

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861166

研究課題名(和文)乳癌移植マウスにおける凍結療法の検討

研究課題名(英文)The effect of the cryotherapy for breast cancer mice

研究代表者

齊藤 芙美 (SAITO, Fumi)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：40439956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌治療の分野において、現在行われている乳房全摘術及び部分切除術に代わる低侵襲性治療(凍結療法)に注目しその治療効果に関してを基礎的なレベルで検証した。乳癌モデルマウスを作成し、凍結療法を施行後、癌治療に関わる免疫系サイトカインの測定および生存期間の観察を行った。凍結療法を施行することにより、乳癌マウスの生存期間は延長し、関連サイトカインは凍結療法施行後48時間後より上昇することが今回の研究で明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the field of breast cancer treatment, breast mastectomy was performed as a standard medication. We paid attention to low invasive therapy (cryotherapy). We tried to prove the effect of cryotherapy in basic research. Breast cancer implanted mice were performed cryotherapy and measured the survival period and serum cytokine connected with cancer treatment. After cryotherapy, survival period was extended and serum cytokines were elevated 48hours later.

研究分野：外科学

キーワード：乳癌 凍結療法 低侵襲性治療

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌治療の分野において乳癌手術治療は乳房全摘術または乳房温存術が主流となっており、乳房再建などを行わない限りでは乳房の整容性を保つことは困難な状況であった。また、研究開始当初は乳房全摘後の乳房再建術が保険診療の適応外であったため、患者にとっては乳房全摘後再建術に関しても自費診療の一環でありハードルの高い治療であった。このような社会的背景のなかで、低侵襲性治療（特に凍結療法）に注目し、乳癌領域における低侵襲性治療がどのような治療効果をもたらすかを基礎レベルにて検証することとした。

### 2. 研究の目的

乳癌治療の分野において凍結療法は现阶段では保険適応外治療に相当する。乳腺良性腫瘍に対しては一部の臨床で治療として行われているが、乳癌治療の分野においては臨床応用はまだ十分になされておらず、またその効果に関しても基礎的な研究のレベルでは明らかにされていないところが多い。今回の研究では乳癌モデルマウスを作成し、凍結療法を行い、乳癌に対する治療効果に関して基礎的なレベルにおいて証明することを目的とした。

また、乳癌治療の臨床現場においては手術治療のみでなく、薬物療法（抗がん剤、分子標的薬、内分泌療法）の併用により乳癌死亡率の劇的な改善をみることができた。その為、乳癌に対する凍結療法の有用性が証明できた際には第二段階として他の治療方法と凍結療法の併用による治療の相乗効果を期待し、抗がん剤またはホルモン剤の併用投与による治療効果の改善の検証を第二段階の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 乳癌モデルマウスの作成を行う。ヌードマウスに対してヒト乳癌細胞(MB2-31)をマウスの第二乳腺への移植を行い乳癌モデルマウスの作成を行う。

(2) 乳癌細胞移植後約4週で乳房腫瘍（乳癌）が形成される。乳癌腫瘍の形成されたマウスに対して、全身麻酔下での凍結療法を行う。凍結療法は BriMyl 社の Cry-AC キットを使用し液体窒素を用いて乳癌腫瘍をクライオプローブから経皮的に約 30 秒間凍結させ、その後 30 秒室温に戻す一連の操作を3回程度繰り返し腫瘍の完全凍結を行う。一連の処置終了後にマウスは保温室にて麻酔からの完全覚醒を確認し、飼育ゲージに戻す。以上の行程を凍結療法の一連の操作とする。

(3) マウスの生存期間の観察を行う。乳癌細胞移植後、約4週の段階で乳癌腫瘍は形成される。このタイミングを起点とし、乳癌モデルマウスを無作為に2群に分ける操作を

行う。経過観察のみ行う群をコントロール群とする。また、移植後4週の段階で、上記(2)に示す凍結療法を施行する群をクライオ群とする。これら2群における、腫瘍サイズ(縦×横×高さ)の変化及び生存期間に関して比較する。

(4) 凍結療法施行後の血清サイトカイン値の測定を行う。クライオ群では凍結療法施行後24時間及び48時間のタイミングで血液のサンプリングを行い血清サイトカイン(IL4,6,12及びIFN-gamma)の測定を行う。また、コントロール群ではクライオ群が凍結療法を施行するのとほぼ同等のタイミングで血液のサンプリングを行い、同様の項目につき計測する。以上の過程に関しては図1に示す。

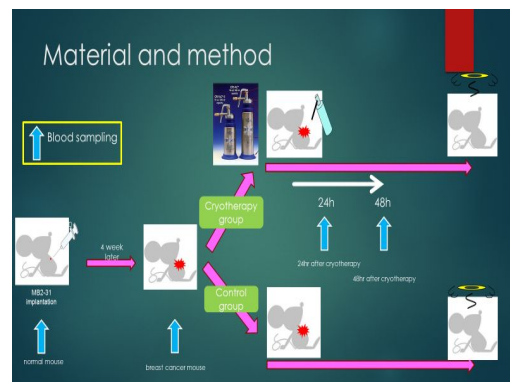


図1 実験手順

(5) 前述(1)～(4)までの行程で乳癌に対する凍結療法の有効性を証明した後は、抗ガン剤との併用による有効性の検証実験を行う。使用薬剤はマウスでの治療データが得られているパクリタキセルを使用。まず、乳癌モデルマウスに対してパクリタキセルのみの投与を行い治療効果（腫瘍縮小率、生存期間）を確認する。ついで、凍結療法を併用した併用群を設定し、凍結療法施行後にパクリタキセルを投与し得られる生存期間の延長や腫瘍縮小効果につき検証する。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌モデルマウスの作成；当初、BALB/Cマウスによる乳癌モデルマウスの作成を予定していたが、使用する乳癌細胞（MB2-31）などの毒性からマウスへの乳癌細胞の生着が十分におこなえず、使用マウスを比較的免疫抵抗の低いマウス（SCID hair-lessマウス）に変更することで、癌細胞の生着が容易に行われ乳癌モデルマウスの作成に成功した。

(2) 凍結療法：マウスを全身麻酔下にて仰臥位とし凍結治療を行う。操作の過程では腫

瘍径にばらつきが生じる場合もあり、凍結融解の一連の操作を3サイクル行うことを標準としているが、腫瘍径によっては完全凍結が得られるのに4サイクル以上操作が必要となる個体も存在した。

また、全身麻酔導入の過程または凍結療法終了後に低体温による死亡症例も少なからず存在した。

(3) 治療効果の指標として、腫瘍径の測定を当初は行っていた。しかし、癌の進行または凍結療法による抗ガン治療効果に伴い、腫瘍内での出血・壊死などを多く経験するようになった。その為、腫瘍の増大=癌の進行と定義することは困難であり腫瘍内部の壊死の状況などに関しては後の死亡段階で摘出した腫瘍を病理学的に評価することとし、腫瘍径の変化に関しては治療効果の指標からは外すこととした。

二群間での生存曲線を下記図2に示す。

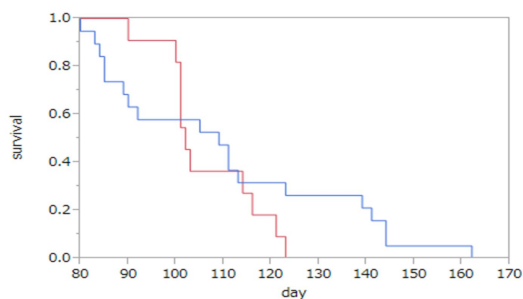


図2 生存期間曲線

赤線：コントロール群 青線：クライオ群

生存期間に関しては上記の如く統計学的な有意差はでなかった。しかし、今回のデータからコントロール群での生存期間は90~110日に集約される一方で、コントロール群においては早期死亡例もある一方で長期生存個体も多く存在した。

長期生存例が多く存在したことは凍結療法の効果を証明することができる。一方で、早期死亡症例に関しては、凍結療法における不完全凍結ががん組織の転移進行を促すという報告がなされていることから、これらの個体に対しては凍結が不十分であったことから癌の進行をかえって促してしまったのではないかと考察する。しかし、今回の実験において不完全凍結を証明することは操作過程においてかなり困難を有することが予測され、不完全凍結の発症予防が今後の研究課題となりうる。

(4) 細胞性免疫(抗腫瘍効果)の指標としてインターロイキン12、IFN-ガンマの測定を行った。また、液性免疫(炎症効果)の指標としてインターロイキン4、6の項目測定を行い、2群間における血清サイトカインの変動に関して検討した。

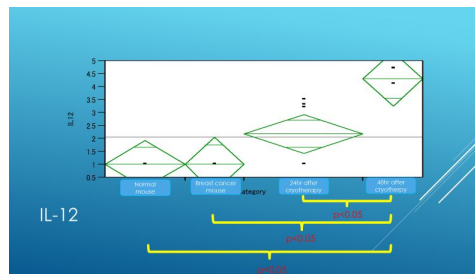


図3 血清 IL-12 経時間的变化

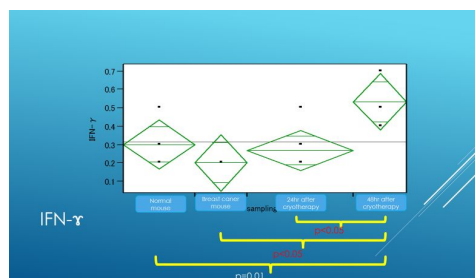


図4 血清 IFN- 経時間的变化

TH1系サイトカインであるIL-12、IFN-はいずれも凍結療法から48時間での測定に際して優位に上昇をもたらした。このことから、凍結療法における抗腫瘍効果の発現は治療後48時間から生じてくることが想定された。

(5) これまで(1)~(4)の実験結果より乳癌に対する凍結療法の治療効果を立証することができた。薬物との併用療法を行うにあたって、(4)の結果をもとに薬物投与のタイミングとしては凍結療法の抗腫瘍効果が発現する治療後48時間のタイミングに薬剤の最大血中濃度を合わせるタイミングでの投与が最も効果的ではないかと予測された。しかし、今回の与えられた研究期間内においては、3-(5)に提示した薬物療法との併用治療に関しての実験まで着手することが困難であった。

(6) 今回与えられた研究期間内において、乳癌実臨床の場にて凍結療法における抗腫瘍効果以外の効果を期待した導入が試験的に行われている。抗がん剤投与時における薬剤性の脱毛に対し頭皮の凍結療法が、脱毛の60~80%を回避することができるであろう報告がなされ、臨床にて試験的に凍結療法の取り組みが行われた。今回の我々の実験結果から、乳癌における凍結療法の効果は血清レベルにおいても免疫細胞の動員がなされることが明らかとなっていることから、頭皮の凍結により同様の免疫細胞の動員が期待され、脱毛予防だけでなく乳癌に対する治療効果の相乗(抗がん剤投与に凍結療法を追加)が期待できるのではないかと予測され今後の研究課題として追加していきたいと考

えている。

東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：30287502

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

FUMI SAITO, Change in serum cytokine levels after cryotherapy in mice implanted with breast cancer cells, 18th world congress of international society of cryosurgery, 2015/11/26, ホテル日航金沢(石川県金沢市)

齊藤 芙美, 乳癌マウスにおける凍結療法における治療効果の検討、第23回日本乳癌学会学術総会、2015年7月2日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

齊藤 芙美, Change in serum cytokine levels after cryotherapy in mice implanted with breast cancer cells, 第26回アジア太平洋内分泌会議、2015年2月13日、米国ハワイ州

齊藤 芙美, 乳癌移植担癌マウスにおける凍結療法による抗腫瘍効果の検討、第76回日本臨床外科学会総会、2014年11月21日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

齊藤 芙美, Change in serum cytokine levels after cryotherapy in mice implanted with breast cancer cells, 第73回日本癌学会、2014年9月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 芙美 (SAITO, Fumi)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号：40439956

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 研究協力者

緒方 秀昭 (OGATA, Hideaki)