

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830093

研究課題名(和文) 解糖系亢進に基づく乳癌新規治療法の探索と事前効果予測に関する研究

研究課題名(英文) Search of novel treatment and effect of prior treatment prediction based on Glycolytic activity in breast cancer.

研究代表者

佐藤 章子 (Sato-Tadano, Akiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50723912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、乳癌における解糖系亢進の意義とそれを標的とした阻害薬の治療効果の検討、PET検査を用いた治療効果予測因子としての有用性の検討である。解糖系亢進は癌組織の特徴の一つであるが、乳癌ではサブタイプ別に糖代謝活性の意義が異なり、増殖能の低いLuminalタイプで悪性度に関与することを解明し、治療効果予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is investigation of significance, treatment effect of Inhibitors and usefulness of PET based on Glycolytic activity in breast cancer. In the cell proliferation of carcinoma, increased glycolytic activity is one of the major features. In this study, the glycolytic activity plays important roles in low Proliferative capacity; Luminal type breast cancer. Results of our present study also demonstrate that glycolytic activity is significantly associated with treatment prediction of breast cancer patients.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：乳癌 解糖系亢進 hexokinase HIF-1 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の特徴の一つに、解糖系の亢進が挙げられる。癌細胞は、ミトコンドリアの活動を抑制して酸素消費を抑えるとともに、解糖系を亢進させる事によって、細胞増殖に不可欠なエネルギーのみならず、アミノ酸、脂肪酸などの生体高分子を産生している(Warburg 効果)。

この事は、癌組織が低酸素状態となる事により発現する Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1-) のカスケードによっても説明可能である。この HIF1- は、60 以上の誘導遺伝子の転写因子として機能する。その下流には、癌細胞の解糖系反応において律速酵素として働く HexokinaseII (HKII) が存在している。申請者らはこの HKII の発現が増殖能、悪性度に関与している事を明らかにした (Akiko Sato-Tadano et al. Cancer Sci 2013)。さらに癌組織において、浸潤の先端部(腫瘍組織の辺縁)において HKII がより強く発現した群では(図 1)、予後が不良である事も明らかにした(図 2)。また肝癌や膵癌の腫瘍モデルを対象とした研究ではあるが、HKII inhibitor である 3-bromopyruvate (3-BrPA) が有用であるとの報告がある。癌細胞において解糖系が亢進している事を利用した検査としては、ポジトロン断層撮影(PET)がある。原理としては、解糖系が亢進して糖代謝が活発な組織ほど 18FDG が取り込まれやすいという事を利用したイメージング技術である。したがって、この原理を考えると HKII が高発現している部分では、PET で高集積となることが予想される。現在乳癌では、術前化学療法がその治療において重要な位置を占めている。また、術前化学療法を施行して、治療効果が高い症例(完全奏功症例)は、その後の予後が良いという報告が多数ある。HKII に関しては、他の癌種において 3-BrPA の有効性が示唆されているが、術前に HKII が高発現していることがわかれば、これを術前化学療法の一環として使用できる可能性がある。実臨床においては、抗癌剤の有用性を判断するに当たって針生検などの組織学的診断を参考にしている。しかしながら HKII の判断に関しては、免疫組織化学的検査は可能であっても、癌組織全体を検索できないために、辺縁型、全体型などの HKII の染色パターンまでは言及できない。本研究計画では、乳癌モデルマウスを作製し、この HKII の評価の代用として PET を用いる事ができるかどうかの検討を行う。更に HKII 発現と PET 集積が相関していることを証明した後に、HKII inhibitor である 3-BrPA をマウスに投与し治療効果につ

いて調査する。

図 1.HKII 辺縁型の免疫組織化学染色

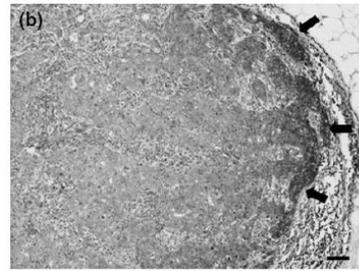
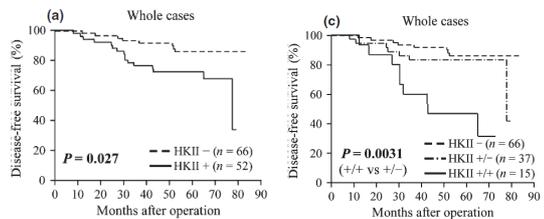


図 2.HKII 発現と生存曲線



HKII 高発現：予後不良 HKII 辺縁型：極めて予後不良

2. 研究の目的

乳癌組織における解糖系亢進の意義の検討とそれを利用した解糖系阻害薬による抗腫瘍効果、画像診断による相関性を解明し新たな治療戦略の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) サブタイプ別の解糖系亢進の発現意義の検討：近年の乳癌診療において、バイオロジー(サブタイプ分類)は早期乳癌治療、再発乳癌治療において非常に重要であり治療法決定の指標となっている。

そこで、まず手術切除標本を用いて免疫組織染色を行い HKII のサブタイプ別発現意義の検討を行った。

(2) HKII 発現と術前化学療法施行症例での治療効果判定の検討：東北大学病院で 2003 年～2014 年に術前化学療法施行した症例 108 例で、NAC 症例の治療効果予測因子としての検討

(3) 他の解糖系因子と PET/CT の検討：癌の糖代謝亢進メカニズムを利用した 18F-FDG-PET/CT (FDG-PET) で検出されない癌では、グルコース以外のエネルギー源が使われている可能性があり解糖系の最終産物である乳酸が癌の増殖に関与している可能性がある。49 例の手術標本を用いて、乳酸トランスポーター MCT1/4 の発現を確認し、SUVmax との相関を検討。

(4) PEM(乳房専用 PET 検査装置)画像と HKII の発現の関係の解明：腫瘍モデルマウスでの検討に先立ち、ヒト乳癌摘出腫瘍を用いて PET 画像との相関性を検討。

(5) モデルマウスでの HKIIinhibitor (3-bromopyruvate)の抗腫瘍効果を検討  
 (6) 原発巣と転移巣を用いた新規糖代謝因子の解明

#### 4. 研究成果

(1) サブタイプ分類は臨床的には免疫組織化学染色: ER, PgR, HER2, Ki-67 の発現レベルにより簡易的に 4 つのグループ LuminalA like、LuminalB like、HER2enrich、TNBC に分類されているが 2013 年の乳癌初期治療方針作成国際会議である St.Gallen コンセンサス会議で若干の定義変更があったため、まず従来の分類との比較検討を行い論文報告した (Breast Cancer. 2016) (図 3)。さらに、サブタイプ別の HKII 陽性率は TNBC で最も高かった。TNBC は乳癌の約 10% を占め、最も再発リスクが高く予後不良といわれる。1998 年~2007 年に当院で手術施行した TNBC 89 例の病理学的解析、予後解析を行ったところ HKII は予後予測因子とはならず、サブタイプ別に発現意義が異なることを解明し学会報告した。(第 52 回癌治療学会 2014) (表 1,2)。これより解糖系亢進は増殖能の低い Luminal type では悪性度に関与するが、TNBC では悪性度に関与しない可能性が示唆された。

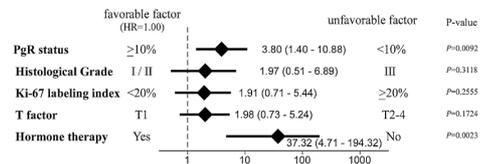
表 1. TNBC の DFS

変数 n = 89	単変量解析	多変量解析	相対危険度 (95% CI)
	P 値	P 値	
Basal(basal/non-basal)	<b>0.0058</b>	<b>0.025</b>	2.86(1.13-8.8)
Ki-67 LI* (≥40/<40)	<b>0.0091</b>	<b>0.0041</b>	1.41(1.43-6.75)
pN (陽性/陰性)	<b>0.010</b>	0.10	
MVD *(73-2)	<b>0.017</b>	<b>0.035</b>	1.03(1.00-1.06)
Ly (+/-)	<b>0.023</b>	0.078	
組織学的グレード(3/1,2)	0.29		
pT (pT2-4/ pT1)	0.51		
HKII (陽性/陰性)	0.87		
VEGF (陽性/陰性)	0.79		
MDR-1 (陽性/陰性)	0.93		
閉経状況(閉経前/閉経後)	0.60		
HIF-1α (陽性/陰性)	0.82		
年齢* (27-87歳)	0.94		

表 2. Luminal type の DFS

変数 n = 93	単変量解析	多変量解析	相対危険度 (95% CI)
	P 値	P 値	
Ki-67 LI* (60%-1%)	<b>0.0003</b>	<b>0.032</b>	1.06(1.00-1.12)
組織学的グレード(3/1,2)	<b>0.0085</b>	0.46	
pT (pT2-4/ pT1)	<b>0.0040</b>	0.10	
MVD *(3-106)	<b>0.023</b>	0.050	
pN (陽性/陰性)	<b>0.027</b>	0.52	
HKII (陽性/陰性)	<b>0.040</b>	<b>0.040</b>	3.08(1.05-10.2)
年齢* (27-87歳)	0.20		
MDR-1 (陽性/陰性)	0.23		
VEGF (陽性/陰性)	0.60		
HER2 (陰性/陽性)	0.60		
HIF-1α (陽性/陰性)	0.67		
閉経状況(閉経前/閉経後)	0.87		

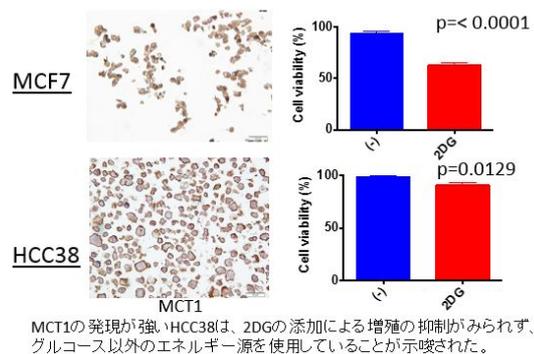
図 3. Luminal B の細分類



(2) NAC 前後での HKII の染色性 (discordance) と治療効果について検討した。腫瘍の増殖能を示す Ki-67 と HKII は加療前の針生検 (CNB) 標本では相関していた ( $P=0.0187$ ) が手術標本では相関性がなかった ( $P=0.8438$ )。HKII (CNB) と化学療法治療効果は治療効果が高いものは HKII の発現率が低い傾向にあったが有意な相関はなかった。今後症例数を増やしサブタイプ別に検討する予定である。

(3) MCT1 の発現が強く見られる群で、SUVmax が低い傾向があり、MCT1 の発現が強い HCC38 は、解糖系阻害剤 2DG (2-Deoxy-D-glucose) の添加による増殖の抑制がみられず、解糖系の代謝産物である乳酸を利用した代謝が癌治療の標的となる可能性が示唆された。(図 4) (第 116 回日本外科学会学術集会 2016)

図 4 乳癌細胞株における糖代謝依存

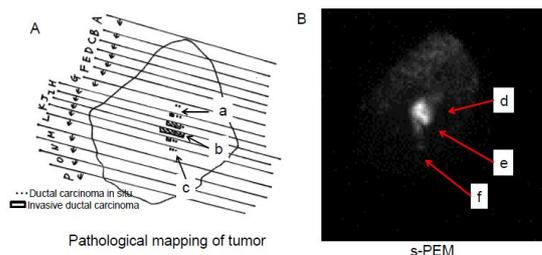


MCT1 の発現が強い HCC38 は、2DG の添加による増殖の抑制がみられず、グルコース以外のエネルギー源を使用していることが示唆された。

(4) 2014 年 2 月~7 月まで乳房温存手術(全周性断端迅速診断あり)を施行した 11 例を対象とし正確な癌進展評価が可能かどうか検討 (図 5)。PET/CT を術当日に行い、その後切除標本を高分解能 Positron Emission Mammography (東北大学と古川機械金属で共同開発、以下 PEM) で撮影。初回切除病理標本で断端陽性であったものは 3 例 (3/11) であり、そのうち断端迅速診断では 1 例 (1/3) のみ陽性となり術中追加切除を行った。PEM では 2 例 (2/3) で断端陽性と判断できた。偽陽性は、断端迅速診断、PEM とも 1 例のみであった。病理標本 11 例で浸潤癌巣は 8 箇所、非浸潤がん巣 (3 腺管以下は除外) は 15 箇所であったが、PEM では浸潤癌巣 8/8、非浸潤癌巣 14/15 検出可能であった。

以上より、切除検体を PEM で撮影し、しばしば問題となる微小病変である非浸潤癌病変も十分検出可能なことを示した(第 115 回日外科学会学術集会)。今後 HKII の染色性と PET 画像を比較することによって術前 PET を行うことによって化学療法の治療効果が予測できるかを検討する予定である。

図 5.乳癌切除病理標本と s-PEM の広がり診断



微小病変である非浸潤癌病変も十分検出可能

(5):東北大学サイクロトンセンターと協力し担癌マウスの PET/CT 検査施行。腫瘍の描出が可能であった(図6)。今後モデルマウスでの PET/CT 画像と HKII 発現と、HKII inhibitor の治療効果を検討する予定である。

図 6.担癌マウスの PET/CT

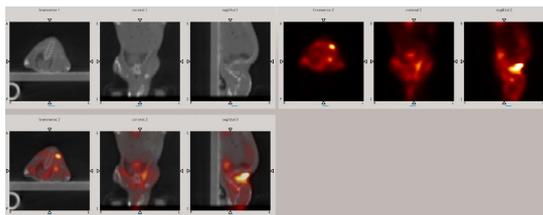


図 7.HKII 発現と PET の関連の検討

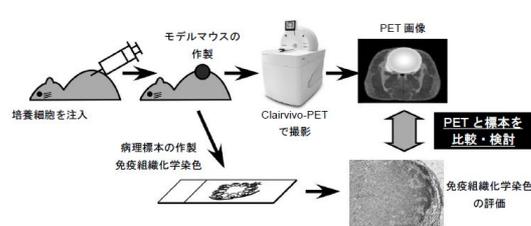
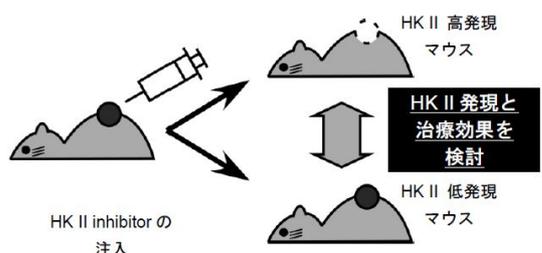


図 8.HKIIinhibitor の治療効果の検討



(6) 乳癌脳転移で HKII の発現が予後因子となる報告が既報であったため、9 症例の FFPE 標本(再発巣原発、転移巣(脳転移)、無再発原発巣)を用いて RNA シーケンスを行うために RNA 抽出を行ったが品質チェック(QC)にて断片化した RNA(200nt)のみしか得られず、ライブラリ調整まで進行できなかった。今後凍結標本を蓄積して再度検討する予定である。

## 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)

1. Sato K, Miyashita M, Ishida T, Suzuki A, Tada H, Watanabe G, Sato-Tadano A, Watanabe M, Ohuchi N. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and -low Luminal B-like HER2-negative breast cancers. Breast Cancer. 2016 Mar; 23(2):310-7 査読有 doi: 10.1007/s12282-014-0575-6.USL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380989>

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 佐藤章子、石田孝宣、鈴木昭彦、多田寛、渡部剛、原田成美、宮下穰、中川紗紀、大内憲明：乳癌脳転移のサブタイプ別予後と臨床病理学的特徴、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 16 日大阪国際会議場(大阪)
2. 原田成美、渡部剛、平川久、伊藤正敏、多田寛、鈴木昭彦、宮下穰、佐藤章子、佐藤千穂、石田孝宣、大内憲明：乳癌原発巣の診断における  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT の予後予測因子としての可能性、第 116 回日本外科学会学術集会、2016 年 4 月 14 日大阪国際会議場(大阪)
3. 佐藤章子、石田孝宣、鈴木昭彦、多田寛、渡部剛、原田成美、宮下穰、佐藤千穂、高木まゆ、大内憲明：乳癌脳転移のサブタイプ別予後と治療戦略、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日名古屋国際会議場(名古屋)
4. Akiko Sato-Tadano, Takashi Suzuki, Takanori Ishida, Masakazu Amari, Kiyoshi Takagi, Yasuhiro Miki, Kentaro Tamaki, Mika Watanabe, Hironobu Sasano and Noriaki Ohuchi :Hexokinase II: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  possibly

through increased glycolytic activity in breast carcinoma. NIH-Japan-JSPS Symposium, October 23-24, 2014 Bethesda Campus, Maryland USA

5. 佐藤章子、石田孝宣、宮下穰、鈴木昭彦、多田寛、渡部剛、根本紀子、藤井里圭、大内憲明：トリプルネガティブ乳癌における HIF-1 誘導遺伝子としての HexokinaseII の発現意義、第 52 回癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 29 日パシフィコ横浜（横浜）
6. 佐藤章子、鈴木貴、甘利正和、高木清司、三木康弘、玉城研太郎、渡辺みか、石田孝宣、笹野公伸、大内憲明：浸潤性乳管癌における HIF-1 $\alpha$  誘導遺伝子としての HexokinaseII の発現意義、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 5 日国立京都国際会館（京都）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 章子 (Akiko, Sato-Tadano)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 50723912