移の薬物治療—腫瘍内科の立場から 前立腺癌シンポジウム 2010. 12. 12 東京コンファレンスセンター・品川

高橋俊二 乳癌骨転移の臨床 癌と骨病変研究会 2010. 11. 19 東京 千代田放送会館

〔図書〕(計2件)

高橋俊二 編 先端医学社 がん骨転移治療-BP 治療による Bone management 2012

中村清吾、林直輝 編 高橋俊二他著 篠原出版新社 乳癌の骨マネジメント 2011

〔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

高橋 俊二 (TAKAHASHI SHUNJI)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター臨床部・研究員
研究者番号：90221358

(2) 研究分担者

伊藤 良則 (ITO YOSHINORI)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター臨床部・研究員
研究者番号：00261131