

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07760

研究課題名（和文）血中エンドカンを利用したトリプルネガティブ乳がんの早期予後予測と臨床応用への展開

研究課題名（英文）Development of a prognostic biomarker for breast cancer: Utilization of endocan from patients' blood samples

研究代表者

加藤 良規 (KATO, Yoshinori)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60747210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳がん患者からの血液検体を解析することで、CEAやCA15-3と比較して、エンドカンは早期の乳がんステージの患者からも検出可能であること、乳がんのステージが上がるにつれ、血中エンドカンが高値を示す患者の割合も上昇することを明らかにした。さらに、乳がん患者の術前後の血中エンドカン量を比較すると、動物実験で得られた結果同様、術前に血中エンドカンが高値だった患者は術後にエンドカン値が低下する傾向がみられた。これらのことから、エンドカンは既存の腫瘍マーカーよりも感度が高く、再発予後を早期に診断・予測できる血中マーカーとして期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは、早期発見では比較的生存率が良いものの、乳がんを切除した数年から十数年後に再びがんになる割合が高く、女性のがんによる死因の上位を占めている。そのため、手術後の再発等を早い段階で診断・予測することができれば、乳がん患者の生存率をより高めることができる。乳がんの再発や治療効果判定の指標として現在使用されている血液中の腫瘍マーカーは、早期の乳がんではほとんど高い値を示さず十分な感度が得られてない。本研究で着目している血中エンドカンは、これら既存の腫瘍マーカーよりも鋭敏に血液から検出でき、乳がん患者の予後改善につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our previous study indicated that endocan could be an important factor that allows an early assessment of prognosis for triple-negative breast cancer patients. Here we have expanded the analysis of blood endocan levels into other subtypes of breast cancer patients. The study protocol was approved by the institutional review board from both Showa Univ. Hospital and Hoshi Univ. Participation in the study was voluntary, and written informed consent was obtained from all subjects. We found that endocan expression was more sensitive than frequently-used tumor markers, serum carcinoembryonic antigen (CEA) and cancer antigen 15-3 (CA15-3). Also, the higher the cancer staging, the more blood endocan level in luminal-type breast cancer patients. The surgical removal of the primary breast tumor affected endocan levels in the plasma from mouse models of breast cancer and breast cancer patients. This study will offer valuable insight into blood endocan levels as a liquid biopsy for breast cancer.

研究分野：がん治療・診断学

キーワード：乳がん バイオマーカー エンドカン 血中マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、一生涯のうちで乳がん罹患する日本人女性は 11~12 人に一人と言われている。乳がんは、早期発見では比較的予後は良いものの、術後の再発・転移を起こす割合が高く、女性のがんによる死因の上位を占めている。このように乳がんの恐ろしさは、その高い再発・転移能であり、なかでも HER2 陽性型やトリプルネガティブ乳がん (TN 乳がん) は、特にその性質を有する確率が高い。

これまでに我々は、ヒト由来 TN 乳がん細胞株を使用し、転移能の亢進した MDA-MB-231BR 細胞株が、親株である MDA-MB-231 細胞株と比較して *in vitro* および *in vivo* における増殖能が著しく亢進していることを明らかにしてきた[1]。遺伝子の網羅的な解析により原因遺伝子を探したところ、siRNA による *ESM1* のノックダウンにより MDA-MB-231BR 細胞株の細胞増殖は MDA-MB-231 と同等レベルまで低下したため、この特性獲得には、*ESM1* の遺伝子産物であるエンドカンが寄与していることが明らかとなった。さらに、エンドカンは細胞外に分泌されるため、MDA-MB-231BR を移植したマウスの血中からもエンドカンが検出された。これら前臨床での知見は臨床データによっても裏付けられ、*ESM1* 発現の高い TN 乳がん患者では、発現の低い患者と比較して無再発生存率が有意に低い、すなわち、再発率が高いことが明らかとなった。この相関は他のサブタイプの乳がん患者では見られず、TN 乳がん患者特異的であった。このことから、血中エンドカンは TN 乳がん患者の再発予後を早期に診断・予測できるバイオマーカーとして期待される。

2. 研究の目的

血中エンドカンを TN 乳がんの予後マーカーとして臨床応用するためには、

- ① 原発巣の切除により血中エンドカン量が低下すること
- ② 乳がんの再発により再び血中エンドカン量が上昇すること

を確認する必要がある。

本研究では、当初は TN 乳がん患者のみに着目して研究を進めていく予定であったが、乳がんとエンドカンに関する研究がほとんど行われておらず、特に実際の乳がん患者の血液検体からのエンドカン測定に至っては先行研究が皆無であったことから、対象患者を他のサブタイプにも広げて、下記の二つの項目を目的として研究を進めることとした。

1. 乳がん患者と血中エンドカン量の相関の検討
2. 乳がん原発巣切除による血中エンドカンの動態評価

3. 研究の方法

1. 乳がん患者と血中エンドカン量の相関の検討

研究に先立ち、昭和大学病院および星薬科大学の施設内倫理委員会において研究計画書の承認を受けた。臨床研究は研究計画書に従い、インフォームド・コンセントで同意を得られた乳がん患者についてのみ採血を行った。血液中のエンドカンを、検体情報を伏せた状態で市販の ELISA キットで定量し、各患者の血中エンドカン濃度を算出した。年齢、閉経状態、乳がんのサブタイプ、腫瘍サイズ、リンパ節転移の有無、Ki-67 標識率、摘出術から採血までの期間、血中 CEA 値、血中 CA15-3 値等で層化し、血中エンドカンと乳がん患者の各パラメーターとの相関の有無について検討した。

2. 乳がん原発巣切除による血中エンドカンの動態評価

動物実験については、研究に先立ち、星薬科大学動物実験委員会において研究計画書の承認を受けた。臨床研究についても、前述の通り施設内倫理委員会において承認を受けた研究計画書に従い、インフォームド・コンセントで同意を得られた乳がん患者についてのみ採血を行った。

まずヒト乳がん細胞を移植した担がんマウスから原発巣を除去し、原発巣摘出前後の血中エンドカン量を比較した。その際、ヌードマウスと NSG マウスの乳がん転移に対する感受性の相違を利用し[2,3]原発巣切除後の転移の有無を確認するため、エンドカンを生成する MDA-MB-231BR/*Akaluc* 細胞株を雌性無胸腺ヌードマウスおよび NSG マウスの乳腺脂肪体に移植後、一定の大きさに達した時点で原発巣を摘出した。摘出前後に尾静脈より採血し、血しょうを分離後、サンプルを -80°C で保存した。血中エンドカンの測定は、市販の ELISA キットにより行い、がん細胞の転移は、*Akaluc-AkaLumine* の発光を利用した生体イメージングで観察した。

また乳がん患者も同様に、原発巣切除術前後の血液検体のエンドカン値を ELISA により測定した。なお、糖尿病や敗血症を患っている患者ならびに他組織の原発がんを併発している患者は、

乳がん以外を由来としたエンドカンが血中から検出される可能性があるため、本研究対象から除外した。

4. 研究成果

1. 乳がん患者と血中エンドカン量の相関の検討

2020年から2021年にかけて、昭和大学病院で治療を受けた乳がん患者のうち、インフォームド・コンセントで同意を得られた54人の患者が本研究に参加した。これら患者のデータを層化し解析すると、ルミナルタイプ乳がんのステージが上がるほど患者のエンドカン陽性率も上昇する傾向がみられ、ステージ0からステージ4における患者のエンドカン陽性率は、それぞれ17%、29%、48%、67%であった。また現在血中マーカーとして使われているCA15-3やCEAのステージ0からステージ4における患者のCA15-3またはCEAの陽性率は、それぞれ0%、0%、10%、67%であった。このことから、エンドカンはCA15-3やCEAと比較して、低いステージにおいても血液検体から検出することができ、より有用な乳がんのバイオマーカーとなり得る可能性が考えられた。

2. 乳がん原発巣切除による血中エンドカンの動態評価

動物として無胸腺ヌードマウスを使用した場合では、摘出前には検出されたエンドカンが原発巣の摘出後にはすべてのマウスにおいて検出限界以下となった。一方、超免疫不全マウスであるNSGマウスを使用すると、原発巣摘出後の血中エンドカン値は一律に検出限界以下とはならず、術前に血中エンドカンが高値だったマウスは摘出後にエンドカン値は低下する傾向がみられた。さらに、乳がん患者の原発巣摘出前後の血中エンドカン量を比較すると、NSGマウスで得られた結果同様、術前に血中エンドカンが高値だった患者は術後にエンドカン値は低下する傾向がみられた。

以上のことから、エンドカンは既存の腫瘍マーカーであるCA15-3やCEAよりも感度が高く、再発予後を早期に診断・予測できる血中マーカーとして、乳がん患者の予後改善につながる可能性が期待できる。

5. 参考文献

- [1] Sagara A., Igarashi K., Otsuka M., Kodama A., Yamashita M., Sugiura R., Karasawa T., Arakawa K., Narita M., Kuzumaki N., Narita M., **Kato Y.** Endocan as a prognostic biomarker of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 161, 269-278 (2017).
- [2] Iorns E., Drews-Elger K., Ward T.M., Dean S., Clarke J., Berry D., El Ashry D., Lippman M. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis. *PLoS One* 7, e47995 (2012).
- [3] Milsom C.C., Lee C.R., Hackl C., Man S., Kerbel R.S. Differential post-surgical metastasis and survival in SCID, NOD-SCID and NOD-SCID-IL-2R γ (null) mice with parental and subline variants of human breast cancer: implications for host defense mechanisms regulating metastasis. *PLoS One* 8, e71270 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Daiki, Yoko Kanada, Aya Nagata, Seigo Nakamura, Yoshinori Kato
2. 発表標題 Kinetics of endocan in the peripheral blood before and after the resection of primary breast tumors
3. 学会等名 2021 San Antonio breast cancer symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田彩、金田陽子、大木健多郎、津久井理加、鶴我朝子、中山紗由香、垂野香苗、橋本梨佳子、増田紘子、桑山隆志、明石定子、加藤良規、中村清吾
2. 発表標題 乳癌における血中エンドカンの周術期の動態
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022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	金田 陽子 (KANADA Yoko) (20837950)	昭和大学・医学部・助教 (32622)	
研究分担者	中村 清吾 (NAKAMURA Seigo) (70439511)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	

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
---------	---------