

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19591507	
研究課題名 (和文)	乳管ネットワークを利用した低侵襲乳癌治療法の開発と評価
研究課題名 (英文)	Evaluation of ductal access for the lower invasive treatment of breast cancer
研究代表者	村田 聡 (MURATA SATOSHI) 滋賀医科大学・医学部・助教 研究者番号：90239525

研究成果の概要：

切除せずに治す、乳癌に対する新しい低侵襲治療法としての乳管内抗癌剤注入治療の、抗腫瘍効果の機序解析と、新規乳癌治療薬の乳管内治療効果を評価した。乳管内投与した抗癌剤 Doxil は乳管外へも浸透し、早期浸潤性乳癌の抗腫瘍効果も期待できた。また、乳管内投与した Doxil はリンパ流にも入ることがわかり、リンパ管内浸潤腫瘍の治療も期待できた。さらに、新規抗癌剤 Abraxane の乳管内治療による乳癌治療効果と乳癌発生予防効果が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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 低侵襲治療 乳癌 抗癌剤 DDS

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳癌の 95%以上は終末乳管小葉単位と呼ばれる小葉の上皮細胞より発生する (Willings SR. Pathol Res Pract. 166, 1980.)。

乳管系は小葉内の細乳管上皮で産生された乳汁が小葉一乳管系から乳頭へと導かれる通路であり、一方で、小葉で発生

した乳癌、特に非浸潤性乳癌が進展していく空間でもある。

逆に、この乳頭から乳癌へと続く乳管の通路は、乳癌治療薬を乳癌局所へ届ける最適の通路となり得る。

乳頭から乳管へのアクセスは当初、早期乳癌診断法の開発として、乳管洗浄液 (ductal lavage) より回収した細胞の細

胞診から始まった。Johns Hopkins University (JHU)のProf. Sukumarらはヒト乳管洗浄細胞のDNA methylationをPCRで調べて、乳癌の早期発見の可能性を報告した(Sukumar et. al. Lancet 357, 2001)。

これに引き続き、Prof. Sukumarと申請者が共同して、乳癌に対する乳管内治療を目的とする研究をJHU癌研究所で行った。局所滞在性の高い抗癌剤を乳管ネットワークを利用して投与を行った初めての乳癌治療研究であった(Murata, et. al. Cancer Res. 66, 2006)。薬剤は局所滞在性の高いliposomal化したDoxorubicin(Doxil)を使用した。

これまでの動物実験により、乳頭から注入した薬剤は小葉まで放射状に繋がる乳管ネットワークにくまなく到達可能であった。

化学物質誘導発癌によるラット乳癌モデル、および、自発乳癌マウスモデルにおいて、乳頭より注入したDoxilは、静脈投与群と比較して乳癌の縮小、消失を伴う高い治療効果を認めた。

さらに、乳管内治療は静脈投与群と比較し、顕著な乳癌発生予防効果を認め、2回の乳管内治療により腫瘍の発生が完全に抑制された。

また、この乳管ネットワークを利用した乳癌療法は、静脈内投与に比べて遙かに血中への薬剤移行が少なかったため、骨髄抑制や臓器障害などの副作用は認められなかった。

このことから、乳管ネットワークを利用した薬物治療は、乳癌局所や乳癌発生母地に高濃度薬剤が直接到達し、きわめて強い抗腫瘍効果を得られる一方、乳管から全身への薬物移行が少ないため副作用が軽減し、低侵襲でQOLの高い乳癌治療法となりうることを示してきた。

しかし現時点では治療効果のメカニズムの解明は不十分であり、Doxil以外の他の薬剤使用の知見は得られていない。

2. 研究の目的

今回の研究はこれまでに行った乳管内治療効果の作用メカニズムの解析と新規抗腫瘍薬剤の抗腫瘍効果の検討と病理学的評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 乳管注入薬剤の抗癌作用のメカニズムの解明

マウスはHER2/neu transgenic mouse(neu-N)を用いた。HER2/neu geneはproto-oncogeneであり、MMPV-promoterによりneu-Nマウスでは乳腺にHER2/neuタンパクの過剰発現がおこるため、生後4ヶ月より自発乳癌が多発発生する(Guy et al. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 89, 1992.)。また、neu-NマウスはHER2/neu抗原(腫瘍抗原)に対して免疫学的寛容状態であり、ヒト癌患者のもつ腫瘍抗原に対する免疫寛容状態と酷似し、pre-clinicalモデルとして知られている(Reilly, et al. Cancer Res. 60, 2000. Ercolini et al. J Immunol. 170, 2003.)。このマウスは滋賀医科大学動物センターで飼育し用いた。

① 薬剤は乳管内に留まるのか、乳管外にも漏出して抗癌作用を発揮するのか。

Doxilを乳管内投与し、一定時間後、全乳腺を摘出し固定後(whole mount technique)、ルーペ像で乳管内、乳管外を観察しDoxilの乳管外漏出の有無を検討した。

また、乳腺組織内にHER2/neuを発現する自発乳癌からの腫瘍株NTを接種し、乳管内治療した。乳管外に発育する腫瘍細胞の傷害程度をコントロールと比較し、薬剤の乳管外漏出の抗腫瘍効果をin vivoで評価した。

② リンパ管、リンパ節への抗癌剤の集積はあるのか。(リンパ管治療も兼ね備えるのか)

マウスにある片側5個の乳頭より、それぞれの乳管内注入したインドシアニンググリーン(ICG)試薬(緑色)を肉眼的および蛍光観察カメラシステム(PDE)にて観察し、リンパ管の経路、および所属リンパ節(センチネルリンパ節)を同定した。(ICGにPDEを当てると蛍光を発しリンパ流の流れが同定できる)

Doxil(赤色)を乳管内投与し、一定時間後にセンチネルリンパ節と反対側のリンパ節を摘出して比較し、Doxilの所属リンパ節内集積を調べた。

③ 乳管上皮細胞は全廃するのか、再生するのか。

Doxilの乳管内投与後、経時的に全摘した乳腺を、病理組織で観察する。乳管上皮細胞や、乳管の形態の障害程度と再生の有無などを

調べた。

(2) 乳管局所滞在性の向上と薬剤感受性向上を狙った、新規薬剤の治療効果の検討

最近、乳癌細胞に高い感受性を示すことの多いタキサン系薬剤に、ナノ粒子アルブミンを接着させた薬剤(Abraxane)が開発された。欧米ではすでに静脈内投与で乳癌患者に臨床応用されている(J Clin Oncol. 23, 2005)。この薬剤の局所滞在性を期待し、マウス自発乳癌モデルを用いて、Abraxaneを乳管内投与し、乳癌治療効果や自発乳癌発生予防効果を、Abraxaneの静脈内投与と比較し、Abraxaneの乳管内治療の有効性を調べた。

4. 研究成果

(1) 乳管注入薬剤の抗癌作用のメカニズムの解明

① 薬剤は乳管内に留まるのか、乳管外にも漏出して抗癌作用を発揮するのか。

Doxilを乳管内投与した2時間後、全乳腺を摘出し固定後(whole mount technique)ルーペ像で乳腺を観察すると、乳管内に赤色のDoxilが貯溜しているのが観察できた。ところが、乳管外にも赤色のDoxilが染み出ているのも確認できた。Doxilは局所滞在性の高い薬物ではあるが、その一部は乳管外へ漏出していくことがわかった。

次に、乳腺組織内にHER2/neuを発現する自発乳癌からの腫瘍株NTを接種したあと、7日目にDoxilまたは生理食塩水を同じ乳管内へ注入し、乳管内治療を行った。腫瘍接種後10日目(治療3日目)に乳腺を摘出し固定後乳腺を観察した。乳管内治療していない群(生理食塩水)では、7日目に乳管内に発育する腫瘍細胞と一部乳管外への腫瘍の浸潤を認め、10日目には乳管外へ伸展するさらなる腫瘍の浸潤を認めた。乳管内治療した群では、10日目で腫瘍は観察されなかった。Doxilの乳管内治療の強力な抗腫瘍効果を示すと共に、薬剤の乳管外漏出が浸潤乳癌に対しても抗腫瘍効果を認めることを示した。

② リンパ管、リンパ節への抗癌剤の集積はあるのか。(リンパ管治療も兼ね備えるのか)

マウスにある片側5個の乳頭より、それぞれの乳管内注入したインドシアニン

グリーン(ICG)試薬(緑色)を肉眼的および蛍光観察カメラシステム(PDE)にて観察すると、時間とともに、リンパ管の経路、および所属リンパ節(センチネルリンパ節)が蛍光を発し容易にリンパ管の流れとセンチネルリンパ節を同定することができた。

次にDoxil(赤色)を乳管内投与し、4時間後にセンチネルリンパ節と反対側のリンパ節を摘出して色を比較すると、Doxilを乳管内注入した所属リンパ節はわずかに赤色に変色していたが、対側のリンパ節の色調の変化は認めなかった。局所滞在性の高いDoxilも乳管内投与後徐々に乳管外へ染みだしリンパ流に乗って所属リンパ節へ集積すると考えられた。

乳管内治療は乳管内病変のみでなく、リンパ管内やリンパ節に進展した癌に対しても治療効果を示す可能性を示唆しており、非浸潤性乳管癌(DCIS)のみならず、早期の浸潤性乳癌に対し乳管内治療法が適応できる可能性を示した。

③ 乳管上皮細胞は全廃するのか、再生するのか。

Doxilをマウス乳管内に投与後、経時的に全摘した乳腺を病理組織で観察する。投与3週間後に乳管は浮腫状で伸展し、終末乳腺が脱落している所見を得た。しかし約7週間後には、乳管や終末乳腺は再生している所見も得た。

(2) 乳管局所滞在性の向上と薬剤感受性向上を狙った、新規薬剤の治療効果の検討

自発乳癌(約5mm)が発生したマウスにAbraxaneを乳管内投与または静脈内投与し、腫瘍の発育を比較すると、乳管内投与群の腫瘍は有意に発育抑制された。

出産授乳後のマウス(生後6ヶ月)で自発乳癌発育の認められていないマウスの乳管内にAbraxaneを投与した群と静脈内投与した群間での自発乳癌発生予防効果を比べたところ、Abraxaneの乳管内投与は有意に腫瘍発生を抑制した。

局所滞在性があると予想されるタキサン系抗腫瘍薬Abraxaneの乳癌治療効果と乳癌発生予防効果が認められた。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 村田 聡、清水智治、阿部 元、来見良誠、谷 徹、Saraswatti Sukumar
乳管ネットワークを利用した乳癌治療と予防の試み
日本乳癌学会 2007年 6月 金沢

② 村田 聡
乳癌に対する乳管内治療の基礎的研究
乳管内視鏡研究会
特別講演
2007年 9月 大阪

③ 森 毅、村田 聡、清水智治、張 弘富、久保田良浩、阿部 元、来見良誠、谷 徹、Saraswati Sukumar
乳癌に対する、intraductal approach による治療実験
第109回 日本外科学会定期学術集会
2009年 4月 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 聡 (MURATA SATOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90239525

(2) 研究分担者

清水 智治 (SHIMIZU TOMOHARU)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70402708

来見 良誠 (KURUMI YOSHIMASA)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70205219

阿部 元 (ABE HAJIME)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：80283563

谷 徹 (TANI TOHRU)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：20179823

(3) 連携研究者

なし