

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 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591420

研究課題名（和文） 乳がん化学療法における一酸化窒素供与剤併用の上乗せ効果の研究

研究課題名（英文） The study that nitroglycerin treatment may increase response to chemotherapy via inhibitions of hypoxia-inducible factor-1 pathway in patients with breast cancer.

研究代表者

甘利 正和（AMARI MASAKAZU）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50400312

研究成果の概要（和文）：

本研究により、HIF-1 α （hypoxia-inducible factor-1 α ）に誘導される遺伝子群で最も発現量が高い遺伝子が Hexokinase II（HK II）であることが判明した。HK II は乳癌の 44% に発現しており、独立した再発予後因子となることが分かった。ER 陽性乳癌でも再発予後因子となることが分かり、術後補助療法決定の指標となる可能性がある。また、HIF-1 α の予後不良性に HK II 発現が密接に関与していることから、その阻害は新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study suggest that HK II is induced by HIF-1 α and plays important roles in the proliferation and/or progression of breast cancer by increased glycolytic activity. HK II status is considered a potent prognostic factor in human breast cancer patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学、一酸化窒素供与剤、HIF-1 α 、HK II

1. 研究開始当初の背景

癌腫瘍組織内はヒト正常組織と比較して相対的に血管が不足した状態にあり、そのため低酸素状態となっている。更に、腫瘍組織

内の低酸素状態により hypoxia-inducible factor-1 α （HIF-1 α ）が腫瘍組織内に蓄積し、その結果、抗がん剤耐性に関与する P-glycoprotein や腫瘍血管新生を介して遠隔転移を促す vascular endothelial growth

factor (VEGF)等の蛋白質が誘導され、腫瘍の悪性度が高くなることが知られている。これに対してnitroglycerin等の一酸化窒素供与剤は、低酸素状態下の腫瘍細胞内における酸素分布の調節、腫瘍細胞内のHIF-1 α の抑制、HIF prolyl hydroxylaseの活性化を介するHIF-1 α ユビキチン化の促進、腫瘍組織内の血流増加を介する腫瘍組織内低酸素状態の改善などにより、低酸素誘導性抗がん薬耐性機序の改善に関与することが示唆されている。基礎研究として、我々は放射線科と協力して、生体内において低酸素領域に蓄積されるニトロイミダゾール誘導體であるFRP170を用いて、肺癌症例生体内の腫瘍内低酸素状態の画像化に成功した。腫瘍体積の増大とともに腫瘍内の低酸素領域が拡大し、治療抵抗性と関係することが示唆された。

一方、nitroglycerinは強力な血管拡張薬として虚血性心疾患や心不全の治療薬として安全に使用されている薬剤である。我々は手術可能肺腺癌患者において手術前にnitroglycerinを投与することにより、切除腫瘍組織内におけるHIF-1 α 、P-glycoprotein、VEGFを著明に抑制することを明らかにしている。進行肺腺癌患者において、抗がん剤投与前の3日間nitroglycerin投与により血漿中のVEGF濃度は減少し、血漿中VEGF濃度の低下が16pg/ml以上の患者では感度84%、特異度84%でDocetaxel+Carboplatin併用療法への反応が認められた。このことは、nitroglycerinが主にHIF-1 pathwayの抑制を介して、腫瘍組織内のVEGF、P-glycoproteinを減少させることによりDocetaxel+Carboplatin併用化学療法への抗がん薬感受性を増加させたことを示唆するものである。更に、nitroglycerinとS-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine(SNAP)は、担癌モデルマウスの腫瘍組織内の活性型p53を増加させ、化学療法と放射線療法への感受性を増加させることが示唆されている。また、SNAPはdoxorubicin耐性大腸癌細胞株において、抗がん剤耐性化の原因蛋白であるmultidrug resistance associated protein 3(MRP3)のニトロ化を介してMRP3の機能を抑制することによりdoxorubicinに対する癌細胞の感受性を回復させることが報告された。

我々のランダム化第II相臨床比較試験において、未治療進行肺腺癌患者におけるnitroglycerin+Vinorelbine+Cisplatin併用化学療法とVinorelbine+Cisplatin併用療法の腫瘍縮小効果と無増悪生存期間を比較し、いずれも前者が有意に優れており、

nitroglycerinはVinorelbine+Cisplatin併用療法でも抗がん剤増強効果を持つ可能性が示唆された。

2. 研究の目的

一酸化窒素供与剤であるnitroglycerinと化学療法の併用による肺腺癌における抗がん薬増強効果の報告が散見されるが、乳癌における報告は認められない。本研究では、乳癌における標準化学療法に対する抗がん薬増強剤としてのnitroglycerinの上乗せ効果の解明を目的として、乳癌におけるnitroglycerinによる低酸素誘導性抗がん薬耐性機序の改善の検討、Docetaxelに対する抗がん薬増強剤としてのnitroglycerinの腫瘍縮小効果と安全性の検討、同じtaxane系薬剤のPaclitaxelや経口5-FU剤のCapecitabineなど乳癌標準化学療法における抗がん薬増強剤としてのnitroglycerinの効果と安全性の検討を行う。

近年、抗VEGF抗体であるBevacizumabが大腸癌や肺非小細胞癌に対する化学療法との併用で、腫瘍縮小効果、無増悪生存期間、全生存期間を改善することが報告され、VEGF抑制効果と抗がん剤増強効果の関係が注目されている。これらのことから、nitroglycerinは腫瘍組織内p53活性化、P-glycoproteinとVEGFの抑制効果を介してtaxane系薬剤の治療効果を増強する可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、乳癌患者へのnitroglycerin投与による血管新生因子の変化を、血液中や投与前の針生検組織と投与後の切除標本組織で比較検討し、その有効性を検証する。その後、肺腺癌で効果が示唆されているDocetaxel+nitroglycerin併用化学療法において同様の検討を行い、その有効性を検証する。更に、他の乳癌標準化学療法とnitroglycerin併用療法への応用を計画している。

あらゆる病期(Stage I~IV)における乳がん患者を対象として、nitroglycerinを投与して、nitroglycerin投与の有効性を検証する。Nitroglycerin投与前後におけるVEGFを比較することにより、nitroglycerinによる血漿中VEGFの変化と臨床病理学的因子(腫瘍径、リンパ節転移の有無、hormone status、HER2 statusなど)との関連性を検討する。

さらに、手術可能乳がん患者における術前 nitroglycerin 投与の有無の有無による切除標本での HIF-1 α 、VEGF、p53、P-glycoprotein などの血管新生因子の発現を、腫瘍の中心部、辺縁部に分けて免疫組織学的に比較検討し、腫瘍全体としてだけでなく、局所的な変化も観察する。

また、手術可能乳癌患者における術前針生検組織と手術切除標本を用いた術前 nitroglycerin 投与による同一個体内での血管新生因子の発現の変化を免疫組織学的に比較検討することにより、本当の意味での nitroglycerin 投与の有効性が検証できると考えられる。結果的に nitroglycerin 投与が全例に有効でなくても、投与が有効な症例集団の選別は可能であると考えられる。

実際に、nitroglycerin 投与の有効性が検証できたら、Docetaxel+nitroglycerin 術前化学療法による治療効果の検討に移る。術前化学療法としての Docetaxel 単剤群と Docetaxel+nitroglycerin 併用群での、投与前後の血漿中 VEGF の比較検討、同一個体内（術前針生検組織と手術切除標本）での血管新生因子発現の免疫組織学的な比較検討、投与後の Docetaxel 血中濃度の比較検討を行い、最終的に乳癌標準術前化学療法である Docetaxel に対する抗がん薬増強剤としての nitroglycerin の上乗せ効果を検証する。

術前化学療法における Docetaxel に対する nitroglycerin の上乗せ効果が検証されれば、組織採取が困難である遠隔転移（肺、肝、骨等）症例に対しても、臨床的効果の検討を広く行う。更に、乳癌標準化学療法で用いられる Docetaxel 以外の抗がん剤（Paclitaxel, Capecitabine など）に対する nitroglycerin の上乗せ効果についても検証する予定である。最終的には、乳癌標準術前化学療法に対する抗がん薬増強剤としての nitroglycerin の上乗せ効果を検証する多施設共同ランダム化比較試験の立ち上げを目指す。

4. 研究成果

治療歴および予後の判明している乳癌患者 96 例の切除標本での HIF-1 α 、VEGF、p53、P-glycoprotein の発現を確認するための免疫染色を施行した結果、HIF-1 α の過剰発現と生命予後、P-glycoprotein 発現と Taxane 系薬剤の治療抵抗性との関連する傾向が認められた。

Ki-67 は乳癌の増殖能と強く相関しており、現在では術後の治療選択の重要な因子とされている。この Ki-67 LI と HIF-1 α 誘導遺伝子発

現との関連をみると、Ki-67 LI 高値群において Hexokinase II（以下 HK II）、ADRA1B、GP1、ADM の発現が優勢であった。

Characteristics of luminal type patients (n=96)

age, years		%
Median (range)	55(27-87)	
≤50	36	37.5
>50	60	62.5
menopause		
pre-menopause	40	58.4
post-menopause	56	41.6
Pathological tumor size		
2cm(T1)	69	71.8
2-5cm(T2)	19	19.7
>5cm(T3)	8	8.3
Pathological node status		
0	70	72.9
1-3	16	16.6
4-9	7	7.2
>10	3	3.1
Operation		
Mastectomy		
BCS(breast conserving surgery)		
Systemic therapy		
Neoadjuvant chemotherapy	15	15.6
Adjuvant systemic therapy		
Chemotherapy		
Endocrine therapy		

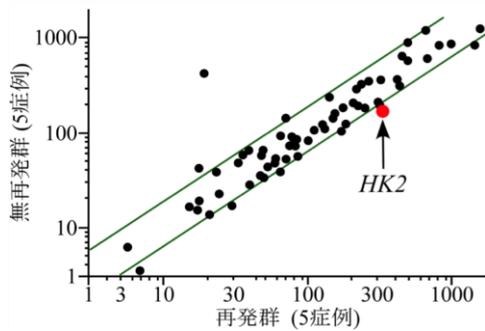
Histopathological factor and biomarkers

ki-67 labeling index		
≤14	62	65.66
>14	33	31.31
CD31		
negative	53	53.54
positive	35	35.35
VEGFS		
negative	41	41.41
positive	53	53.54
HIF-1 α		
negative	37	37.37
positive	54	54.55
MDR-1		
Negative	32	34.7
positive	60	65.2
Histological grade		
I	43	44.8
II	42	43.8
III	11	11.5
Nuclear grade		
1	61	63.5
2	24	25.0
3	11	11.5
Luminal type		
luminalA	63	65.6
Luminal B	33	34.3

更に、マイクロアレイのデータ解析により、HIF-1 α に誘導される遺伝子群で最も発現量が高い遺伝子が HK II であることも判明した。HK II は解糖系の第一段階を触媒する律速控訴であり、免疫組織学的に解析したところ、乳癌の 44% に発現しており、独立した再発予後因子となることが分かった。

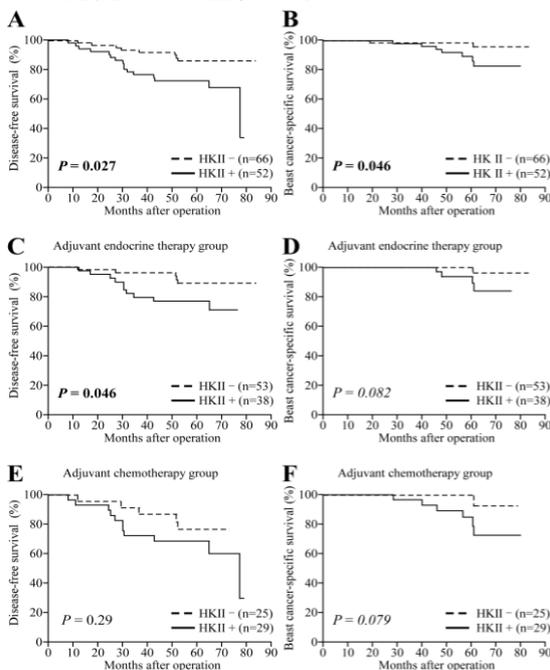
HK II と臨床病理学的因子との関連を見ると、HK II は、核グレード、組織学グレード、Ki-67 LI、HIF-1 α で正の相関が認められた。

HIF-1 α 誘導遺伝子の発現比の散布図
再発群／無再発群



マイクロアレイによる発現比(上図)でも、HIF-1 α 発現とHK II 発現は有意に正の相関を示した。がん組織の低酸素下では転写因子であるHIF-1 α が急速に増加しHK II の発現を誘導する。しかし本研究では、HK II 陽性群56例中19例がHIF-1 α 陰性であった。これはHIF-1 α 以外の因子で発現を調整している可能性が示唆される。今回、HIF-1 α の誘導遺伝子として検討したVEGFはHIF-1 α と関連していたが、MDR-1は相関を認めなかった。これは、HIF-1 α 誘導遺伝子の中でもHIF-1 α の影響を強く受けるものと、他の因子により影響を受けるものが混在していることを意味するものと考えられる。また、誘導遺伝子間の相関関係も見られなかったことから、HIF-1 α n誘導された遺伝子の発現は、それぞれ独立しており、互いの関与は少ない又は無い可能性も示唆される。

HK II 発現による生存曲線



HK II の発現は、log-rank検定においてOS (P=0.046)、DFS (P=0.027) で共に有為な予後規定因子となった(図A, B)。また、術後ホルモン療法を施行した91例においてもDFSで有意差を認めた(図C)。

本研究で、HK II の過剰発現は、乳癌において有意な再発予測因子・予後予測因子となることが判明した。また、術後補助療法としてホルモン療法を施行した患者群においてOSでは有意差が認められなかったが、DFSでは有意差を認めた。

また、HK II はER陽性乳癌でも再発予測因子となることが分かり、術後補助療法決定の際の指標となり得る可能性がある。また、HIF-1 α の予後不良性にHK II 発現が密接に関与していることから、その阻害は新たな治療法とな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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50400312

(2) 研究分担者

石田 孝宣 (ISHIDA TAKANORI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00292318

河合 賢朗 (KAWAI MASAOKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80513530

大内 憲明 (OHUCHI NORIYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

安田 浩康 (YASUDA HIROYASU)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90396482