

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791383

研究課題名(和文) 治療抵抗性乳癌における新規慢性炎症促進因子の機能解析

研究課題名(英文) The analysis of a novel chronic inflammatory factor in nonresolving breast cancer

研究代表者

中野 正啓 (Nakano, Masahiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70622463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳癌患者における慢性炎症因子Angpt12と乳癌進行度との関連性について検討した。遠隔転移した乳癌(Advanced)患者血清では、浸潤性乳管癌(IDC)患者、非浸潤性乳管癌(DCIS)患者と比較して、血清Angpt12値は有意に高値であった。また、ホルモンレセプター(エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター)陰性乳癌患者においては、乳癌の核グレードが高い(悪性度が高い)ほど、血清Angpt12値が高値であることが明らかとなった。これらの結果より、乳癌患者における血清Angpt12値は、乳癌の悪性度指標の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is a leading cause of cancer death in women worldwide, and its metastasis is a major cause of disease mortality. In this study, we examined the relationship between angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) and clinical features of breast cancer progression. We investigated whether serum ANGPTL2 levels were associated with clinical features in breast cancer patients. Serum ANGPTL2 levels in patients with metastatic breast cancer were significantly higher than those in healthy subjects or in patients with ductal carcinoma in situ or in non-metastatic invasive ductal carcinoma. Serum ANGPTL2 levels in patients negative for estrogen receptors and progesterone receptors, particularly triple-negative cases, reflected histological grades. Our findings indicate that serum ANGPTL2 levels correlate with breast cancer progression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：乳癌 転移

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において、乳癌は女性の癌罹患率のトップであり、年間の罹患患者数は 70,000 人を超えており、その治療法開発は急務である。乳癌は生物学的特性により分類され、各々の治療標的に応じた薬物療法が展開されている。しかしながら、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、human epidermal growth factor receptor (HER) 2 すべてが陰性であるトリプルネガティブ (TN) 乳癌は、内分泌療法や抗 HER2 療法の効果は期待できない。さらに、TN 乳癌は予後が悪く再発しやすいことも知られており、大きな問題となっている。

### 2. 研究の目的

癌の浸潤・転移により癌の予後は規定されるが、その中で血管・リンパ管新生の果たす役割は大きい。研究代表者は血管新生因子アンジオポエチンに構造上類似しているアンジオポエチン様因子 (Angpt1) の解析を行ってきたが、これまでの解析により、さまざまな癌において Angpt12 の発現が亢進していることを見出した。マウス担癌モデルを用いた解析により、Angpt12 はパラクライン的に血管・リンパ管新生を促進し、オートクライン的に癌細胞自身に作用し遊走能を促進させ、癌の浸潤・転移を促進する因子であることを明らかにした。また、Angpt12 は分泌タンパクであり、血清中に分泌される。研究代表者はヒト血清 Angpt12 値を測定できる ELISA システムを既に構築している。本研究では、乳癌における Angpt12 の発現および機能解明を行い、さらに乳癌患者における血清 Angpt12 値とその臨床的意義を明らかにし、Angpt12 を標的とした新規乳癌治療法開発の基盤研究を行う。

### 3. 研究の方法

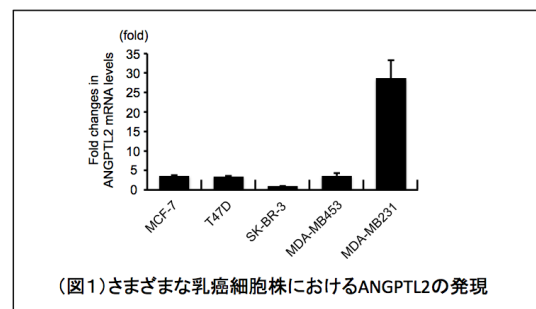
(1) 乳癌細胞株を用いたホルモンレセプターの発現と Angpt12 発現の関連解析：乳癌はその生物学的特性によって分類されるが、Angpt12 を発現する乳癌が実際にどういったタイプで多いのかを明らかにするために、ER、PgR、HER2 の 3 つの因子がそれぞれ陽性、陰性の細胞株を用いて、Angpt12 がどの細胞株で最も発現しているかについて、リアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。

(2) マウス担癌モデルを用いた血中 Angpt12 濃度推移解析：Angpt12 を発現している乳癌細胞を免疫不全マウスの乳腺に同所移植し、がん細胞の増殖・進展に伴い、血清 Angpt12 濃度が変化するか検討を行った。

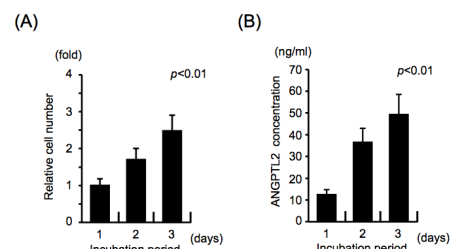
(3) 乳癌患者における血清 Angpt12 値関連解析：熊本大学医学部附属病院 乳腺内分泌外科に入院しているさまざまな乳癌患者の血清 Angpt12 値を測定し、乳癌の生物学的特性、進行度と血清 Angpt12 値との関連について解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌細胞株におけるホルモンレセプターの発現と Angpt12 の発現関連解析：研究代表者は、様々な乳癌細胞株 (MCF-7, T47D, SK-BR3, MDA-MB453, MDA-MB231) においてリアルタイム PCR 法 (Takara) を用いて Angpt12 の発現を検討した。今回用いた細胞の生物学的特性は以下に示す通りである。MCF-7 (ER+, HER2-), T47D (ER+, HER2-), SK-BR-3 (ER-, HER2+), MDA-MB453 (ER-, HER2+), MDA-MB231 (ER-, HER2-)。これらの細胞株より RNA を抽出し、Angpt12 mRNA を測定した結果、MDA-MB231 において最も強く Angpt12 の発現を認めた (図 1)。MDA-MB231 は TN 乳癌細胞株であり、TN 乳癌細胞株において、Angpt12 は誘導されている可能性が示唆された。

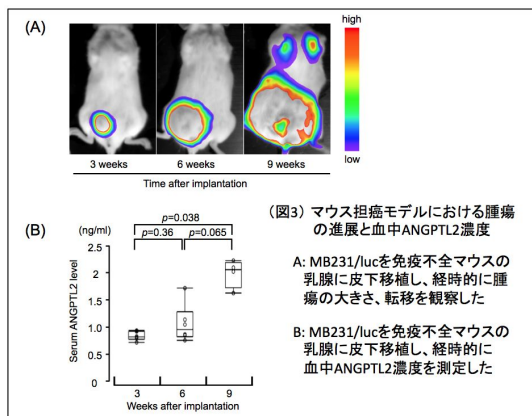


(2) マウス担癌モデルを用いた血清 Angpt12 濃度推移解析：さまざまな乳癌細胞株の Angpt12 発現を解析した結果、TN 株である MDA-MB231 において最も Angpt12 の発現が高かったことより、MDA-MB231 を用いてマウス担癌モデルを作成した。まず、MDA-MB231 が細胞外に Angpt12 タンパクを分泌するかどうかを確認するために、MDA-MB231 を通常培養し、経時的に細胞培養上清液に含まれる Angpt12 蛋白量を ELISA 法 (Human ANGPTL2 Assay Kit : IBL) を用いて検出した。また同時に、MDA-MB231 の細胞増殖も細胞増殖測定試薬 (Cell Counting Kit-8: DOJINDO) を用いて測定し、細胞増殖に伴って細胞培養上清液に含まれる Angpt12 タンパクが増加するか検討した。3 日間培養を続け、経時的に細胞培養上清中の Angpt12 タンパク濃度を測定した結果、Angpt12 タンパク濃度は細胞の増殖に伴って増加することが確認された (図 2)。次に、MDA-MB231 にルシフェラーゼベクター

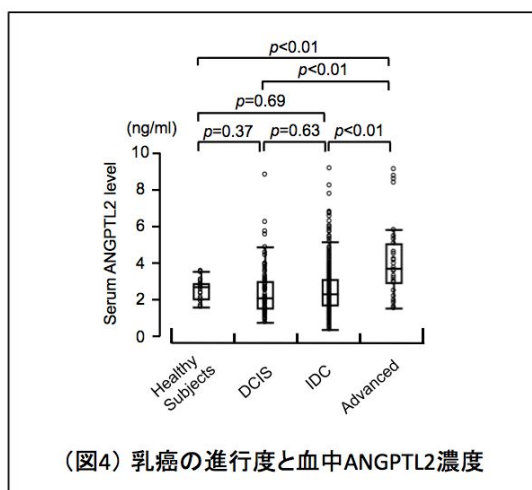


(図2) 乳癌細胞株MDA-MB231の増殖とANGPTL2分泌  
A: MDA-MB231を3日間培養したときの細胞増殖 (1日目の数を1とした)  
B: MDA-MB231を3日間培養したときの培養上清液に含まれるANGPTL2タンパク濃度の推移

を導入し、経時的に腫瘍の大きさ、転移を観察できる細胞株(MB231/Luc)を樹立した。担癌マウスには高度免疫不全マウスであるJAK3-deficient NOD-SCID (NOJ)マウスを用いた。8週齢の雌 NOJ マウスの乳腺にMB231/Luc を移植し、経時的に血清 Angpt12 濃度および腫瘍の大きさについて検討した。腫瘍の大きさは、移植後3週、6週、9週と経過するに伴い増大した。また、移植後9週目には、明らかな肺転移も見出された。血清 Angpt12 濃度も、腫瘍が大きくなるに伴い上昇したが、特に肺転移が見出された移植後9週目において著明に上昇した(図3)。これらの結果より、血清 Angpt12 値は腫瘍の増大、特に転移において上昇する可能性が示唆された。



(3) 乳癌患者における血清 Angpt12 値関連解析：研究代表者は乳癌患者における血清 Angpt12 値を測定し、血清 Angpt12 値と乳癌進行度との関連性について検討した。乳癌患者における血清 Angpt12 値は、遠隔転移した乳癌患者(Advanced)血清において有意に高値であった(図4)。



また、浸潤性乳管癌(IDC)患者における血清 Angpt12 値は、非浸潤性乳管癌(DCIS)患者と有意差はみられなかったが、Angpt12 が癌浸潤・転移を促進する因子であることから、IDC患者におけるより詳細な分類を行い、血清

Angpt12 値との関連性について検討した。その結果、ER、PR 陰性の患者(HR-)における血清 Angpt12 値は、乳癌の核グレード(NG)と相関がみられ、ホルモンレセプター陰性乳癌患者においては、乳癌の核グレードが高い(悪性度が高い)ほど、血清 Angpt12 値が高値であることが明らかとなった(表1)。

	HR-			HR+		
	n	ANGPTL2 levels Median (25, 75 percentile)	P value	n	ANGPTL2 levels Median (25, 75 percentile)	P value
T < 20mm	45	2.37	0.868	264	2.26	0.202
T > 20mm	42	(1.61-3.40)		149	(1.70-2.95)	
n (-)	282	2.27	0.072	299	2.28	0.993
n (+)	111	(1.56-3.30)		114	(1.71-2.98)	
NG 1,2	45	2.27	0.0096	371	2.28	0.971
NG 3	42	(1.58-2.94)		42	(1.48-2.64)	
		2.94		2.62		
		(2.03-3.74)		(1.70-3.42)		

(表1) 乳癌におけるホルモンレセプターの有無と血中ANGPTL2濃度

また、TN 乳癌患者においても、同様に乳癌の核グレードが高い(悪性度が高い)ほど、血清 Angpt12 値が高値であることが明らかとなった。これらの結果より、乳癌患者における血清 Angpt12 値は、乳癌の悪性度指標の一つである可能性が示唆された。以上より、血清 Angpt12 値は、乳癌の病態の一部を反映していることが明らかになった。これらの結果は、乳癌の浸潤・転移を診断する新規診断法の開発の基盤になると考えられる。従来、乳癌の進展・再発などといった病態を把握するためには、CEA や CA15-3 などの血清マーカーに加え、CT、MRI などの画像診断も同時に行われることで総合的に判断されてきた。Angpt12 は従来用いられてきた CEA や CA15-3 といった腫瘍抗原とは異なる性質を有するタンパクであり、血清 Angpt12 濃度と乳癌の病態に関しては、さらなる解析が必要であるが、血清 Angpt12 値が乳癌の新たな病態把握マーカーの一つとして活用できる可能性が見出された。さらに今回、TN 乳癌においても、血清 Angpt12 値が核グレードを反映していたことより、これまで明確な治療法がなかった TN 乳癌の新たな治療法として、Angpt12 を標的とした新規乳癌治療法開発の基盤研究も期待できる。今後は、Angpt12 機能抑制が、TN 乳癌などの治療標的となりうるかどうか、さらなる検討が必要であると思われる。

## 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1件)

Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, Oike Y. Serum ANGPTL2 Levels Reflect Clinical Features of Breast Cancer Patients: Implications for The Pathogenesis of Breast Cancer Metastasis. *Int J Biol Markers* 2014 in press、査読あり

〔学会発表〕(計9件)

中野 正啓、「心タンポナーデを惹起した心嚢液貯留を伴う再発乳癌症例について」、第11回日本乳癌学会九州地方会、2014年3月1日、福岡市

中野 正啓、「当院におけるフルベストラントの使用症例に対する検討」、第51回日本癌治療学会学術総会、2013年10月26日、京都市

中野 正啓、「血清 Angiopoietin-like protein (ANGPTL)2は乳癌の病態を反映する」、第21回日本乳癌学会学術総会、2013年6月27日、浜松市

中野 正啓、「進行再発乳癌における血清 Angiopoietin-like protein (ANGPTL)2の可能性」、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月13日、福岡市

Masahiro Nakano、「Tumor-cell derived Angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of breast cancer metastasis」、第71回日本癌学会、2012年9月21日、札幌市

中野 正啓、「内部に梗塞を伴った乳腺葉状腫瘍の1例」、第174回熊本外科集談会、2012年9月15日、熊本市

Masahiro Nakano、「Chronic inflammatory mediator Angiopoietin-like protein 2 accelerates breast cancer progress」、第20回日本乳癌学会学術総会、2012年6月28日、熊本市

中野 正啓、「乳癌転移における Angiopoietin-like protein の役割」、第20回日本乳癌学会学術総会、2012年6月28日、熊本市

中野 正啓、「Trastuzumab+Letrozoleが長期間奏効している高齢者 invasive micropapillary carcinoma(ER陽性,HER2陽性)の一例」、第17回九州乳癌懇話会、2012年5月17日、佐賀市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中野 正啓 (NAKANO MASAHIRO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70622463