

免疫内分泌系バイオマーカーに基づく  
乳癌の個別化治療に関する基盤研究

The fundamental study for personalized medicine  
in breast cancer patients  
based on immunoendocrinological biomarkers

清海 杏奈

東京薬科大学博士論文

(2015 年度)

# 目次

	頁
諸言	1
第一章 乳癌患者から摘出した乳癌組織の三次元培養系から産生される Th1/Th2/Th17 サイトカインの特徴とその臨床的意義	
第一節 目的	4
第二節 方法	4
第三節 結果	9
第四節 考察	21
第二章 閉経後乳癌治療に併発する骨関節症状に対する vitamin E の効果と その個別化投与に関する検討	
第一節 目的	25
第二節 方法	25
第三節 結果	29
第四節 考察	42
総合考察	45
謝辞	47
引用文献	48

## 略語一覽

AI	aromatase inhibitor
CBA	cytometric bead array
ConA	concanavalin A
COX	cyclooxygenase
CRP	C-reactive protein
DNR	daunorubicin
DOC	docetaxel
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
E2	estradiol
FBS	fetal bovine serum
Foxp3	forkhead box p3
5-FU	5-fluorouracil
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HER2	human epidermal growth factor receptor type2
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IL	interleukin
LH-RH	luteinizing hormone-releasing hormone
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NKT	natural killer T
PBMC(s)	peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	phosphate buffered saline
Pg	progesterone
PgR	progesterone receptor
ROC	receiver operating characteristic
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGP	thermo reversible gelation polymer
Th	helper T
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
Treg	regulatory T cell
VE	vitamin E
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 緒 言

乳癌は、乳房組織に発生する癌腫である。本邦女性における乳癌の部位別がん罹患率は、全年齢を通し人口 10 万人に対し 110.5 と第一位である。また 2013 年における女性の乳癌による死亡数は 13 万人を上回り、全年齢における部位別がん死亡率は人口 10 万人に対して 20.4 と、比較的高値を示している[1]。乳癌の罹患年齢は 40 歳代で最も割合が高く、年齢が上がるにつれて低下していく。一方生涯にわたり乳癌に罹患する確率は 12 人に 1 人と非常に高率であり、これも全がんで第一位である。以上、罹患年齢が低いこと、生存率が高いこと、および罹患者が多いことから分かるように、乳癌治療に関わる患者の時間的、経済的、精神的、身体的な負荷は非常に大きいと考えられる。さらに、2015 年部位別予測がん罹患数は、乳房は女性ではおよそ 9 万人と第一位である。乳癌罹患患者数は乳癌で死亡する人数の 3 倍以上である。このように、将来的にも乳癌患者は全がん患者のうちの多数を占めるため、薬物療法を主軸とする治療コンプライアンスやアドヒアランスの向上と維持が重要となる。

乳房は主に、乳腺、乳管、および脂肪からなる。乳腺は解剖学的には小葉に分かれ、さらに腺房に分かれている。乳癌は乳管から発生する乳管癌と、小葉から発生する小葉癌に分類され、多くは前者の発生をとる。また、病理学的分類として、癌細胞が乳管や小葉の中にとどまる非浸潤がんと、乳管や小葉の周囲にまで広がった浸潤がんに分けられる。乳癌と診断される場合、80%以上が浸潤がんである。非浸潤がんはステージ 0 に分類され、適切な治療を行えば再発や転移をすることはほぼない。一方、浸潤がんはその範囲や大きさ、転移の度合いでステージ I から IV まで細分化される。I から IIIA までは、温存手術や放射線療法、乳房切除術、術前および術後薬物療法を組み合わせ、治癒を目指し治療を行う。局所進行乳癌（ステージ IIIB, IIIC）では、乳房表面の皮膚や胸壁に癌が及んでいるなど、他の部位に微小転移を伴う可能性が高く外科的切除が難しい場合が少なくないため、薬物療法を主軸に治療を行う。また、遠隔転移を伴う乳癌（ステージ IV）では、転移乳癌として全身療法を行う。このように、乳癌治療における薬物療法は全ステージの患者に対して必要不可欠であり、使用する薬物の選択が大変重要である。

乳癌の薬物療法は、ホルモン療法、抗 HER2 療法、および化学療法の 3 つに大分され、患者の閉経の有無、エストロゲン (E2) やプロゲステロン (Pg) などのホルモンの受容体の有無、あるいは HER2 受容体や HER2 遺伝子増幅の有無により、その治療法が決定される。中でもホルモン療法は、5 年以上の継続服用が推奨されている[2]。抗エストロゲン薬、黄体ホルモン薬、LH-RH アゴニスト製剤、アロマターゼ阻害剤 (AI) などのホルモン製剤は、いずれも体内 E2 の低下によるホットフラッシュや不眠・うつ症状、骨関節痛などの様々な副作用を伴う。閉経後ホルモン感受性乳癌患者では、アナストロゾール、エキセメスタン、レトゾールに代表される AI が使用される。AI の使用はホルモン療法に代表されるように、

副作用として薬剤起因性骨関節症状を高頻度で引き起こし、さらには臨床経験的にも、AI 投与が筋骨格系副作用と関連することが示唆されている[3]。AI による骨関節症状はしばしば日常生活の行動を制限し、必然的に乳癌患者の QOL を低下させる。その結果、AI を用いた治療を中断せざるを得ないことも少なくない。このような AI による骨関節症状には、理学療法や鎮痛剤のような対症療法が取られるが、長期にわたるホルモン療法を支持する最適治療法はまだ確立されていない。さらに、AI 治療に関連して生じる骨関節症状の根本的なメカニズムは明らかとなっていないのが現状である。

近年、腫瘍免疫の観点から癌治療へのアプローチを試みる研究が進んでいる。いくつかの宿主免疫細胞ががん細胞を排除する働きを有する[4]一方で、がん細胞が腫瘍免疫から逃れるためにサイトカインを分泌することが報告されている[5]。がん細胞により構築されたサイトカインネットワークが、エフェクター細胞応答を妨げることで宿主免疫を抑制し、がんの増殖や発生に寄与しているという報告がある[6,7]。また、Th2 サイトカインががん組織中で増加しており、これらのサイトカインが腫瘍免疫を抑制している可能性が示唆されている[8]。さらに、IL-6、IL-8、あるいは IL-10 等のいくつかのサイトカインががん組織の生存や増殖をアップレギュレートしていることを示す報告がある[9-11]。また、乳癌組織中でのいくつかのサイトカイン量の増加は、臨床病期や癌の進行と関連があることも示唆されている[12]。以上のことから、サイトカインは、がんの病態や予後に重要な役割を担っているものと考えられる。

これまでに、乳腺細胞や乳腺組織を三次元的に培養する際に、数種のゲルが複数の研究者によって用いられてきた[13-17]。最近では、合成化合物としてのハイドロゲルが多用されている。中でもコラーゲンゲルはその代表であるが、コラーゲン溶液は酸性であり、これをアルカリ性試薬で中性にする必要がある。このように、従来用いられてきたこれらの培養システムでは細胞障害性試薬を用いる必要があり、ゲル作成も煩雑である。Thermoreversible gelatin polymer (TGP) [18]を用いた三次元培養システムは、細胞に傷害を与えずに細胞や組織の培養ができ、培養上清の回収も単純かつ簡便に行うことが可能である。TGP は、遮断ポリマー、親水性ポリマー、および温度可逆性ゼラチンポリマーから構成される熱可逆性ハイドロゲルであり、22°C を転移温度とし、高温ではゲルに、低温ではゾルに変化するという特徴を持つ。このゲルシステムでは、細胞毒性が極めて低く、長期間の培養が可能である。さらに、TGP ゲルではがん細胞増殖は容易な一方で線維芽細胞が育ちにくいという特徴がある。従来の平面培養である二次元培養系では、培養容器への接着により細胞増殖スイッチが入り、生体内での性質を反映していない点が指摘される。このため、スフェロイド（細胞塊）を形成して、より *in vivo* の状態に近い *in vitro* 研究を行うことができる三次元培養系に関心が高まってきている。

近年、病気の原因や病態を遺伝子やタンパク質など、分子レベルで解析し、より個々の患者に合った治療法を確立する個別化医療が進歩してきている。がん治療においても、1990年代からは分子標的薬が着目され、上皮成長因子受容体（EGFR）や血管内皮増殖因子（VEGF）などを標的とした薬物が次々に開発・承認されてきている。また、乳癌ではがん

遺伝子である HER2/neu の過剰発現や、それに伴う HER2 タンパク質の過剰産生が報告され、HER2 と悪性度や予後との関連があることが分かっている。受容体型チロシンキナーゼである HER2 受容体は、細胞表面に存在する糖タンパク質であり、過剰発現すると本来の細胞増殖調節機能の制御が効かなくなり、がんが進行する。乳癌では約 10~15%の患者で癌組織の HER2 が陽性である。抗 HER2 抗体医薬品であるトラスツズマブの開発を機に HER2 陽性患者への選択的治療が可能になり、それに基づく個別化治療が大きく発展した。しかし一方で、乳癌治療における分子標的薬の開発は依然道半ばであり、HER2 陰性患者への個別化医療にはまだ発展の余地がある。

尚、「がん」と「癌」の一般的な定義分けとして、「がん」は悪性腫瘍の総称を指し、「癌」は上皮性の「がん」を指すこととされている。このため、本論文ではこの定義に則って表記した。

以上のような背景を踏まえ、第一章では、乳癌患者から針生検もしくは治療目的で外科手術により摘出した乳癌組織を、TGP ゲルを用いて三次元培養し、培養乳癌組織から産生される Th1/Th2/Th17 系サイトカインの特徴や培養上清がヒト免疫系に及ぼす影響について検討した。これらの検討結果から、腫瘍免疫に影響を及ぼす乳癌組織由来因子の解明と、これらの因子をバイオマーカーとした乳癌の個別化医療の推進の可能性について展望した。さらに第二章では、閉経後乳癌治療に併発する骨関節症状に対する vitamin E (VE) の効果と、乳癌治療の副作用軽減を目的とした VE 投与の有用性およびその個別化投与推進のためのバイオマーカーを検索することを目的として検討を行った。

これらの検討結果から、乳癌治療における薬物の主作用と副作用の発現に各々係る新たな免疫内分泌系関連バイオマーカーを確立し、それに基づく乳癌治療の個別化を推進するための基盤を構築することを目的とし、本研究を行った。

## 第一章 乳癌患者から摘出した乳癌組織の三次元培養系から産生される Th1/Th2/Th17 サイトカインの特徴とその臨床的意義

### 第一節 目的

乳癌患者への個別化薬物治療の試みは癌の組織学的所見やステージ分類により行われてきた。ホルモン受容体や **HER2** は乳癌の個別化薬物治療の標的として有効である。しかし一方で、これら標的が全て陰性の患者においては、細胞傷害性化学療法の有効性が患者予後に大きく影響する。

これまでに、乳腺細胞や乳腺組織の三次元培養にいくつかの種類ゲルが用いられてきた [13-17]。しかしながら、これらの培養システムでは細胞や組織の培養のために、細胞に傷害を与える酵素を使用する必要がある。

本章では、細胞毒性の極めて低い熱可逆性ハイドロゲルである **TGP** ゲルを用いて、患者から外科的切除した乳癌組織または針生検により得られた乳癌組織、および正常乳腺組織を三次元培養し、その増殖能および組織から分泌された **Th1/Th2/Th17** 系サイトカインについて検討した。また、これらのサイトカインとホルモン受容体や癌病期を含む患者臨床背景との関連を検討した。

### 第二節 方法

#### 2-1 患者背景

本研究は、「乳癌組織から分泌されるサイトカインの研究」として 2012 年 6 月がん研有明病院倫理委員会の承認を得て実施され、全患者からインフォームドコンセントを得た。がん研有明病院乳腺外科にて乳癌と診断された全 21 名の女性患者（平均年齢 53.9 歳）を対象とした (Table 1)。21 名中 6 名がアジュバント化学療法として、パクリタキセル、ドセタキセル、ハーセプチン、シクロホスファミド/エピルビシン/5-FU、ドセタキセル/アドリアマイシン/シクロホスファミド、あるいはシクロホスファミド/アドリアマイシン/5-FU による治療を受けていた。乳癌組織の **ER**、**PgR**、および **HER2** 発現は、同院にて免疫組織化学的解析により同定された。治療を目的とし各患者から外科的に切除された乳癌組織または針生検により得られた乳癌組織を、後述するように **TGP** ゲルを用いて三次元的に培養した。9 名の患者から、乳癌摘除の際得られた正常乳腺組織も同様に培養し、このうち 8 検体を各種サイトカイン測定に用いた。

Table 1. Patient characteristics

Case number	Age	Chemo-therapy	Meno-pause	ER	PR	HER2	FISH	NG	Tissue-type	Stage
Case1	57	-	Post	-	-	3+	unknown	1	a3	unknown
Case2	42	-	Pre	-	-	0	unknown	unknown	a3	IIIC
Case3	41	+	Pre	-	-	1+	unknown	3	a2	IIA
Case4	61	-	Post	+	-	2+	-	2	a2	IIIC
Case5	43	-	Pre	+	+	0	unknown	unknown	a3	IIIC
Case6	48	-	Pre	+	+	0	unknown	2	a3	IIIA
Case7	74	+	Post	-	-	0	unknown	3	a2	IIA
Case8	46	+	Pre	+	+	0	unknown	1	a3	IIA
Case9	34	-	Pre	-	-	0	unknown	unknown	a3	IV
Case10	51	+	Pre	+	-	1+	unknown	1	a3	IIA
Case11	64	+	Post	+	+	0	unknown	3	a3	IIA
Case12	43	+	Pre	-	-	1+	unknown	3	a2	IIA
Case13	62	+	Post	+	-	1+	unknown	1	a3	IIA
Case14	67	+	Post	+	+	2+	-	3	a2	IIA
Case15	47	+	Pre	+	+	2+	+	2	a3	IIA
Case16	62	+	Post	+	+	0	unknown	2	a3	IIA
Case17	45	+	Pre	+	+	0	unknown	2	a1	IIA
Case18	48	+	Pre	+	+	1+	unknown	2	a3	IIA
Case19	59	+	Post	-	-	1+	unknown	3	a3	IIA
Case20	57	+	Post	+	+	0	unknown	2	a3	IIA
Case21	81	+	Post	-	-	2+	-	2	a3	IV

21 breast cancer patients were included. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), and HER2 in cancer tissue were detected by immunohistochemical (IHC) analysis. In the case for HER2 2+, FISH was performed. Nuclear grade (NG) and tissue-type were performed by pathologic examination.



## 2-2 摘出組織の三次元培養

### 2-2-1 実験に使用した試薬、器具および機器

RPMI-1640 培地はシグマ社、10%ウシ胎児血清 (FBS) はニチレイバイオ社、ペニシリン G およびストレプトマイシンは GIBCO 社、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) はシグマ・アルドリッチ社から各々入手した。また、48 ウェル DSeA-3D プレートは IFTL 社から入手した。PBS は GIBCO 社のものを用いた。

### 2-2-2 培地および試薬の調製

RPMI-1640 培地または HBSS に、56°C で 30 分間非働化した仔ウシ胎児血清を 16% (v/v) となるように添加し、さらにペニシリンおよびストレプトマイシンを、各々 100 U/mL および 100 µg 力価/mL となるように溶解させ、培養に用いた。凍結乾燥された TGP が充填された DSeA-3D プレート (IFTL 社) の各ウェルに、前述の RPMI-1640 培地を 150 µL ずつ添加し、溶解後気泡除去を目的として 1500 rpm にて 20 分間冷却遠心後、組織播種まで 4°C にて保存した。

### 2-2-3 摘出組織の三次元培養

乳癌組織または正常乳腺組織は、外科手術または針生検により 21 名の患者から得られたものを用いた。全患者において、診断時の腫瘍の大きさ (直径) は 3 cm 以上であった。組織運搬液である HBSS にペニシリン、ストレプトマイシン、およびアムホテリシン B を添加したものをを用いて運搬し、細菌感染を防止するため、3 回以上洗浄した。洗浄後、組織から血液や脂肪を除去し、径 0.5 mm<sup>3</sup> 以下まで細切した。1 ウェル当り 2 個または 3 個の細切組織を TGP ゲルの充填された DSeA-3D プレートに播種し、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 30 分間インキュベーションした。16%FBS を含む RPMI1640 培地を各ウェルに 325 µL ずつ重層し、37°C まで昇温した。さらに 25 µL の PBS を各ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C にて 6 日間培養を行った。培養後、各ウェルから 250 µL ずつ上清を回収し、-80°C にて保存した。同様の手順にて組織を含まない blank well を作成し、6 日間のインキュベーションの後、上清回収を行った。以上の実験は全て無菌的に行った。

## 2-3 三次元培養組織の WST-8 試験

上述のように、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C にて 6 日間培養を行った DSeA-3D プレートの各ウェルに、Cell Counting Kit-8 試薬 (GIBCO 社) を 25 µL ずつ添加し、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C にて 2 時間インキュベーションし、マクロプレートリーダー SAFIRE (TECAN 社) にて 450 nm で吸光度を測定した。各サンプルウェルの吸光度から blank well の吸光度を減法し算出した。

## 2-4 Th1/Th2/Th17 サイトカイン測定

### 2-4-1 実験に使用した試薬, 器具および機器

ベクトン・ディッキンソン社の BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit を用いて, 三次元培養組織上清中の 7 種の Th1/Th2/Th17 系サイトカイン (後述) を解析した. 測定にはベクトン・ディッキンソン社の FACS Calibur を, また算出ソフトは同社の CBA Software を用いた. フローサイトメーター用ポリスチレンチューブはベクトン・ディッキンソン社のものを用いた.

### 2-4-2 フローサイトメーターによる Th1/Th2/Th17 サイトカイン測定法

乳癌組織および正常乳腺組織の三次元培養上清は Wash Buffer (ベクトン・ディッキンソン社) にて 4 倍希釈し, 測定用試料とした. Wash Buffer は 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルター (ADVANTEC 社) でろ過したものを使用した. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度を, マニュアルに則って測定した. CBA 法は, 各種サイトカインに特異的な抗体を保持する異なった蛍光強度のビーズを混合し, その混合ビーズがフローサイトメーターによって試料中の各種サイトカインを同時に検出・定量できるという原理に基づく. CBA Software (ベクトン・ディッキンソン社) を用い, 標準物質から得られた検量線に基づいて検体中のサイトカイン濃度を算出した. 本法を用いた 7 種の Th1/Th2/Th17 系サイトカインの検出限界は各々 IL-2 が 2.6, IL-4 が 4.9, IL-6 が 2.4, IL-10 が 4.5, TNF- $\alpha$  が 3.8, IFN- $\gamma$  が 3.7, および IL-17A が 18.9 pg/mL であり, 検出限界以下は 0 pg/mL とした.

## 2-5 統計解析

乳癌組織と正常組織間の WST-8 値および三次元培養上清中のサイトカイン濃度の差は, ウィルコクソン符号順位検定にて解析した. 正常組織と乳癌組織間の IL-6 および IL-10 産生の頻度検定についてはカイ二乗検定を用いた. 化学療法を行った患者群と行っていない患者群間のサイトカイン濃度の比較には, Mann-Whitney の U 検定を用いた. 乳癌組織と正常乳腺組織の WST-8 値と上清中サイトカイン濃度との関連は, スピアマンもしくはピアソンの相関係数により検定した. 摘出癌組織の ER が陽性 (ER+) の患者と ER 陰性 (ER-) の患者間で WST-8 値および各種サイトカイン濃度を比較する場合は, Mann-Whitney の U 検定で解析した. ER+患者群と ER-患者群間で, 摘出組織培養上清中に産生された各種サイトカイン濃度あるいは WST-8 測定値が, 各々一定以上高い値を示す患者の頻度の差は, カイ二乗検定により解析した. PgR 陽性 (PgR+) と PgR 陰性 (PgR-) 患者由来組織間で WST-8 値または各種のサイトカイン濃度の平均値を比較する場合は, 対応の無い t 検定 (ウェルチの t 検定) により解析を行った. PgR+と PgR-患者間で, 摘出組織の培養液中に産生された各種サイトカイン濃度あるいは WST-8 測定値が, 各々一定以上高い値を示す患者の頻度の差は, カイ二乗検定により解析した. 病期が IIA の患者群と IIB 以上の患者群間での培養上清中各種サイトカイン濃度の差は, Mann-Whitney の U 検定で解析した. IIA の患者群と IIB

以上の患者群間で、摘出組織の培養液中に産生された各種サイトカイン濃度あるいは WST-8 測定値が、各々一定以上高い値を示す患者の頻度の差は、カイ二乗検定により解析した。いずれも危険率 5%未満 ( $p<0.05$ ) を有意差ありと判定した。統計解析には、解析ソフトの GraphPad PRISM 4.0 (GraphPrism software Inc.) を用いた。

### 第三節 結果

TGP ゲルを用いて三次元培養した乳癌組織 (n=21) および正常組織 (n=9) の増殖能を、WST 法により測定した。乳癌組織では正常組織より高い増殖能を示す傾向があったが、有意な差はなかった ( $p=0.3125$ ) (Fig. 1A)。化学療法を行った患者から摘出した乳癌組織 (n=6) の増殖能は、化学療法を行っていない患者由来の乳癌組織 (n=15) より高い傾向があったが、同様に有意な差ではなかった ( $p=0.1291$ ) (Fig. 1B)。

三次元培養した乳癌組織 (n=21) および正常組織 (n=8) の培養上清中に分泌された IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度を測定した。IL-6 および IL-10 は、いずれの組織の培養上清からも多量に検出された (Fig. 2)。一方で、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, および IL-17A は乳癌組織培養上清にのみ検出された (Fig. 2)。IL-4 はいずれの培養上清からも検出されなかった (Fig. 2)。乳癌組織および正常乳腺組織培養上清間で、IL-6 と IL-10 濃度に有意な差はなかった。三次元培養上清中に IFN- $\gamma$  が分泌された組織の頻度は、癌組織の方が正常組織に比べ有意に高かった ( $p=0.0052$ ) (Table 2)。これより、IFN- $\gamma$  は癌組織に特異的であることが示唆された。

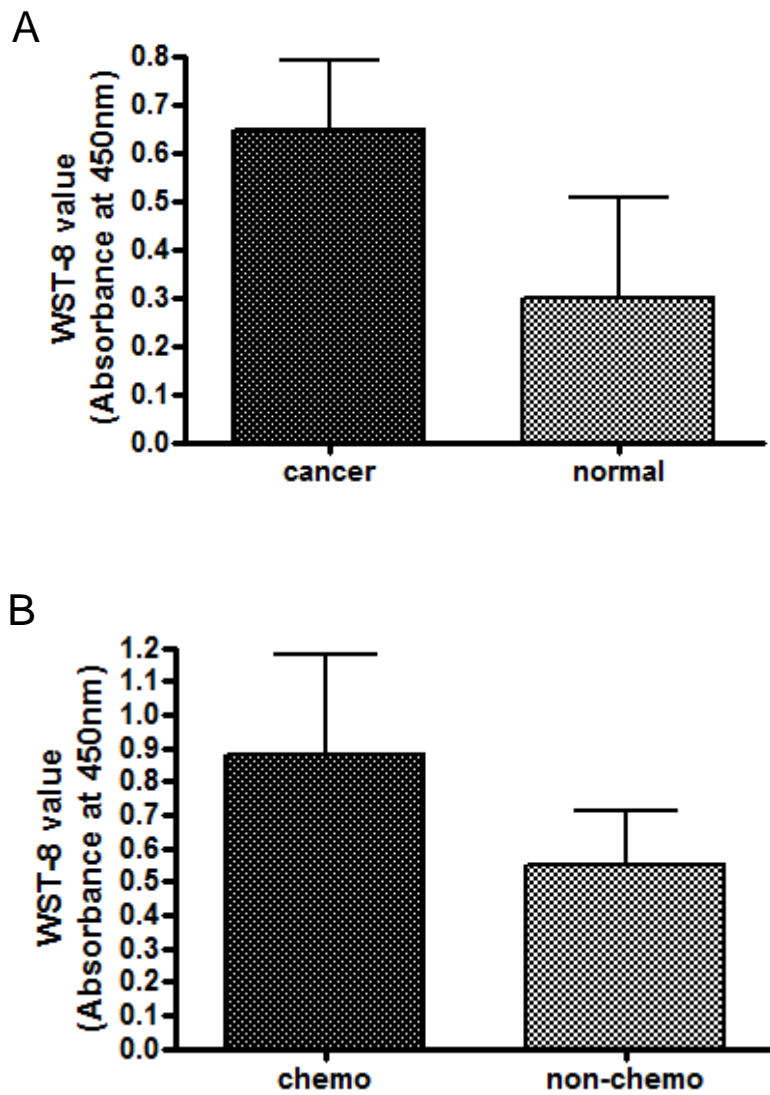
化学療法を受けた乳癌患者から得た癌組織 (n=6) の三次元培養上清中の IFN- $\gamma$  と IL-10 の濃度は、化学療法を受けていない患者から得た癌組織 (n=15) のそれらより高い傾向にあったが、有意な差はなかった (Fig. 3)。また組織培養上清中の IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度は、これら患者群間で有意な差はなかった (Fig. 3)。

WST-8 法にて測定した乳癌組織の増殖能と、組織培養上清中の IFN- $\gamma$  (Fig. 4A;  $p=0.0031$ , Pearson の相関係数検定による), IL-6 (Fig. 4D; Pearson の相関係数検定で  $p=0.0274$ , Spearman の相関係数検定で  $p=0.0009$ ), あるいは IL-10 (Fig. 4E; Pearson の相関係数検定で  $p=0.0158$ , Spearman の相関係数検定で  $p=0.0003$ ) の濃度との間に、各々有意な正の相関がみられた。一方 TNF- $\alpha$  (B), IL-2 (C), および IL-17A (F) 濃度との間には、有意な相関がなかった (Fig. 4)。正常乳腺組織の増殖能と組織培養上清中の IL-10 濃度との間に有意な正の相関があった ( $p=0.0458$ ) (Fig. 5B) が、IL-6 濃度との間には有意な相関はなかった (Fig. 5A)。

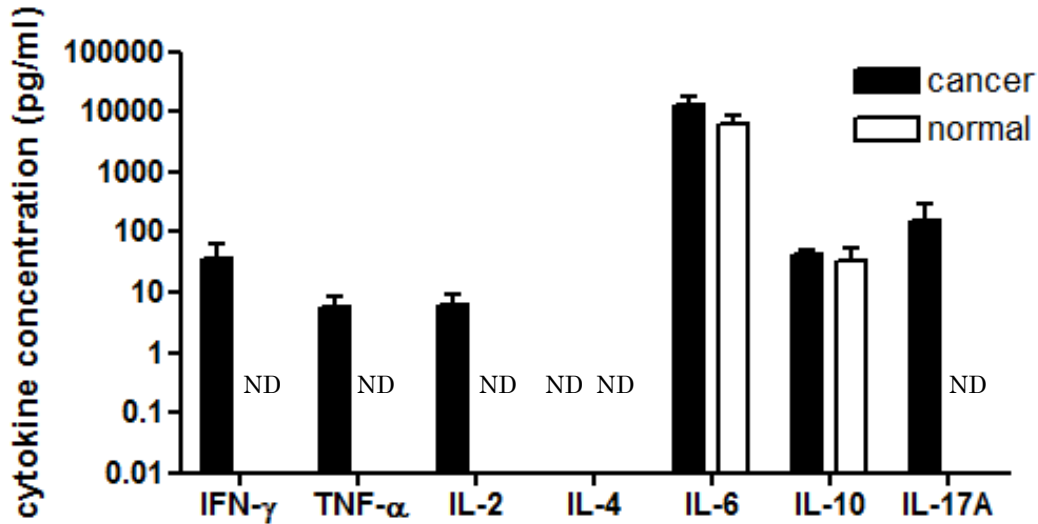
WST-8 法で測定した乳癌組織の増殖能と癌組織三次元培養上清中の各種サイトカイン濃度を、ER+群と ER-群, PgR+群と PgR-群, および HER2+群と HER2-群間で、各々比較検討した。いずれの群間にも、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度に有意差はなかった (n=21) (データ非表示)。一方、PgR+群に比べ PgR-群では乳癌組織の WST-8 測定値は有意に高値を示し ( $p=0.0383$ ) (Fig. 6B) 増殖能が高かったが、ER+群と ER-群間では増殖能に有意な差はなかった ( $p=0.1282$ ) (Fig. 6A)。次に、21 名の乳癌組織をその WST-8 値の中央値 (OD 値 0.3026) で高増殖群と低増殖群の 2 群に分け、両群間でホルモン受容体の発現頻度を比較した。カイ二乗検定の結果、三次元培養組織が高増殖能を示す頻度は、ER-組織の方が ER+組織と比べて有意に高かった ( $p=0.0306$ )。一方、PgR+群と PgR-群間では、三次元培養組織が高増殖能を示す頻度に有意な差はなかった

( $p=0.0502$ ) (Table 3).

全患者を IIA 期 ( $n=14$ ) と IIB 期以上 ( $n=6$ ) に群分けし, WST-8 値と三次元培養上清中の IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A 濃度を群間比較した. WST-8 値およびこれらのサイトカイン濃度に, 両群間の有意差はなかった (データ非表示). さらに病期で分けた 2 群の患者間で, 摘出組織の三次元培養上清における各種サイトカインの検出頻度を比較した. 21 名の乳癌組織のうち 8 検体で, 培養上清中に TNF- $\alpha$  が検出された. IIB 以上の病期の患者から得た乳癌組織では, IIA の患者から得られた乳癌組織より, TNF- $\alpha$  産生頻度が有意に高かった ( $p=0.0096$ ) (Table 4).



**Fig. 1. Growth abilities of three-dimensionally cultured breast cancer tissues.** The growth abilities of the tissues three-dimensionally cultured in TGP gel were as assessed by WST-8 assay (absorbance at 450 nm; see Materials and Methods) after the culture. A: Comparison of the growth abilities between breast cancer tissues (n=21) and normal breast tissues (n=9). No significant difference was observed, as analyzed by Wilcoxon signed rank test ( $p=0.3125$ ). B: Comparison between cancer tissues from patients treated by chemotherapy (n=6) and those from patients who were not treated by chemotherapy (n=15). No significant difference was observed, as analyzed by Mann Whitney test ( $p=0.1291$ ).



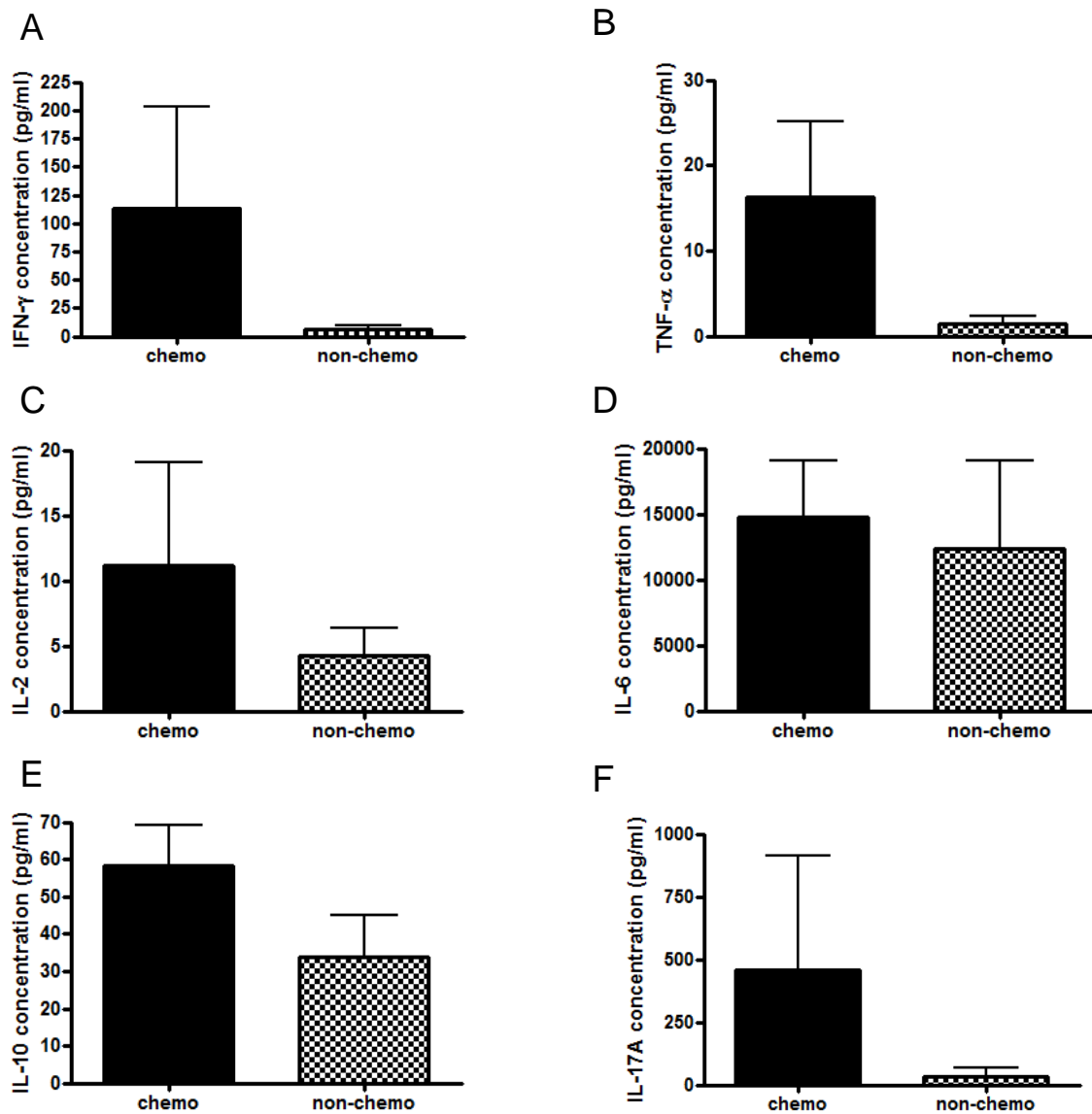
**Fig. 2. Comparison of cytokine concentrations in supernatant of three-dimensionally cultured breast cancer and normal tissues.** Breast cancer tissues (cancer tissues) or normal tissues of breast cancer patients (normal tissues) were cultured for 6 days in TGP gel respectively, and the cytokine concentrations in supernatant were determined by CBA assay procedures. Twenty-one cancer tissues and eight normal tissues were examined. The mean  $\pm$  SD concentrations were indicated. The cytokine concentrations did not significantly differ between cancer tissues and normal tissues. The frequencies of the expression of IFN- $\gamma$  was significantly different between the cancer tissues and the normal tissues, as analyzed by Chi-square test ( $p=0.0052$ ). ND (not detected): The cytokine concentrations were under each detection limit.

Table 2. Differences for the incidence of each cytokine expression between breast cancer tissues and normal tissues.

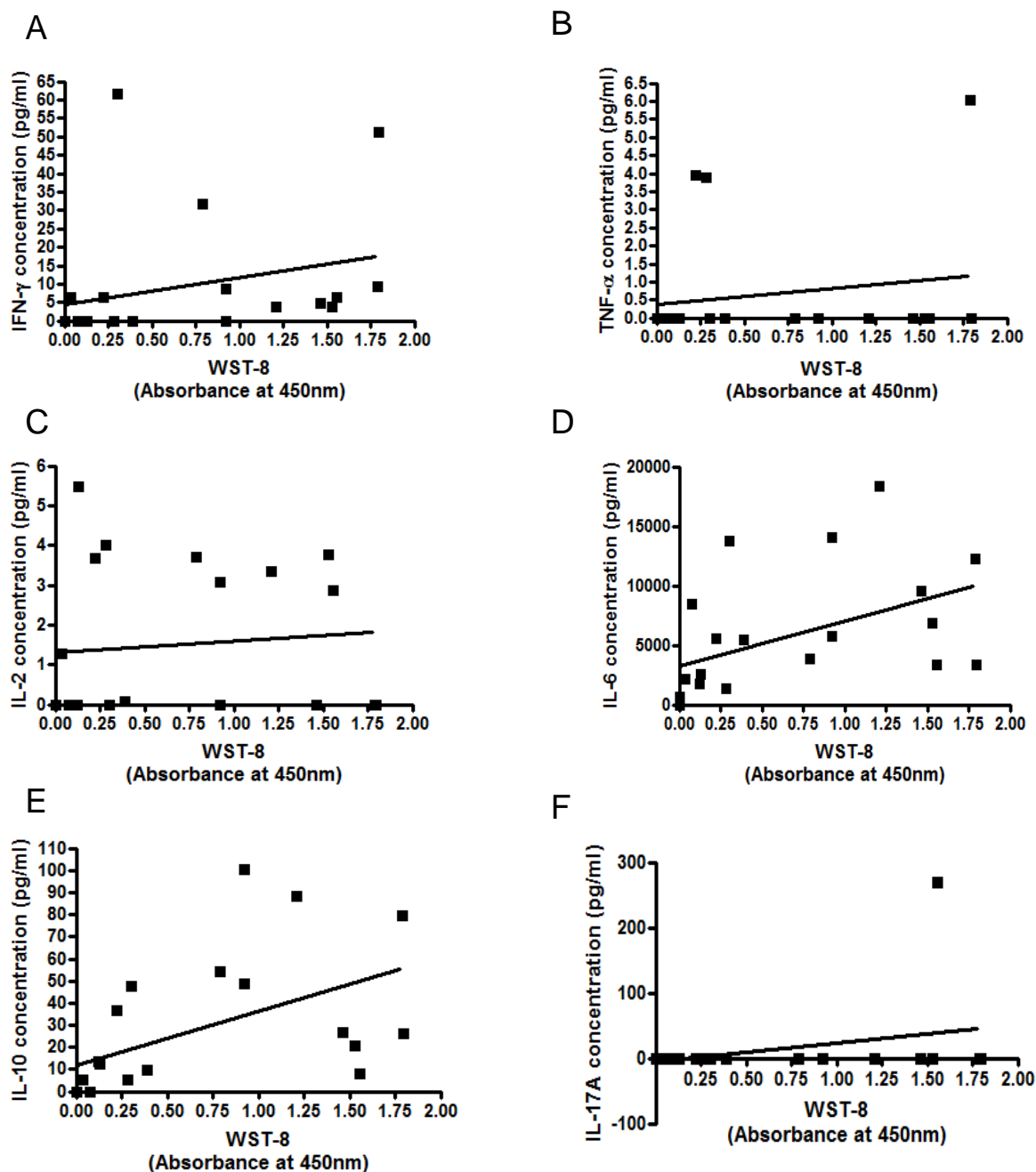
cytokine cut-off value (pg/mL)	expression	cancer	normal	total	<i>P</i> value
IFN- $\gamma$ (3.7)	+	12*	0	12	* <i>p</i> =0.0052
	-	9	8	17	
TNF- $\alpha$ (3.8)	+	6	0	6	<i>p</i> =0.0896
	-	15	8	23	
IL-2 (2.6)	+	7	0	7	<i>p</i> =0.0608
	-	14	8	22	
IL-4 (4.9)	+	0	0	0	not analyzed
	-	21	8	29	
IL-6 (2.4)	+	19	6	25	<i>p</i> =0.2800
	-	2	2	4	
IL-10 (4.5)	+	16	4	20	<i>p</i> =0.1730
	-	5	4	9	
IL-17A (18.9)	+	2	0	2	<i>p</i> =0.3657
	-	19	8	27	

The resected tissue samples were grouped into those expressing and none-expressing each cytokine, and the difference for the incidence of cytokine production between cancer and normal tissues was analyzed. The cut-off points of cytokine expressions were the detection limit of each cytokine concentration shown in the Table. Statistical analysis was performed by Chi-square test. The incidence for the expression of IFN- $\gamma$  was significantly higher in cancer tissues (\**p*=0.0052).





**Fig. 3.** Comparison of each cytokine concentration in supernatant of three-dimensionally cultured tissues obtained from patients with and without-chemotherapy. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10 and IL-17A in the supernatant of three-dimensionally cultured tissues obtained from patients with (n=6) or without (n=15) chemotherapy were compared. There was no difference in IFN- $\gamma$  (A;  $p=0.0662$ ), TNF- $\alpha$  (B;  $p=0.1612$ ), IL-2 (C;  $p=0.4254$ ), IL-6 (D;  $p=0.1106$ ), IL-10 (E;  $p=0.0674$ ) and IL-17A (F;  $p=0.7086$ ) concentrations between these patient subgroups, as analyzed by Mann Whitney test, were observed in the patients with chemotherapy.



**Fig. 4. Correlation between cytokine concentrations in supernatant of three-dimensionally cultured breast cancer tissues and WST-8 assay values of the cultured tissues.** The growth abilities of the tissues three-dimensionally cultured in TGP gel were assessed by WST-8 assay (absorbance at 450 nm) after the culture. Correlations were evaluated by Pearson's correlation coefficient test and Spearman's correlation coefficient test (n=21). Concentrations for IFN- $\gamma$  (A;

$p=0.0031$  by Pearson), IL-6 (D;  $p=0.0274$  by Pearson and  $p=0.0009$  by Spearman) and IL-10 (E;  $p=0.0158$  by Pearson and  $p=0.0003$  by Spearman) in the culture supernatant were significantly correlated with the growth abilities of the tissues as evaluated by the WST-8 assay whereas those of TNF- $\alpha$  (B), IL-2 (C) and IL-17A (F) were not.

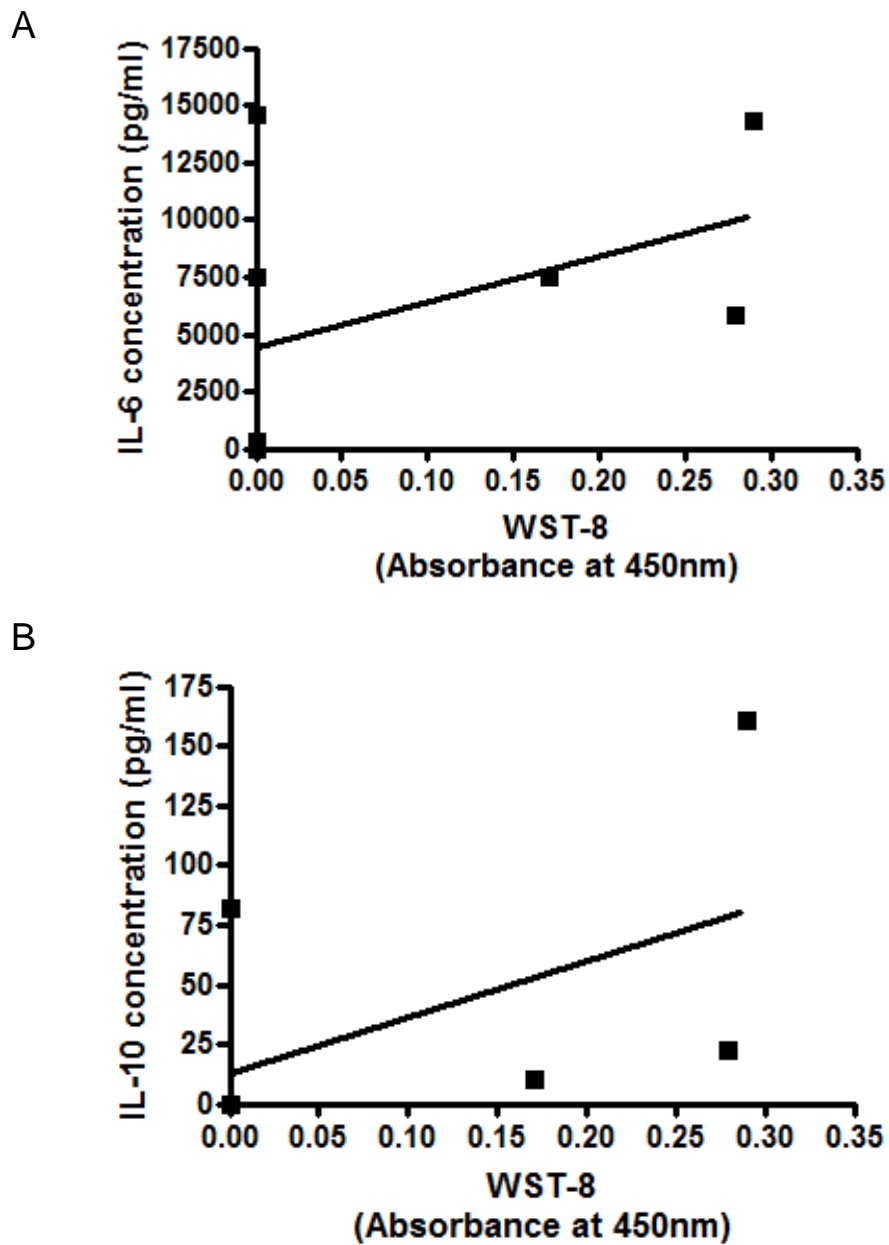
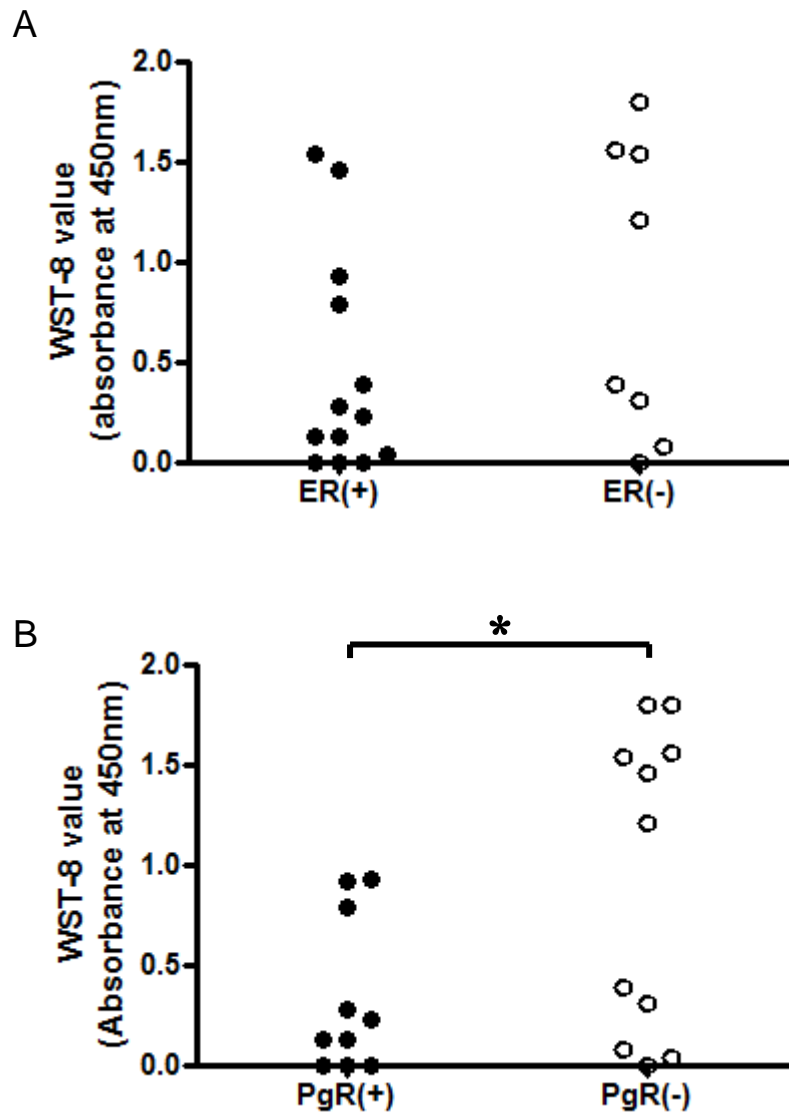


Fig. 5. Correlation between cytokine concentrations in supernatant of three-dimensionally cultured normal tissues and the WST-8 assay values of cultured tissues. Correlation was evaluated by Pearson's correlation coefficient test and Spearman's correlation coefficient test (n=8). Concentrations for IL-10 (B) in the culture supernatant was significantly correlated with the WST-8 assay values of the tissues ( $p=0.0458$  by Spearman), however there was no significantly correlation between normal tissue growth and IL-6 concentration (A).



**Fig. 6.** Comparison for the WST-8 assay values of three-dimensionally cultured tissues between hormone-receptor positive and negative breast cancer tissues. A; comparison between ER(+) tissues (n=13) and ER(-) tissues (n=8). B; comparison between PgR(+) tissues (n=10) and PgR(-) tissues (n=11). A significant difference for the WST-8 indices was observed between PgR(+) and PgR(-) tissues, as analyzed by unpaired t test with Welch's correction (\* $p=0.0383$ ).

Table 3. Relationship between estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PgR) expression incidence and the WST-8 assay value (index for tumor growth) of three-dimensionally cultured breast cancer tissues.

		WST-8 assay value for 3D cultured sample		
		Higher	Lower	Total
Estrogen receptor (ER)	+	5	8	13
	-	6*	2	8
	Total	11	10	21
Progesterone receptor (PgR)	+	3	7	10
	-	8	3	11
	Total	11	10	21

The patients were grouped into the higher and lower subjects expressing higher and lower WST-8 assay values, respectively, by the median score (0.3026 read by absorbance at 450 nm) for the results of WST-8 assay of 3D cultured sample. On the other hand, the patients were divided into the ER positive(+) and ER negative(-) or PgR positive(+) and PgR negative(-) groups. ER and PgR of patients' cancer tissue were detected by immunohistochemical analysis. Statistical analysis for the incidence of subjects with cancer tissues exhibiting the high WST-8 values in vitro was performed by Chi-square test. The ER(-) tissues exhibited significantly high incidence of the greater WST-8 assay-values (\* $p=0.0306$ ).

Table 4. Relationship between the TNM stages and the incidences of cytokines production in culture medium of three-dimensionally cultured breast cancer tissues.

The incidence of cytokine in cultured cancer tissue		TNM stage			<i>P</i> value
		Stage IIA	Over stage IIB	Total	
IFN- $\gamma$	Positive	7	4	11	<i>p</i> >0.05
	Negative	7	2	9	
TNF- $\alpha$	Positive	3	5*	8	* <i>p</i> =0.0096
	Negative	11	1	12	
IL-2	Positive	4	3	7	<i>p</i> >0.05
	Negative	10	3	13	
IL-4	Positive	0	0	0	not analyzed
	Negative	14	6	20	
IL-6	Positive	5	5	10	<i>p</i> =0.051
	Negative	9	1	10	
IL-10	Positive	10	5	15	<i>p</i> >0.05
	Negative	4	1	5	
IL-17A	Positive	1	1	2	<i>p</i> >0.05
	Negative	13	5	18	
Total		14	6	20	

The patients were divided into positive and negative groups for the cytokine production in culture medium of three-dimensionally cultured breast cancer tissues. The cut-off limits of cytokine expressions were the median of each cytokine concentration (all median was 0 pg/mL).

On the other hand, the patients were divided into the stage IIA and over stage IIB groups. Then, the statistical analysis was performed by Chi-square test for the incidence of cytokine production from their three-dimensionally cultured cancer tissues into culture medium. The patients with stages over IIB of TNM stage exhibited significantly higher incidence for the TNF- $\alpha$  production in their three-dimensionally cultured tissues (\**p*=0.0096).

#### 第四節 考察

本章では、乳癌患者から摘出した癌組織および正常乳腺組織が、TGPを用いた三次元培養系において増殖が可能であり、またその培養上清中にいくつかのサイトカインが産生されることを明らかとした。

癌組織は正常組織よりも増殖能が高い傾向があったが、両者の間に有意な差はなかった。一般に、正常細胞と癌細胞ではその増殖能に差があることが知られている[19]。本研究では、TGP培養系を用いているが、この条件では線維芽細胞などの癌細胞以外の細胞は増殖できない。さらに本研究では、癌患者から外科的切除にて得られた乳癌組織を使用しており、細胞株を用いたこれまでの研究の培養システムとは異なっている。このため、手術で切除された組織のTGPゲル中での増殖能は他の三次元培養系で培養された癌細胞株の増殖能と比べ相対的に緩徐であると考えられる。また、本研究での正常組織のサンプルサイズが少ないことが統計解析力に影響している可能性もある。これらの点に基づき、本研究結果とこれまでの他の研究機関で得られた結果との違いが生じた可能性が考えられる。

化学療法は、外科切除後の癌組織の三次元培養系における増殖能に有意な影響を及ぼすことはなかった。三次元培養により乳癌組織から培地中に産生されたIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-10、およびIL-17Aの濃度は、化学療法を行った患者から得られた癌組織の方が化学療法を行っていない患者から得た組織よりも相対的に高かったが、統計的有意差はなかった。パブリックドメインであるThe Cancer Genome Atlas (TCGA)の"Breast Invasive Carcinoma"によれば、術後アジュバント薬物療法を受けた患者では、受けていない患者に比べ、癌組織中のIFN- $\gamma$  mRNA発現が高いことが報告されている[20]。エストロゲン受容体陽性乳癌組織は、陰性の癌組織に比べ本培養系での増殖能が有意に低いことが示された。IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、およびIL-2は癌組織の培養上清に特異的に検出され、またTNF- $\alpha$ は乳癌患者病期のバイオマーカーとなりうることが示唆された。

本研究において、三次元培養した乳癌組織と正常組織は、共にIL-6およびIL-10を著しく高量産生・分泌した。IL-6は*in vitro*の乳癌細胞に対し、多面的な作用があることが示唆されている。IL-6が、*in vivo*および三次元培養したER+乳癌細胞に対し、増殖因子として作用するという報告がある[21]。また、肺癌患者と健常者との間で、IL-6 572G/C多形分布に有意な差はないという報告がなされた[22]。これらの知見より、IL-6やIL-10をコードする遺伝子は癌と正常組織の両方で発現している可能性がある。

癌組織は数多くの表現型を持つ細胞から成り、そのいくつかは癌幹細胞である。癌幹細胞は腫瘍原性があり、腫瘍を加速させる[23]。癌幹細胞はマンモスフェアと呼ばれる球形組織様に増殖する能力を有する。IL-6は癌幹細胞と非癌幹細胞との間の可逆的変換バランスを調節しているという報告があり[24]、また癌幹細胞は非癌幹細胞に比べて高濃度のIL-6を産生することが知られている[24]。乳癌は幹細胞疾患の一種と言われており[25]、癌増殖は癌幹細胞の増殖と自己再生能力に依存するという報告がある[26-28]。正常乳腺組織由来ヒト癌やマンモスフェアでは、IL-6が悪性増殖を引き起こすことが示唆されている[29]。本研究では、



乳癌組織同様、正常乳腺組織の三次元培養上清中にも高濃度で IL-6 が存在していたが、悪性増殖が行われる環境が正常組織中にも存在している可能性が考えられた。本研究では、IL-10 は正常組織と癌組織でほぼ同量検出された。癌に関連する報告として、IL-10 は腫瘍増殖に対し増殖因子として働く可能性と、抑制因子として働く可能性が示唆されている。非ホジキンリンパ腫では、抗腫瘍活性を抑制し、癌を増殖方向に導くことが示唆されている [30] が、腫瘍付近に誘導される腫瘍関連マクロファージが IL-10 を高産生し、細胞障害性 T 細胞の抗腫瘍応答を効果的に鈍らせるという報告もある [31]。IL-10 は B 細胞、T 細胞、マクロファージなどの多くの細胞から産生される。IL-10 の産生については、制御性 B 細胞が IL-10 産生能を有している [32] ことが示されており、制御性 B 細胞が原発性乳癌患者の B 細胞から誘導されるということも示唆されている [33]。一方で、卵巣癌における腫瘍浸潤制御性 T 細胞の抗腫瘍活性の強さは、腫瘍浸潤制御性 T 細胞中の IL-10 濃度と正の相関があるという報告 [34] もあり、IL-10 が腫瘍免疫を抑制する可能性もある。以上の観点から、これらサイトカインがどこから産生されるのかを決定付ける更なる研究が必要と思われる。

本研究では、同様に IL-17A も乳癌組織の三次元培養上清にて高濃度で検出されたが、正常組織の培養上清には検出されなかった。IL-17 は、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、NKT 細胞、あるいは  $\delta\gamma$ T 細胞等の、様々な T 細胞サブセットから産生される [35-38]。また癌組織も IL-17 を産生することが示唆されており [39,40]、IL-17 が癌の血管新生を促進し癌の発達に寄与しているという報告もある [41]。

癌微小環境にて産生された Th2 系サイトカインは、癌に対する宿主の細胞性免疫を妨げる役割がある [42]。リンパ節転移のある胃癌患者では、Th1 系サイトカインは少なく、Th2 系サイトカインが多いという報告がある [43]。本研究では、乳癌組織培養上清中には、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの Th1 系サイトカインより IL-6 や IL-10 などの Th2 系サイトカインが高濃度存在していた。この結果は、前述した他の研究における見解と一貫性のあるものであった。IL-6 や IL-10 は乳癌組織と正常組織の両方から検出されたが、一方で他の研究では正常組織からのサイトカイン産生については検討されておらず、本研究における知見は重要と考える。

化学療法を受けた乳癌患者由来組織から産生された IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-10、および IL-17A 量は、化学療法を受けていない患者に比べ増加している傾向にあった (Fig. 3)。とりわけ、IL-17A 濃度には大きな差があった。IL-17 介在パラクラインネットワークが、癌の抗血管新生療法に対する抵抗性を高めるという報告がある [44]。IL-17 はまた、癌に対する VEGF 阻害療法への抵抗性を促進することで知られている [45]。一般に、化学療法により炎症が誘発される。炎症性サイトカインが脳内において記憶、注意力、処理速度、応答速度を障害することが示唆されている [46]。認知障害が見受けられる乳癌患者で、化学療法を受けた者の血漿中サイトカイン濃度を調べたところ、IL-1 $\beta$  および IL-6 が高濃度で観察された [46]。この観点から、化学療法を受けた患者の乳癌組織は少なくとも数種のサイトカインを分泌し、それが化学療法抵抗性を生じる一端となっている可能性が考えられる。

IL-6 が乳癌細胞の増殖を促進することが知られている [47] が、これは自己分泌機構を通して乳癌組織から分泌された IL-6 が自己増殖を促進しているものと考えられる。IL-10 は Th1

免疫を抑制して逆に癌増殖能を高めている可能性がある一方で、抗血管新生作用を介して間接的に癌増殖を妨げている[48]. IL-10は免疫抑制性であるだけでなく、炎症誘発性に作用することも知られており、細胞毒性活性およびCD8<sup>+</sup>T細胞を増強させる[49]. 本研究では、三次元培養乳癌組織上清中のIFN- $\gamma$ 、IL-6、およびIL-10濃度が、WST-8法で求めた組織増殖能と正の相関を示した。ドセタキセルまたはパクリタキセルで治療した進行乳癌患者血清中で、IL-1およびTNF- $\alpha$ が減少している一方、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子濃度が増加しているという報告がある[50]. 本研究では、癌組織サンプル摘出前にタキサン系薬物で治療した患者は21人中3人のみであったため、治療に用いたタキサン系薬物の血清中サイトカインに及ぼす影響は明確ではない。

IL-17は、腫瘍微小環境内で既に腫瘍の初期構築に関与していることが示唆されている[51]. IL-17産生Th17細胞やIL-17産生CD8<sup>+</sup>T細胞(Tc17)が、乳癌微小環境で多く産生されるTGF- $\beta$ およびIL-6存在下で、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞やCD8<sup>+</sup>T細胞から誘導されることが報告されている[52,53]. 申請者の研究では、Tc17のようなIL-17産生細胞が周囲の乳癌組織から分泌されたTh1サイトカインにより誘導され、IL-17を産生している可能性が考えられた。

最後に、申請者は三次元培養乳癌組織のWST-8値と、培養上清中の各種サイトカインの濃度、患者の病期、あるいは患者の臨床データとの関連を調べた。その結果、ER<sup>-</sup>癌組織はER<sup>+</sup>癌組織より、高増殖能を示す頻度が有意に高かった(Table 3). TCGAの"Breast Invasive Carcinoma"によれば、NF $\kappa$ Bシグナルを強く抑制するTNFIP3遺伝子とERをコードするESR1遺伝子の共発現が、有意に高率で起こることが分かっている(p=0.027, log odds ratio: 0.931)[20]. これは、ESR1が発現している乳癌患者において、TNFAIP3発現によりNF $\kappa$ Bシグナルが抑制されていることを意味する。ER<sup>+</sup>乳癌の増殖はE2により亢進することがよく知られており、このため、ER<sup>+</sup>乳癌患者は抗E2療法やAI、あるいはLH-RHアナログなどの内分泌療法に感受性を示す。PgR発現は、タモキシフェンの治療効果に有意な影響を及ぼす[54]. 14,000人の乳癌患者を対象とした後ろ向きコホート研究では、ER<sup>+</sup>/PgR<sup>-</sup>もしくはER<sup>-</sup>/PgR<sup>-</sup>患者の生存率が、ER<sup>+</sup>/PgR<sup>+</sup>患者に比べ低いという報告がある[55]. 癌増殖能の指標であるWST-8値は、ホルモン受容体陽性乳癌患者に比べ、陰性患者で有意に高かった(Table 3). これらの知見は、ホルモン受容体陰性乳癌組織が本研究で用いた三次元培養系において進行性に増殖できることを示しており、ホルモン受容体陰性乳癌の悪性度に関係している可能性がある。一方、ER<sup>+</sup>癌組織は、TGPによる三次元培養状況下ではE2なしで広範に増殖することが出来ないと考えられる。

本章で述べた結果より、癌の病期が進行している程、三次元培養上清中に分泌されるTNF- $\alpha$ の量が多い傾向にあった(Table 4). 結腸直腸癌患者は、健常者に比べ血清中TNF- $\alpha$ 濃度が有意に高く、また最も高濃度を示したのはIV期の患者であり、これは早期患者に比べ有意に増加傾向である[56]. 血清TNF- $\alpha$ 濃度の低い患者の生存率は、高濃度の患者よりも有意に高いことも報告されている[56]. また、血漿中TNF- $\alpha$ 濃度が健常者に比べて良性および悪性乳腺腫瘍患者で有意に増加しており、良性に比べ悪性で高いという報告がある[57].

このため、進行乳癌組織が頻繁に TNF- $\alpha$ を分泌するという本結果は、これらの報告に矛盾しない。

本章では、結論として、TGP を用いた三次元培養ヒト乳癌組織が培養液中に IL-6 や IL-10 等の Th2 サイトカインを相対的に高濃度で分泌することを明らかとした。これらのサイトカインは Th1 由来の細胞性免疫に関連する腫瘍免疫を抑制し、腫瘍増殖を促進しているものと考えられた。IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, および IL-17A は三次元培養正常乳腺組織培養上清からは検出されなかったことから、乳癌組織特異的と考えられた。一方ホルモン受容体陽性癌組織は、本培養系ではホルモン受容体陰性癌組織と比べて増殖能が低かった。TNF- $\alpha$ は乳癌病期のバイオマーカーとなりうることを示唆した。

## 第二章 閉経後乳癌治療に併発する骨関節症状に対する Vitamin E (VE) の効果とその個別化投与に関する検討

### 第一節 目的

閉経後ホルモン感受性乳癌患者に対する AI の使用は、結果として代償的に骨関節症状を呈することが少なくない[3]。一方で、その明確な発症機序は明らかとなっておらず、症状を呈した場合には、NSAIDs または芍薬甘草湯などの鎮痛剤の使用がなされるが、重症の場合には AI の使用自体を中止せざるを得ない場合もある[58]。VE は脂溶性ビタミンの一種であり、その薬理作用として膜安定化作用や抗酸化作用を持つことが知られている[59]。臨床では実際に、更年期の冷感や痺れにも使用されており、AI 使用に伴う骨関節症状に VE が有効であったとする報告[60]もあることから、その有用性が示唆されている。一方、VE が乳癌患者における女性ホルモン環境に影響を及ぼす可能性も否定できず、この点に関してもエビデンスに乏しいのが現状である。そこで本章では、閉経後乳癌患者における AI 起因性骨関節症状に対する VE 投与の有効性、および VE 投与が血中女性ホルモン濃度や炎症性免疫応答に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 第二節 方法

#### 2-1 被験者および骨関節痛スコア

本研究は、「乳癌術後患者のアロマターゼ阻害剤による関節痛とビタミン E に関する検討 (ユベラ試験) (UMIN000004416)」として 2010 年 10 月がん研有明病院倫理委員会の承認を得て実施され、全患者からインフォームドコンセントを得た。がん研有明病院乳腺センターに通院する 50 歳以上の閉経後乳癌患者 62 名を対象とした。いずれの患者も支持内分泌療法として、AI であるアナストロゾール、エキセメスタン、またはレトロゾールのいずれかを内服していた (Table 5)。また、全患者が乳癌の外科的切除後であり、アジュバント化学療法もしくは放射線療法を受けていた。患者は AI 投与後、NCI-CTC Version2.0 における Grade2 以上の骨関節痛を訴えていた。慢性リウマチ疾患、変形性関節症、重度骨粗鬆症、精神疾患既往歴、および VE のサプリメント摂取のあった患者は除外した。また、抗凝固薬摂取患者および乳癌切除以外の外科手術歴のある患者も対象外とした。患者の AI 服用年数は平均  $1.77 \pm 0.16$  年であった。対象患者は AI 関連骨関節症状の軽減を目的として平均  $29.8 \pm 0.34$  日間、VE (トコフェロール酢酸エステルとして) を  $150 \text{ mg/日}$ 、経口摂取した VE 投与の前後で患者末梢血のサンプリングおよびアンケートを行った。骨関節症状は、こわばりと腰背部痛について、各々 0 点 (症状なし) から 3 点 (症状が強く日常生活に支障がある) でスコア化し、この合計点を算出した。この合計スコアを用いて、症状が改善した (合計スコアが減少した) 群を VE 感受性群 ( $n=24$ )、症状が不変/悪化 (合計スコアが不変/増加した) 群を VE 非感受性群 ( $n=27$ ) として 2 群に分けた (Table 5)。なお、アンケートへ

の記入が不十分であるなどの理由から VE の効果を判定できなかった患者 (n=11) は, VE の効果判定が関わる検討項目からは除外した。

Table 5. Patient Characteristics

Patient grouping based on;	Remarks	Number of Patients
Aromatase inhibitor used	Anastrozole	50
	Exemestane	2
	Letrozole	10
BMI	Nonobesity	50
	Obesity	12
The year after post menopause	<10 years	21
	≥10 years	38
	Unknown	3
The year after taking aromatase inhibitor	<2 years	41
	≥2 years	21
The osteoarthropathy symptom before vitamin E administration *	Mild	22
	Severe	34
	Unknown	6
The effect of vitamin E**	Sensitive	24
	Insensitive	27
	Unknown	11

\*Symptoms were scored as 0-3 points (3 is the worst) based on NCI-CTC Version 2.0 for each symptom; stiffness and low back pain. Then, the total score was calculated for each patient, and the patients were divided into mild and severe groups by the median score (median=4).

\*\*These patients were classified into two groups according to their responses to the therapeutic effect of vitamin E.

“Unknown” patients were not received questionnaire or refused to answer some questions.

## 2-2 血清中ホルモンおよびVE濃度の測定

対象患者末梢血を9 mL採取し、血清分離を行った。血清中 E2, Pg, および VE 濃度は、株式会社エスアールエルに依頼して測定した。血清中 E2 および Pg 測定は各々エクルーシス®試薬 E2III およびプロゲステロン II (Roche Diagnosis Co., Japan)を用い、電気化学的発光免疫法にてマニュアルに従い行った。血清中 VE 濃度は、n-ヘキサン溶液中にて励起波長 290 nm, 蛍光波長 325 nm の蛍光強度を測定する蛍光法にて、マニュアルに従って測定した。

## 2-3 PBMC の分離法と各種薬物が PBMC に及ぼす効果の in vitro における評価

### 2-3-1 実験に使用した試薬, 器具および機器

RPMI-1640 培地はシグマ社, 10%ウシ胎児血清 (FBS) はニチレイバイオ社, ペニシリン G およびストレプトマイシンは GIBCO 社, PBMC 分離液はナカライテスク社からそれぞれ入手した。コンカナバリン A (ConA) は生化学工業社より, アナストロゾールはシグマ・アルドリッチ社から, (+)- $\alpha$ -トコフェロール (VE) はイワキ社から入手した。ベノジェクト採血管はテルモ社, 96 穴平底滅菌プラスチックプレートおよびマイクロプレートミキサーはイワキ社のものを用いた。ほかの試薬は全て特級品を用いた。

### 2-3-2 培地および試薬の調製

RPMI-1640 培地に, 56°C で 30 分間非働化した FBS を 10% (v/v) となるように添加し, さらにペニシリンおよびストレプトマイシンを, 各々 100 U/mL および 100  $\mu$ g 力価/mL となるように溶解させ, 培養に用いた。ConA 溶液は, ConA 粉末を培地に溶解させ, その 1  $\mu$ L を各ウェルに添加したとき, 最終濃度が 5  $\mu$ g/mL になるように調製した。また, アナストロゾールおよび VE 溶液は, エタノールに溶解させ, その 4  $\mu$ L を各ウェルに添加したとき, 最終濃度が各々 1, 10, 100 ng/mL, 1.88, 18.8, 188 pg/mL になるように調製した。

### 2-3-3 PBMC の分離および培養方法

リンパ球分離液 3.0 mL 上にヘパリン血約 10 mL を静かに重層し, 23°C, 2000 rpm で 20 分間遠心分離した。PBMC 層を分取し, RPMI-1640 培地で 2 回洗浄後,  $1 \times 10^6$  cells/mL となるように培地で希釈し, PBMC 懸濁液とした。PBMC を 96 穴平底滅菌プラスチックプレートの各ウェルに 195  $\mu$ L ずつ分注し, この各ウェルに ConA を 1  $\mu$ L 加え (最終濃度 5  $\mu$ g/mL), さらに, 各濃度の薬物溶液を 4  $\mu$ L 添加し, 全量を 200  $\mu$ L とした。Control well には薬物溶液のかわりにエタノール 4  $\mu$ L を添加した。ミキサーにて攪拌後, 5%CO<sub>2</sub>, 37°C で 72 時間培養した。

## 2-4 Th1/Th2/Th17 サイトカイン測定

### 2-4-1 実験に使用した試薬, 器具および機器

第一章 2-4-1 と同様のものを使用した.

### 2-4-2 フローサイトメーターによる Th1/Th2/Th17 サイトカイン測定法

患者血清中および PBMC 培養上清中の IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A 濃度を, 第一章 2-4-2 に述べた方法に準じて CBA 法にて測定した.

## 2-5 統計解析法

バイオマーカーである血清中 VE, E2, Pg, および各種サイトカインの濃度の差を患者二群間で統計学的に比較する場合は Mann-Whitney の U 検定を, また, VE 投与前後の患者間における骨関節症状スコアの比較には Wilcoxon 検定を, VE 投与前後の患者間における各種バイオマーカーの平均値の比較には対応のある t 検定を用いた. 血清中 E2 濃度と各種サイトカイン濃度の相関, および VE 投与後の骨関節症状改善率と VE 投与前の血清中バイオマーカー濃度との相関は, ピアソンの相関解析により検討した. 血清中バイオマーカー濃度と骨関節症状の改善スコアの相関は Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した. 血清 E2 濃度高値の患者群および低値の患者群間における, VE 投与前骨関節症状スコアの重症度が高い患者の頻度の差は, カイ二乗検定により検討した. VE 投与への応答性の良い患者を血清中 E2 濃度の境界値 1.8 pg/mL により区別するという診断指標は, 血清中 E2 濃度と VE の効果に関する ROC 解析を行うことにより確認した. いずれも危険率 5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありと判定した. ROC 解析以外の全ての統計解析には, 解析ソフトの GraphPad PRISM 4.0 (GraphPrism software Inc.) を用い, ROC 解析には統計ソフトの JMP version 8.0.2 (SAS Institute Inc.) を用いた.

### 第三節 結果

AI に起因する骨関節症状が比較的軽症な患者群 (n=22) と、重症な患者群 (n=34) 間の血清中バイオマーカーの濃度差を比較した。その他 6 名の患者においてはスコア聴取が完結出来なかったため、本検討からは除外した。これら二群間における血清中 VE, E2, Pg, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の各濃度には有意な差はなかった (データ非表示)。さらに、血清中サイトカイン濃度とホルモン濃度との相関を検討したところ、血清中 E2 濃度と IL-17A 濃度との間に有意な正の相関があった ( $p=0.0291$ ) (Fig. 7)。一方、血清中 Pg, VE, または Th1/2 サイトカインと E2 濃度間には、有意な相関はなかった (データ非表示)。

次に、VE 投与前後で骨関節症状スコアの評価ができた 51 名の乳癌患者において、VE が骨関節症状スコアを減少させるか否かに基づく VE の治療効果を検討した。AI 治療に起因する骨関節症状スコアの平均値は、VE 投与によって有意に減少した ( $p=0.0178$ ) (Fig. 8A)。AI 服用中の乳癌患者において VE 投与が E2 濃度に影響を及ぼすか否かを確認するため、VE 投与前後に血清中ホルモン濃度を測定した。その結果、血清中の平均 E2 濃度は、VE 投与後に有意な変動はなかった (Fig. 8B)。一方、VE 投与によって血清中 VE 濃度は有意に増加した ( $p<0.0001$ ) (Fig. 9)。さらに、骨関節症状スコアと先に述べた各種血清中バイオマーカーの濃度との相関を検討したところ、VE 投与前後いずれにおいても、これらの値の間に有意な相関はなかった (データ非表示)。

AI に起因する骨関節症状に対する VE 投与の有用性と各種血清バイオマーカーとの関連をさらに検討するため、次に骨関節症状スコアリングに必要なすべてのアンケートに回答した乳癌患者 51 名の、骨関節症状改善率を算出した。改善率は VE 投与後のスコアから VE 投与前のスコアを減じ百分率で表した。骨関節症状改善率と VE 投与前後の血清中ホルモンまたはサイトカイン濃度との関係を調べたところ、VE 投与前の血清中 E2 濃度 ( $p=0.0069$ ) および IL-17A 濃度 ( $p=0.0234$ ) と骨関節症状改善率との間に各々有意な負の相関が見られた (Fig. 10)。これより、AI 服用患者血清中 E2 濃度が低いほど VE の治療効果が高いことが考えられたため、VE の効果が認められた患者 (感受性群: n=24) と効果のなかった患者 (非感受性群: n=27) 間で、VE 投与前の血清中 E2 濃度を比較した。その結果、感受性群は非感受性群に比べ、血清中 E2 濃度が有意に低値を示した ( $p=0.0005$ ) (Fig. 11)。

さらに、VE 投与後の骨関節症状スコアの中央値で患者を感受性群と非感受性群に分け、以下の検討を行った。すなわち、VE 投与前の血清中 E2 値が低値を示した群 ( $\leq 1.8$  pg/mL) または IL-17A 値が低値を示した群 ( $\leq 0.72$  pg/mL) と、血清中 E2 値が高値を示した群 ( $> 1.8$  pg/mL) または IL-17A 値が高値を示した群 ( $> 0.72$  pg/mL) との間で、VE 療法に感受性を示す患者の頻度を検討した。VE 投与前の血清中 IL-17A 濃度と VE 治療応答性との間に有意な関係はなかった (データ非表示) が、一方で、血清中 E2 濃度が 1.8 pg/mL 以下の患者では VE 投与後の骨関節症状が改善した患者の割合が有意に高かった ( $p=0.0004$ ) (Table 6)。さらに、血清中 E2 濃度と VE 治療応答性との間に強い相関があることが、両者の ROC 解析



により求められた曲線下面積が 0.78074 であったことから明らかとなった (Fig. 12). また, これより, 血清中 E2 濃度の至適カットオフ値が 1.8 pg/mL と結論付けられた. E2 カットオフ値を 1.8 pg/mL とした時, VE の効果を予測する血清中 E2 値の判断基準感度および特異度は各々 80.0% および 70.4% であり, 正確な患者分類率は 74.5% だった.

全てのアンケートに回答した 51 人の患者を, VE 療法応答性によって VE 感受性群と非感受性群に分け (Table 5), VE 投与前後における血清中 E2 濃度を両群間で比較した. 全患者を対象に VE 投与後の血清中 E2 濃度を投与前と比較すると, 有意な増加がみられた ( $n=51$ ,  $1.88 \pm 0.21$  pg/mL から  $2.38 \pm 0.20$  pg/mL へ増加,  $p=0.0412$ ). 一方, VE 療法応答性の違いにより群分けした各群別に同様の検討を行った場合, VE 感受性群では VE 投与後血清中 E2 濃度が有意に増加した ( $n=24$ ,  $1.14 \pm 0.25$  pg/mL から  $2.21 \pm 0.32$  pg/mL へ増加,  $p=0.0124$ ) が, VE 非感受性群では有意な変化はなかった ( $n=27$ ,  $2.54 \pm 0.28$  pg/mL から  $2.53 \pm 0.24$  pg/mL へ増加) (Fig. 13).

最後に, VE と AI がヒト PBMC に及ぼす直接的な影響を検討するため, 健常者より得られた PBMC に T 細胞マイトジェンである ConA 存在下, アナストロゾール (1-100 ng/mL) もしくは VE (1.88-188  $\mu$ g/mL) を添加し培養を行った. PBMC 増殖率は WST-8 値として, また, PBMC 培養上清中の IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度は, CBA 法により測定した (Fig. 14). その結果, アナストロゾール 10 ng/mL と VE 18.8  $\mu$ g/mL の共存下では, アナストロゾール 10 ng/mL 単独の時に比べ, PBMC の WST-8 値が有意に高かった ( $p<0.05$ ). 一方で, 活性化 PBMC による 7 種のサイトカインの産生には, いずれの薬物も有意な影響は及ぼさなかった.

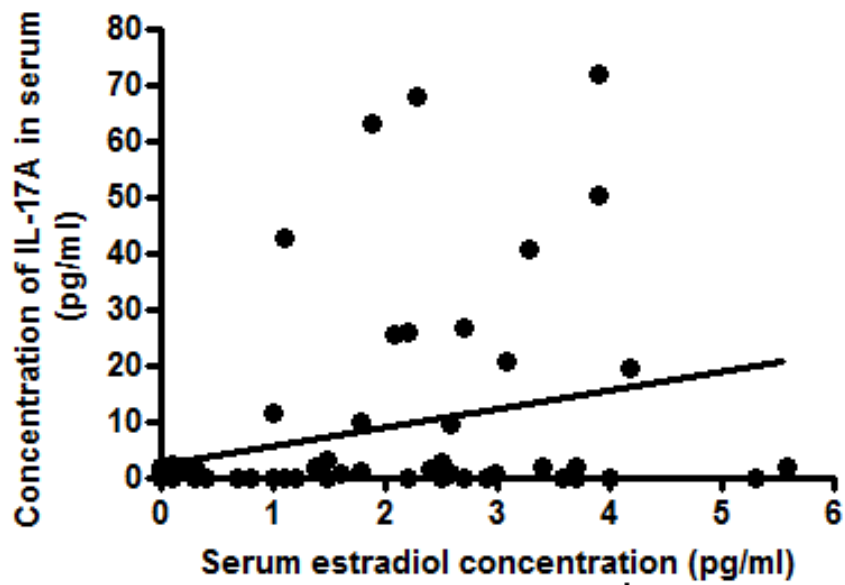
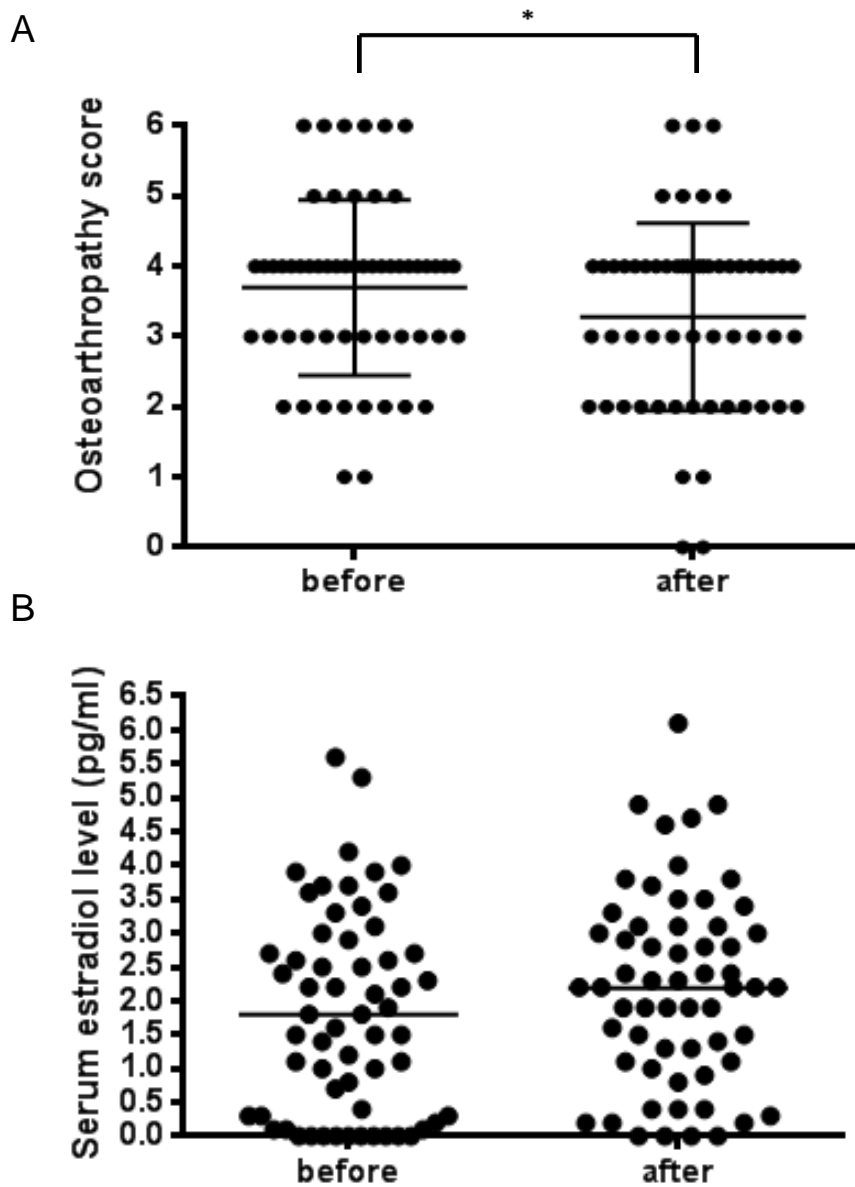


Fig. 7. The correlation between serum estradiol concentrations and IL-17A concentrations. There was a positive correlation between serum estradiol concentrations and IL-17A concentrations in 62 breast cancer patients before administration of vitamin E, as analyzed by Pearson's correlation coefficient test ( $p=0.0291$ ).



**Fig. 8. Osteoarthropathy scores and estradiol concentrations in aromatase inhibitor treated patients after vitamin E administration (n=60).** (A) A statistically significant decrease in the mean scores was observed after the vitamin E administration, as compared to the mean scores before administration, as analyzed by Wilcoxon test ( $*p=0.0178$ ). (B) There was no significant change in the mean estradiol concentrations after administration of vitamin E by paired t test.

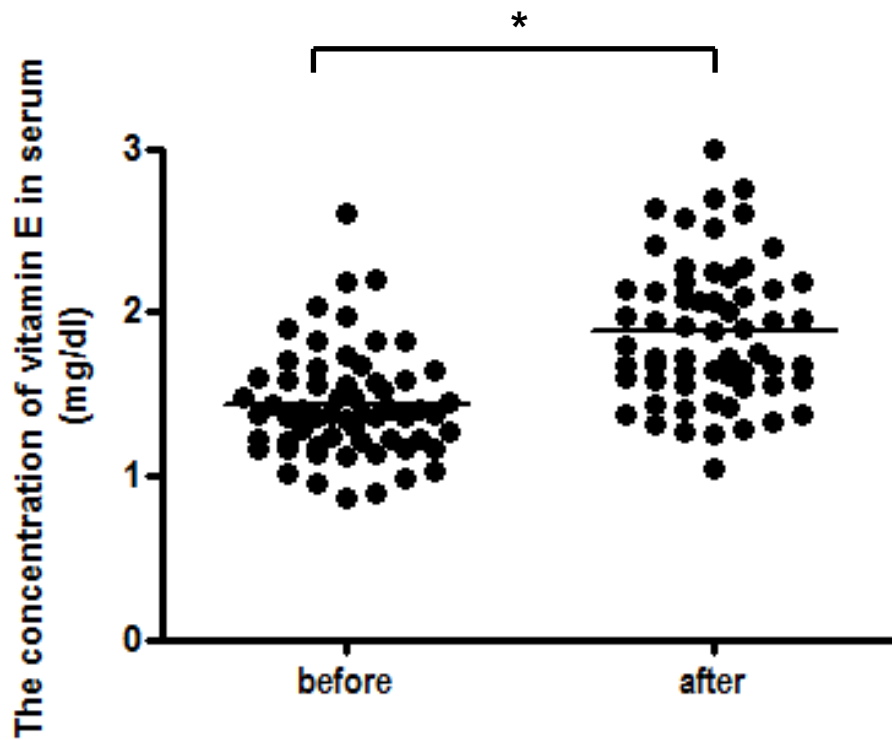
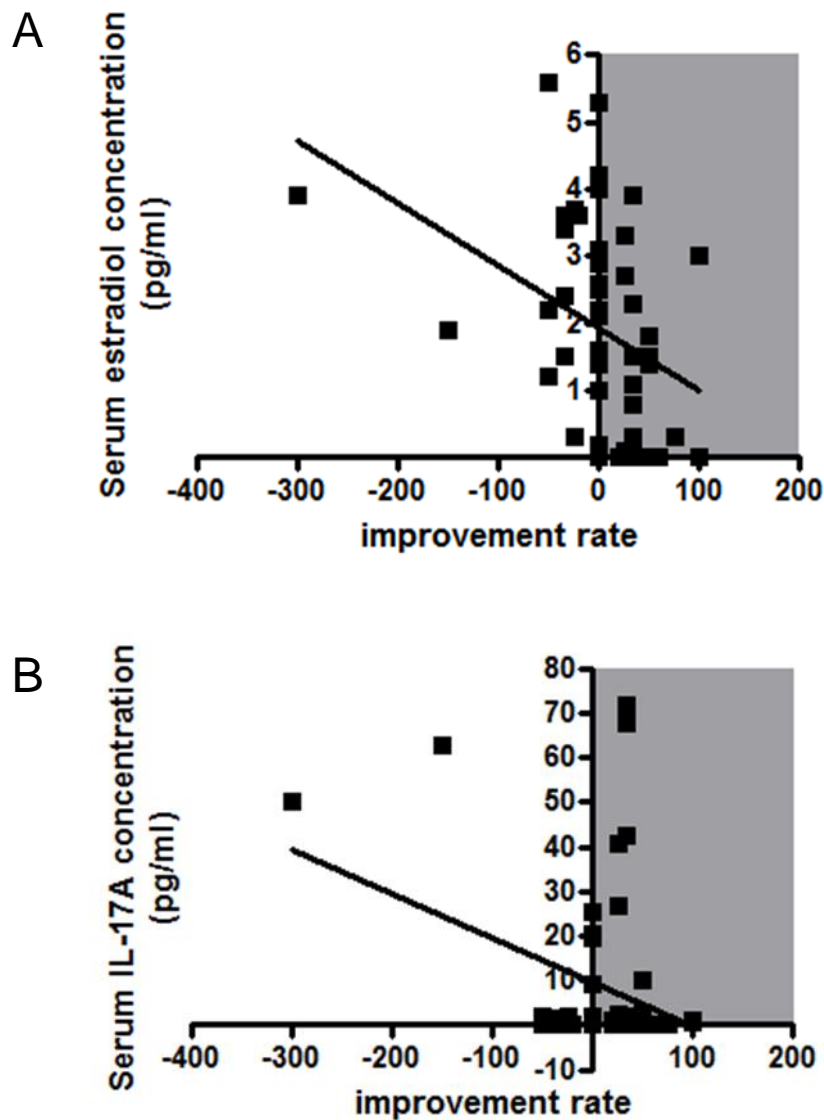


Fig. 9. Changes of serum vitamin E concentrations in patients after vitamin E administration. Statistically significant increases in the mean concentrations of vitamin E was observed after the vitamin E administration, as compared to those before administration, as analyzed by paired t test ( $p < 0.0001$ )( $n=61$ ).



**Fig. 10. Correlations between osteoarthropathy improvement rates and serum estradiol or IL-17A concentrations.** There were correlations between improvement rates of osteoarthropathy (%) and serum concentrations of (A) estradiol or (B) IL-17A (pg/mL) in 51 breast cancer patients before administration of vitamin E. There were significant negative correlations in (A) estradiol ( $p=0.0069$ ) and (B) IL-17A ( $p=0.0234$ ). The plots shown in un-shaded area (left zone) represents the patients with worse symptoms after the vitamin E administration, whereas the plots shown in shaded area (right zone) represents the patients with improvement in the symptoms. Zero percent in the abscissa means no change in the scores.

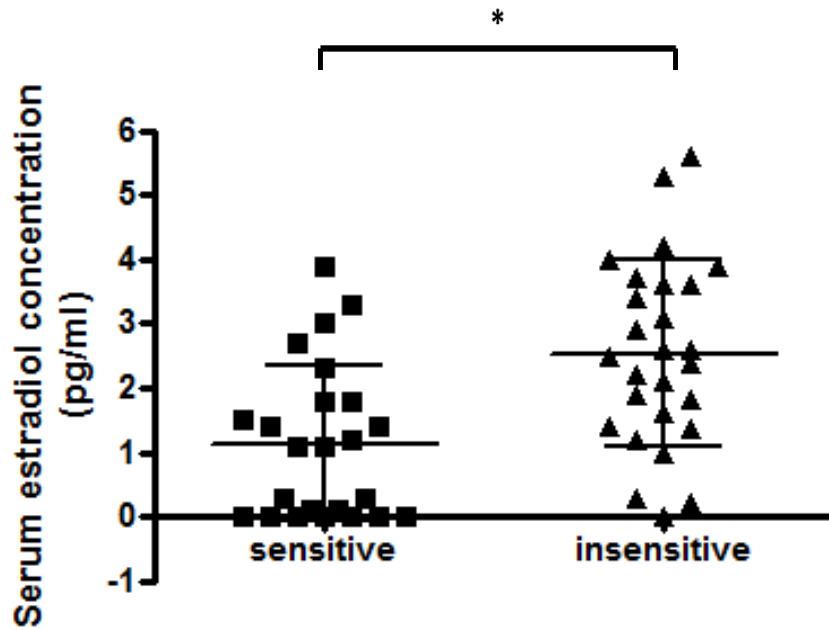
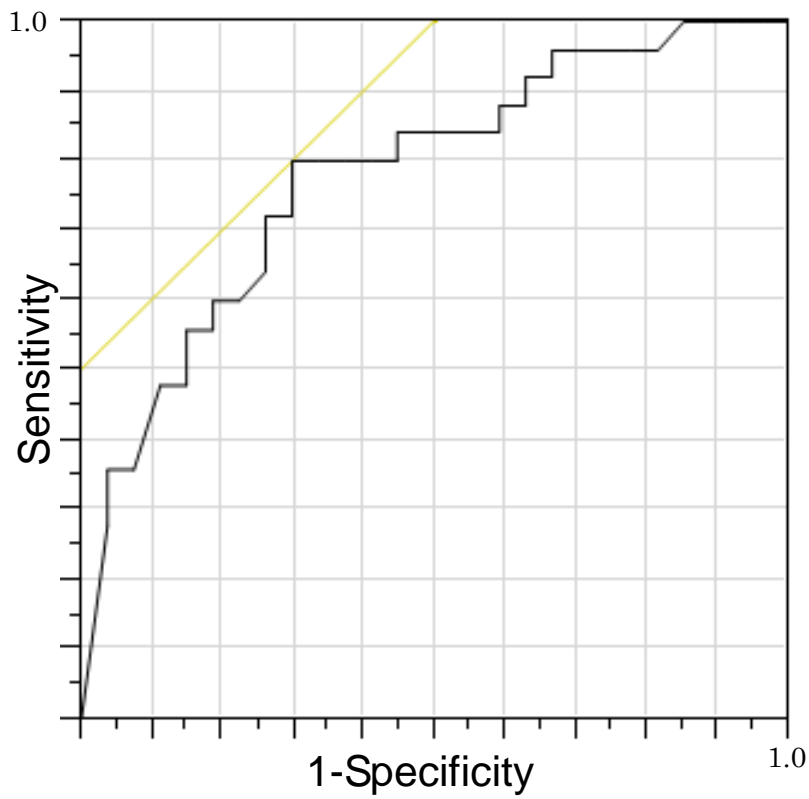


Fig. 11. Comparison of serum estradiol concentrations between vitamin E sensitive or insensitive patients. Serum estradiol concentrations, before administration of vitamin E, were compared between the vitamin E responsive patients (sensitive; n=24) and the vitamin E unresponsive patients (insensitive; n=27). There was a significant difference in the median concentrations of estradiol, as analyzed by the Mann Whitney's U-test ( $p=0.0005$ ).

Table 6. Relationship between serum estradiol concentrations and responses to vitamin E therapy.

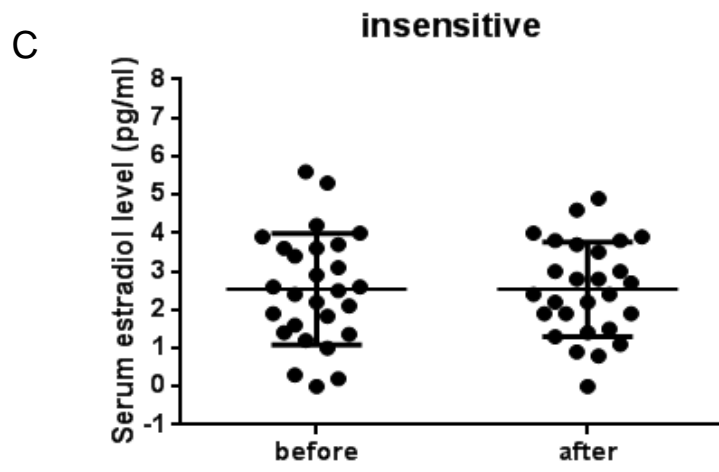
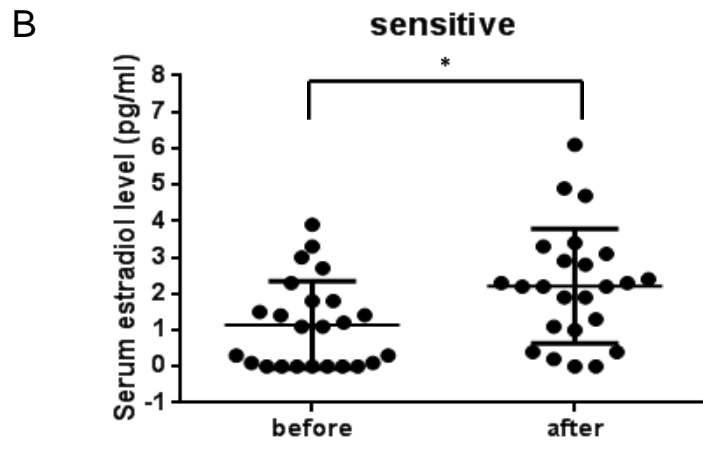
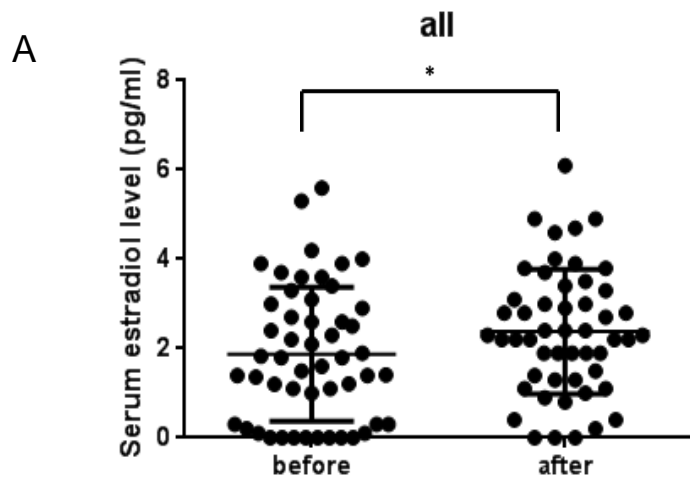
Response to the therapeutic efficacy of vitamin E	Serum estradiol before vitamin E administration (pg/mL)		
	Low: 1.8 $\geq$	High: 1.8<	Total
Sensitive	19*	5	24
Insensitive	8	19	27
Total	27	24	51

The patients were grouped into the sensitive and the insensitive patients by the median score for improvement of osteoarthropathy symptoms after the treatment by vitamin E. On the other hand, the patients were divided into the low- and high-serum estradiol concentration groups based on the median estradiol concentration of 1.8 pg/mL. Consequently, the incidence of the sensitive patients to the vitamin E therapy was compared between the low- and high-serum estradiol concentration groups. Statistical analysis was performed by Chi-Square test\*. The patients with low concentrations of serum estradiol exhibited significantly high incidence of the sensitive subjects responding to the vitamin E for osteoarthropathy caused by aromatase inhibitor (\* $p=0.0004$ ).

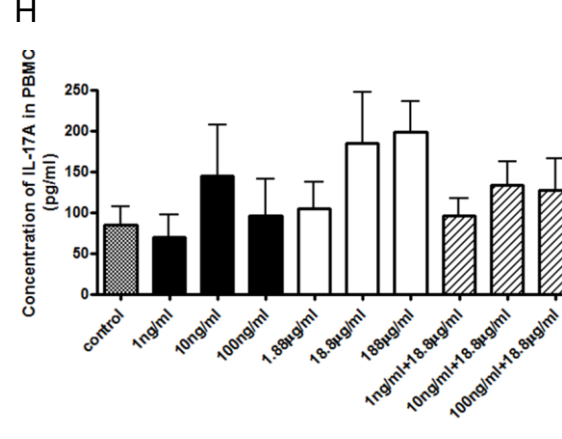
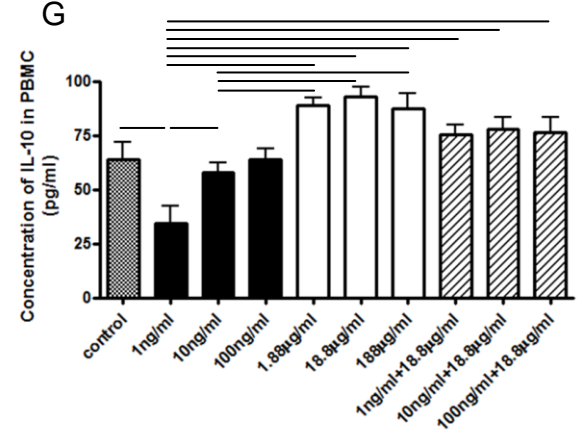
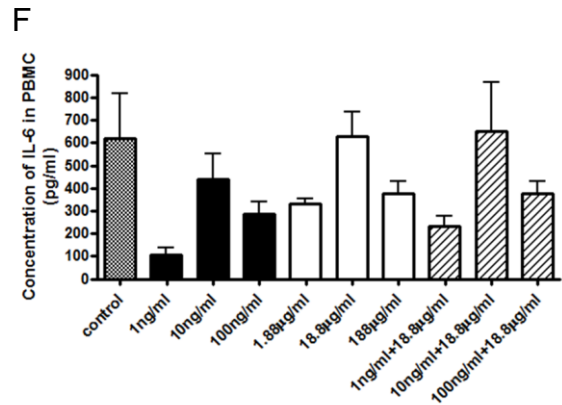
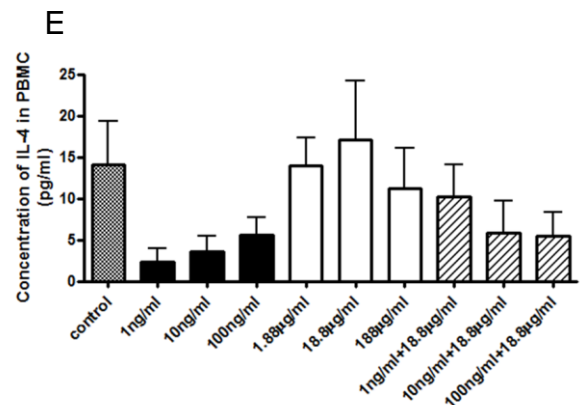
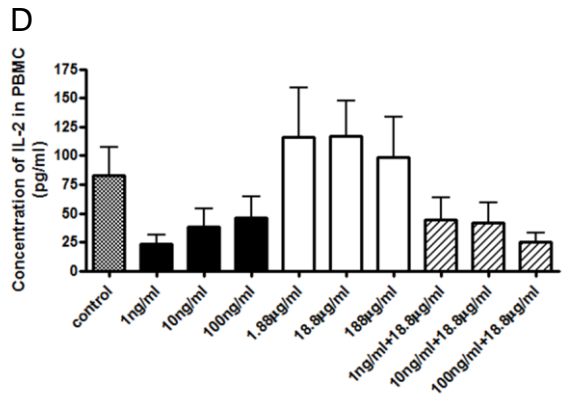
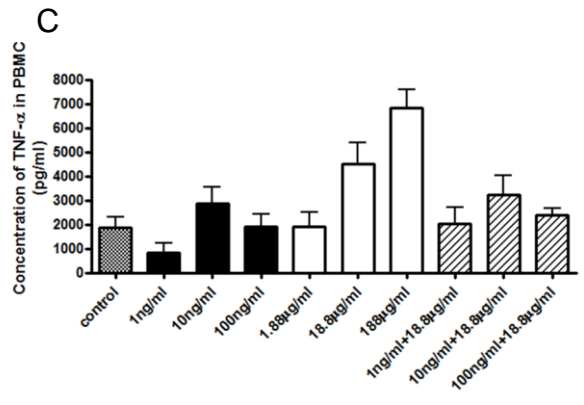
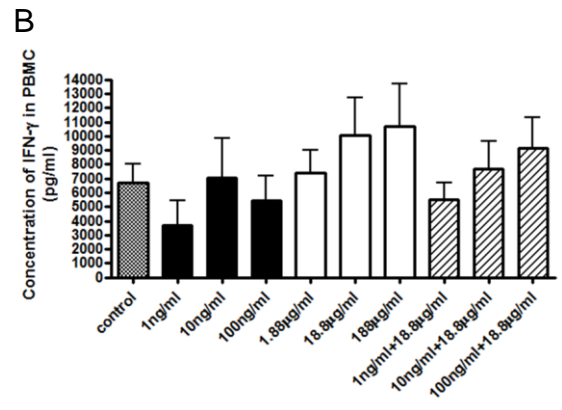
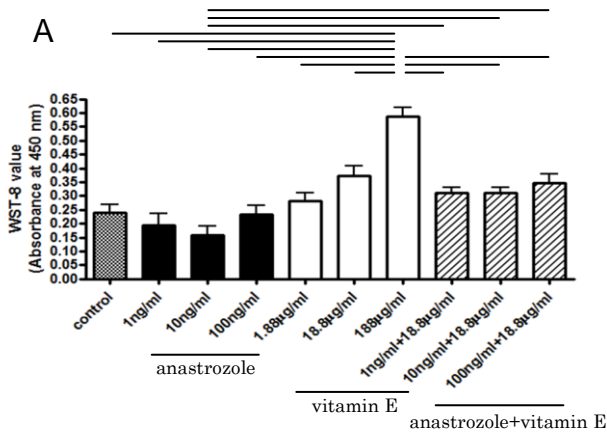


**Fig. 12. Serum estradiol level as a new biomarker for patients who will respond to vitamin E.** Receiver operator characteristic (ROC) curve for serum estradiol concentrations as a function of the improvement scores for osteoarthritis by vitamin E treatment. The areas under the curve (AUC) was 0.78074, and the cut-off value of estradiol was calculated as 1.80 pg/mL (see Results).





**Fig. 13. Serum estradiol concentrations in vitamin E-sensitive and -insensitive patients who answered all of the questionnaire.** 51 patients who answered all questionnaires were divided into vitamin E sensitive or insensitive groups and their serum estradiol concentrations between before and after vitamin E administration were compared. In all patients group (\* $p=0.0412$ ) and the sensitive group (\* $p=0.0124$ ), its level was significantly increased after vitamin E administration.



**Fig. 14. Effects of anastrozole, vitamin E, and their combination on the mitogen-activated PBMCs.** PBMCs obtained from health subjects were cultured in the presence of serial concentrations of anastrozole and/or vitamin E, under the stimulation with concanavalin A (n=4). Then, WST-8 assay values (A) and the concentrations of IFN- $\gamma$  (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-2 (D), IL-4 (E), IL-6 (F), IL-10 (G), and IL-17A (H) in the culture supernatant were measured, and analyzed by Bonferroni's multiple comparison test. The horizontal bars in each figure mean statistical significance between the data ( $p < 0.05$ ).

#### 第四節 考察

閉経後乳癌患者における AI 治療は、副作用としてしばしば骨関節症状を引き起こす。この結果、AI 治療を断念せざるを得ない場合もある。しかし一方で、閉経後骨粗鬆症は E2 の欠乏が原因となっている。このように、AI が E2 値を低下させることで、結果として骨関節症状を引き起こしている可能性がある。破骨細胞上の ER への E2 の結合は、破骨細胞の生存を制御しアポトーシスを誘発する Fas リガンドの遺伝子発現を活性化することが知られている[61]。このため、E2 欠乏は骨代謝の不均衡をもたらすと考えられる。

本章にて申請者は、骨関節症状の重症な患者と軽症な患者の間で、血清中 VE, E2, Pg, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度に有意な差がないことを明らかとした。このことから、AI 服用患者において、骨関節症状の重症度とこれらの血清中バイオマーカーとの間に関連性がないことが示唆された。一方、AI 服用中の乳癌患者において、血清中 E2 値と IL-17A 濃度との間に有意な正の相関が認められた (Fig. 7)。E2 欠乏は、IL-17 分泌に関与する Th17 細胞へのナイーブ T 細胞の分化を誘導するという報告がある[62]。加えて、E2 欠乏性骨粗鬆症の病態下では、IL-17 が骨減少を媒介することを示唆する報告[63]や、E2 の抗炎症作用がこれら IL-17 の作用に対して抑制的に働くという報告[64]もある。血清中 E2 値と IL-17A 濃度が正の相関を示したことから、IL-17 による骨関節症状の炎症に基づく悪化を E2 が抑えていることが示唆された。なお、他の研究ではマウスを用いてこれらの関連を検討しているが、本研究では患者末梢血清中のホルモンやサイトカイン濃度を測定している。このため、本研究で患者血清中に検出された IL-17 がどの体内組織もしくは臓器に由来するのか明らかとなっておらず、乳癌患者血清中の E2 と IL-17A との関連を説明する詳細なメカニズムについて、更なる検討が必要である。

VE は抗酸化作用や抗炎症作用など様々な生物活性を有しており[65]、また医薬品としても末梢血循環改善を目的として世界で汎用されている。しかしながら、AI 関連骨関節症状の治療を目的とした VE の有用性を検討した報告は乏しい。本研究にて、AI の使用により骨関節症状を呈した乳癌患者への VE 投与が、多くの患者において有効な治療であったことを明らかにした (Fig. 8)。今回の結果では、VE 投与が乳癌患者血清中の VE 濃度を有意に増加させたが、一方で血清中の E2, Pg, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, および IL-17A の濃度を有意に増加させることはなかった (データ非表示)。すなわち VE は、乳癌の増殖を抑制する AI の治療効果に好ましくない影響を及ぼすことはないものと結論できた。ヒトや動物モデルでは、高用量 VE が C 反応性タンパク質 (CRP) の減少や炎症性サイトカイン放出の抑制をもたらし、抗炎症効果を示すことが報告されている[66]。このような VE の有効性は、冠動脈疾患を併発している患者の研究でも明らかになっている。それによれば、 $\alpha$ -トコフェロール補充を行った患者はプラセボ群に比べ、CRP と TNF- $\alpha$ 濃度が有意に低いことが明らかとなっている[67]。加えて、特に大腸において、VE がシクロオキシゲナーゼ (COX) - 2 の活性を抑制し、続けて抗炎症および抗発癌作用を発揮することが報告されている[68]。一方で、VE は破骨細胞を誘導して骨吸収を刺激し、結果として骨量を減少させるという報

告があり[69], これにより血清 VE は骨量を左右する因子として働く可能性がある[69]. しかしながら, 卵巣摘出により作成した骨減少症モデルのラットでは,  $\alpha$ -トコフェロールおよびトコトリエノール両者の摂取により, 骨減少を防ぎ, 骨微小構造を維持するという報告がある[70]. このように, E2 と VE が破骨細胞および骨芽細胞の機能にどのような相互作用を及ぼすのかを明らかにする, 更なる検討が必要と考えられる.

VE 投与の前後各々で, 血清中の各種バイオマーカーの濃度と骨関節症状スコアとの間に有意な相関はなかった(データ非表示). この結果より, VE 投与は本研究で評価したバイオマーカーへの影響を介さずに骨関節症状スコアを低下させるということが示唆された. これは, 骨関節症状の重症度が血清中 VE, E2, Pg, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, あるいは IL-17A の濃度に依存せず出現しているということの意味する. さらに本研究の結果は, AI と VE が PBMC からのサイトカイン産生に有意な影響を及ぼさないことを示した. 一方で, VE は治療量のアナストロゾールとの併用により, T 細胞の増殖ポテンシャルを増大させることが示唆された (Fig. 14).

次に, VE 投与の効果を調査するため, 全アンケートに回答した 51 名の乳癌患者を VE 治療に応答した感受性群と治療応答性がみられなかった非感受性群に分け, 血清中 E2 濃度を比較した. VE 投与後において, 血清中 E2 濃度は 51 名の全患者および VE 感受性群 (n=24) で有意に増加したが, 非感受性群 (n=27) では有意な変化は示さなかった (Fig. 13). この知見から, VE 感受性患者の血清中 E2 値は VE 投与後に増加することが示唆された. しかしながら, 前述のように, 本研究の対象患者中 60 名で VE 投与後の血清中 E2 濃度を検討したところ, 値の有意な増加はみられなかった (Fig. 8). 51 名の患者では, 血清中 E2 濃度が  $1.88 \pm 0.21$  pg/mL から  $2.38 \pm 0.20$  pg/mL に, 感受性群では  $1.14 \pm 0.25$  pg/mL から  $2.21 \pm 0.32$  pg/mL に, そして非感受性患者では  $2.54 \pm 0.28$  pg/mL から  $2.53 \pm 0.24$  pg/mL に変化した. 健常閉経後女性の血清中 E2 値は  $31.1 \pm 16.64$  pg/mL と報告されている[71]. 本研究で対象とした患者は AI 治療を行っており, ゆえに VE 投与の有無にかかわらず, 血清中 E2 値は上述したように健常者に比べて非常に低い値である. この観点から, AI 投与後の乳癌の病態に及ぼす VE の影響はないものと考えられる. 一方, 前述したように, VE が破骨細胞の融合を刺激し骨量を減少させる報告がある[69]が, これはマウスやラットを用いた研究であり, E2 等の性ホルモンとの関連を検討したものではない.

AI 関連骨関節症状への VE の治療効果を明らかにするため, 血清中バイオマーカー濃度と VE 投与後の骨関節症状改善率の関係を調べた. この結果, AI 治療を行っている乳癌患者では, 血清中 E2 または IL-17A 濃度がより低値であるほど VE 治療による骨関節症状改善率が良好であることが示唆された (Fig. 10). 骨粗鬆症やリュウマチ患者で血清 IL-17 濃度が高値を示すという報告がある[72]. マクロファージコロニー刺激因子で刺激したマウスの骨髄由来マクロファージの破骨細胞形成に関する報告では, IL-17 が病期に応じて骨関節炎に異なった影響を及ぼすことが示されている[73]. とりわけ, マウス骨髄由来マクロファージからの破骨細胞形成に関する *vitro* の研究では, 実験的破骨細胞形成の最終段階での IL-17 暴露で破骨細胞数はむしろ減少し, これは  $0.1-10$  ng/mL の濃度範囲で用量非依存的に生じた[73].

E2 欠乏症は、IL-17 エフェクターや Act1 のアップレギュレートに付随して、RANKL 発現や骨吸収を促進するという報告がある[74]。これは、閉経後骨粗鬆症が自然免疫障害により発症するという概念を支持するものである。閉経後女性の血清中 E2 値は  $31.1 \pm 16.64$  pg/mL と報告されている[71]。本研究では、血清中 IL-17A 値と VE 投与前骨関節症状スコアとの間に有意な相関はなかった。しかしながら、VE 投与後では、血清 IL-17A 濃度は重症度スコアと有意な相関があった。この知見より、AI 治療に併発する骨関節症状の重症度に血清中 IL-17A 濃度が何らかの役割を担っている可能性が考えられる。次に、血清 IL-17A および E2 濃度に基づいて、VE 投与に対する応答性が良好で、骨関節症状が改善した患者を選別した。VE の骨関節障害に対する効果だけでなく、VE への応答性を、血清中バイオマーカーを用いてスクリーニングすることも合わせて報告している研究はほとんどない。本研究結果は、血清中 E2 が骨関節障害の改善および VE の治療効果に重要な役割を担っていることを示唆した。今回の結果が示すように、血清中 E2 濃度は骨関節症状が軽症な患者群と重症な患者群間で有意な差はなかったが、VE 治療への応答性が良好であった患者では不良の患者に比べ、VE 投与前の血清中 E2 濃度が有意に低値であった。これらの知見から、E2 低値 (<1.8 pg/mL) であることが、AI 起因性骨関節障害を併発する乳癌患者に対する VE 投与が有効であることを示す有用な指標になりうることを初めて見出した。

結論として、VE 投与は AI 使用に伴う骨関節症状の軽減に有用な治療法であると考えられた。乳癌患者の血清中 E2 濃度はこれらの症状に対する VE 療法の効果を予測する、新規の有用なバイオマーカーとなりうる。またこの時、血清中 E2 の閾値濃度を 1.8 pg/mL と設定すれば、AI により引き起こされた骨関節症状に対して VE 療法を行うと効果を得やすい乳癌患者を選定することが可能と思われた。今後、VE が AI 関連性骨関節症状をどのように緩和するのかを解明する作用機序解析のための研究が、乳癌患者の AI 治療を支持する有効かつ安全な薬物療法としての VE 療法をさらに普及していく上で、重要な課題と考える。

## 総合考察

乳癌罹患者は年々増加傾向を辿っている。また、乳癌治療に関わる時間的、経済的、精神的、身体的な負荷は非常に大きく、それらの軽減を目的とした研究が必要と考える。近年、HER2をはじめとするバイオマーカー研究が進んでいるが、依然として患者個々に合った治療の確立は道半ばである。

以上のような背景を踏まえ、第一章では、乳癌患者から摘出した乳癌組織を、TGPゲルを用いて三次元培養し、培養乳癌組織から産生されるTh1/Th2/Th17系サイトカインの特徴や培養上清がヒト免疫系に及ぼす影響について検討した。これらの検討結果から、腫瘍免疫に影響を及ぼす乳癌組織由来因子の解明と、これらの因子をバイオマーカーとした乳癌の個別化医療の推進の可能性について展望した。さらに第二章では、閉経後乳癌治療に併発する骨関節症状に対するvitamin E (VE)の効果と、乳癌治療の副作用軽減を目的としたVE投与の有用性およびその個別化投与推進のためのバイオマーカーを検索することを目的として検討を行った。

これらの検討結果から、乳癌治療における薬物の主作用と副作用の発現に各々係る新たなバイオマーカーを確立し、それに基づく乳癌治療の個別化を推進するための基盤を構築することを目的とし、本研究を行った。

第一章では、TGPを用いて三次元的に培養したヒト乳癌組織が、培養液中にIL-6やIL-10などのTh2系サイトカインを高濃度で分泌することを明らかとした。これらのサイトカインは、Th1細胞免疫に関連する腫瘍免疫を抑制し、腫瘍増殖を促進しているものと考えられた。またIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、およびIL-17Aは三次元培養正常乳腺組織培養上清には検出されなかったことから、乳癌組織に特異的なサイトカインと考えられた。ホルモン受容体陽性癌組織は、本培養系における増殖能が受容体陰性癌組織に比べて低かった。TNF- $\alpha$ は乳癌病期を示すバイオマーカーとなりうることを示唆した。

次に第二章の検討結果から、VEはAI療法に基づく骨関節症状の緩和に有効であることが示された。さらに、血清中のE2濃度は、AI療法に伴う骨関節症状に対するVEの治療応答性を示すバイオマーカーとなり得ることを示唆した。

以上、本研究の結果から、熱可逆性ハイドロゲルであるTGPゲルを用いることで、乳癌患者の生体内に近い環境で患者癌組織の培養が可能であること、癌組織から放出されるある種のサイトカインが癌に特異的であること、およびホルモン受容体の有無により癌組織のTGPゲル内における増殖活性に差があることなどを新規知見として得た。化学療法薬は患者体内のサイトカインバランスを変動させ[46]、腫瘍免疫やがんの増殖に影響を与える。このような化学療法薬の応答性には個人差が大きいことから、個々の患者に適した抗癌薬の選択が求められる。TNF- $\alpha$ は乳癌病期を示すバイオマーカーとして有用と思われた。AI療法の有害事象である骨関節痛の治療にVEが有効であることを、乳癌患者を対象とした本研究にお



いて確認でき、さらには VE 療法が AI による乳癌治療に不利益な影響を及ぼすことなく使用可能であることが示された。本研究結果から、血清中 E2 値に基づく VE 療法に有効な患者の選別が可能となった。乳癌治療を行う上で本来必要な検査の結果を利用して VE 投与が有効な患者を選択できることも利点と考える。これまでに、AI 起因性骨関節症状に対する治療法は確立されておらず、EBM の構築された薬物選択が求められていることは周知の事実である。本知見は、AI 療法の副作用に対応するための EBM の一材となり、さらには AI の継続的投与の一助になるものと思われる。

このように本研究により得られた知見は、乳癌治療薬の作用および副作用の両面において、個々の患者にテーラーメイドの対応を施すための極めて有用な情報を提供するものと考えられた。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成に関して、終始ご懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部 臨床薬理学教室 平野俊彦教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に関し、終始御指導ご鞭撻を賜りました、日本医科大学武蔵小杉病院 乳腺外科 蒔田益次郎教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に関し、数多くの御指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部 臨床薬理学教室 杉山健太郎准教授、恩田健二講師、田中祥子助教に深謝いたします。

本研究遂行にあたり、検体をご提供して下さいました被験者の方々に心より厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力頂きました、東京薬科大学薬学部 臨床薬理学教室 里村藍子氏、原幸稔氏、寒河江美涛氏、三砂慶太氏、尾関智子氏、李娜氏、白戸達介氏、藤美和子氏、番場麻菜美氏、藤原奈央氏、六川奈生氏をはじめ、同臨床薬理学教室の皆様心より厚く御礼申し上げます。

最後に、著者の学生生活および研究活動を温かく見守り、絶えず支援して下さいました家族に心より感謝いたします。

## 引用文献

1. がん対策情報センター (2015) がん情報サービス「最新がん統計」  
[http://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
2. 日本乳癌学会, 乳癌診療ガイドライン 1 治療編, 2015 年度版
3. Khanduri S and Dodwell DJ. Aromatase inhibitors and musculoskeletal symptoms. *The Breast*. 2008; 17: 78-81.
4. Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21: 137-148.
5. Wilson J and Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12: 113-120.
6. Balkwill F and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-545.
7. Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, and Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer*. 1997; 75: 1826-1830.
8. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, and Dubinett SM. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*. 1995; 55: 3847-3853.
9. Green AR, Green VL, White MC, and Speirs V. Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours. *Int J Cancer*. 1997; 72: 937-941.
10. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, Weytjens R, Vermeulen PB, and Dirix LY. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2002; 2: 311-315.
11. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, and Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2003; 48: 82-84.
12. Knüpfer H and Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer. Review. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 102: 129-135.
13. Moscona A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res*. 1961; 22: 455-475.
14. O'Keane JC, Kupchik HZ, Schroy PC, Andry CD, Collins E, and O'Brien MJ. A three-dimensional system for long-term culture of human colorectal adenomas. *Am J Pathol*. 1990; 137: 1539-1547.

15. Carlsson J, Nilsson K, Westarmark B, Ponten J, Sundstrom C, Larsson E, Bergh J, Pahlman S, Busch C, and Collins VP. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *Int J Cancer*. 1983; 31: 523-553.
16. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassel JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, and Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*. 1986; 25: 312-318.
17. Lawler E, Miller FR, and Heppner GH. Significance of three-dimensional growth patterns of mammary tissues in collagen gels. *In Vitro*. 1983; 19: 600-610.
18. Tsukikawa S, Matsuoka H, Kurahashi Y, Konno Y, Satoh K, Satoh R, Isogai A, Kimura K, Watanabe Y, Nakano S, Hayashi J, and Kubota S. A new method to prepare multicellular spheroids in cancer cell lines using a thermo-reversible gelation polymer. *Artif Organs*. 2003; 27: 598-604.
19. Urazumi K, Kimijima I, Fukushima T, Nakayama K, Kiman K, Tsuchiya A, and Abe R. Different growth rate and contracting activity of collagen gel between fibroblasts from breast cancer tissue and normal breast tissue. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1993; 94: 501-504. [Article in Japanese]
20. The Cancer Genome Atlas. <http://www.cbioportal.org/index.do>
21. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, and Hall BM. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J*. 2007; 13: 3763-3770.
22. Zhang YM, Mao YM, and Sun YX. Genetic polymorphisms of IL-6 and IL-10 genes correlate with lung cancer in never-smoking Han population in China. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 1051-1058.
23. Filipova A, Seifrtova M, Mokry J, Dvorak J, Rezacova M, Filip S, and Diaz-Garcia D. Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review. *Tumori*. 2014; 100: 363-369.
24. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, and Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 1397-1402.
25. Dontu G, Liu S, and Wicha MS. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev*. 2005; 1:207-213.
26. Fillmore C and Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res*. 2007; 9: 303.
27. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, and Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105-111.
28. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr., Badve S, and Nakshatri H. CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006; 8: R59.
29. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, and Bonafè M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest*.

- 2007; 12: 3660-3663.
30. Moore KW, O'garra A, Malefyt RW, Vieira P, and Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 165-190.
  31. Coussens LM, and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420: 860-867.
  32. Kim HS, Lee JH, Han HD, Kim AR, Nam ST, Kim HW, Park YH, Lee D, Lee MB, Park YM, Kim HS, Kim YM, You JC, and Choi WS. Autocrine stimulation of IL-10 is critical to the enrichment of IL-10-producing CD40hiCD5<sup>+</sup> regulatory B cells in vitro and in vivo. *BMB Rep.* 2015; 48: 54-59.
  33. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, and Biragyn A. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2011; 71: 3505-3515.
  34. Bu M, Shen Y, Seeger WL, An S, Qi R, Sanderson JA, and Cai Y. Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8<sup>+</sup> T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression. *Tumour Biol.* 2015 Oct 19. [Epub ahead of print]
  35. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 329-333.
  36. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong CH, Schneider E, Dy M, and Leite-de-Moraes MC. Identification of an IL-17-producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med.* 2007; 204: 995-1001.
  37. Tajima M, Wakita D, Noguchi D, Chamoto K, Yue Z, Fugo K, Ishigame H, Iwakura Y, Kitamura H, and Nishimura T. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD81T cells. *J Exp Med.* 2008; 205: 1019-1027.
  38. Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, Vacca C, Bistoni F, Fioretti MC, Grohmann U, Segal BH, and Puccetti P. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature.* 2008; 451: 211-215.
  39. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, and Sasaki H. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol.* 2005; 175: 6177-6189.
  40. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, and Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature.* 2006; 442: 461-465.
  41. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, and Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 1927-1937.
  42. Grivennikov S and Karin M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer*

- Cell*. 2008; 13: 7-9.
43. Cao Z, Xu X, Luo X, Li L, Huang B, Li X, Tao D, Hu J, and Gong, J. Role of RANTES and its receptor in gastric cancer metastasis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011; 31: 342-347.
  44. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, Vernes JM, Jiang Z, Meng YG, Peale FV, Ouyang W, and Ferrara N. An interleukin-17–mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Med*. 2013; 19: 1114-1123.
  45. Sakata H, Murakami S, and Hirayama R. Serum soluble interleukin-2 receptor (IL-2R) and immunohistochemical staining of IL-2R/Tac antigen in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2002; 7: 312-317.
  46. Cheung YT, Ng T, Shwe M, Ho HK, Foo KM, Cham MT, Lee JA, Fan G, Tan YP, Yong WS, Madhukumar P, Loo SK, Ang SF, Wong M, Chay WY, Ooi WS, Dent RA, Yap YS, Ng R, and Chan A. Association of proinflammatory cytokines and chemotherapy-associated cognitive impairment in breast cancer patients: a multi-centered, prospective, cohort study. *Ann Oncol*. 2015; 26: 1446-1451.
  47. Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, and Bromberg J. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2014; 15: 848-862.
  48. Howell WM and Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer*. 2006; 5: 143-149.
  49. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CM, Pryer N, Daniel D, Hwang ES, Rugo HS, and Coussens LM. Macrophage IL-10 blocks CD8(+) T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014; 26: 623-637.
  50. Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, and Boulamatsis D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer*. 2002; 87: 21-27.
  51. Murugaiyan G and Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol*. 2009; 183: 4169-4175.
  52. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, and Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2007; 178: 6730.
  53. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, Laurence A, Michalowska A, Mamura M, Lonning S, Berzofsky JA, and Wakefield LM. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res*. 2008;

- 68: 3915.
54. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, Carter RD, Rivkin SE, Borst JR, and Belt RJ. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective southwest oncology group study. *J Clin Oncol.* 1992; 10: 1284-1291.
  55. Bardou V, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, and Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 1973-1979.
  56. Stanilov N, Miteva L, Dobрева Z, and Stanilova S. Colorectal cancer severity and survival in correlation with tumor necrosis factor-alpha. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014; 28: 911-917.
  57. Hamed EA, Zakhary MM, and Maximous DW. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138: 999-1009.
  58. Harold J. Burstein. Aromatase inhibitor -associated arthralgia syndrome. *The Breast.* 2007; 16: 223-234.
  59. Tappel AL. Lipid Peroxidation Damage to Cell Components. *Fed Proc.* 1973; 32: 1870-1874.
  60. Makita M, Takahashi S, Morizono H, Kimura S, Iijima K, Miyagi Y, Nishimura S, Tada K, Tokudome H, Ito Y, and Iwase T. Nyuugan Jyutsugo Kanjya no Aromatase Sogaizai niyoru Kansetsushoujyou ni taisuru Vitamin E no yuuyousei. *Nyugan no Rinshou.* 2008; 23: 413-416. [Article in Japanese]
  61. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, and Kato S. Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor  $\alpha$  and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell.* 2007; 130: 811-823.
  62. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, and Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS ONE.* 2012; 7: e44552. doi: 10.1371/journal.pone.0044552.
  63. DeSelm CJ, Takahata Y, Warren J, Chappel JC, Khan T, Li X, Liu C, Choi Y, Kim YF, Zou W, and Teitelbaum SL. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 2895-2902.
  64. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007; 28: 521-574.
  65. Salinthon S, Kerns AR, Tsang V, and Carr DW.  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E) stimulates cyclic AMP production in human peripheral mononuclear cells and alters immune function. *Mol Immunol.* 2013; 53: 173-178.
  66. Singh U and Devarai S. Vitamin E: inflammation and atherosclerosis. *Vitam Horm.* 2007; 76: 519-549.
  67. Devarai S, Tang R, Adams -Huet B, Harris A, Seenivasan T, de Lemos JA, and Jialal I. Effect of

- high -dose  $\alpha$  -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 1392-1398.
68. Jiang Q, Yin X, Lill MA, Danielson ML, Freiser H, and Huang J. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; 105: 20464-20469.
69. Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, Taketani K, Negishi - Koga T, Sunamura S, Kodama T, Takayanagi H, Tamai H, Kato S, Arai H, Shinomiya K, Itoh H, Okawa A, and Takeda S. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast function. *Nat Med.* 2012; 18: 589-594.
70. Muhammad N, Luke DA, Shid AN, Mohamed N, and Soelaiman IN. Two different isomers of vitamin E prevent bone loss in postmenopausal osteoporosis rat model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 161527. doi: 10.1155/2012/161527.
71. Zhao Z, Mai Z, Ou L, Duan X, and Zeng G. Serum Estradiol and Testosterone Levels in Kidney Stones Disease with and without Calcium Oxalate Components in Naturally Postmenopausal Women. *PLoS One.* 2013; 8: e75513. doi: 10.1371/journal.pone.0075513.
72. Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM II, Kolls JK, Pope RM, and Shahrara S. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2010; 184: 3233-3241.
73. Moon SJ, Ahn IE, Jung H, Yi H, Kim J, Kim Y, Kwok SK, Park KS, Min JK, Park SH, Kim HY, and Ju JH. Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis. *Int J Mol Med.* 2013; 31: 769-777.
74. DeSelm CJ, Takahata Y, Warren J, Chappel JC, Khan T, Li X, Liu C, Choi Y, Kim YF, Zou W, and Teitelbaum SL. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 2895-2902.