

氏名（本籍）	<small>きよみ</small> 清海 <small>あんな</small> 杏奈（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 269 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 教授 平野 俊彦 教授 平塚 明 教授 山田 安彦

## 論文内容の要旨

乳癌治療に関わる患者の時間的，経済的，精神的，および身体的な負荷は非常に大きい．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および維持が必要となる．乳癌治療の個別化は，その目的を達成するためにも重要である．乳癌治療の個別化は，HER2をはじめとするバイオマーカー研究によって進歩したが，標的分子が特定困難な乳癌の化学療法においては，依然として個々の患者に合った治療法の確立が待たれる．

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．中でも，癌が自らサイトカインを放出し，腫瘍免疫を減弱させる報告や，いくつかのサイトカイン量の増加が，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．以上より，サイトカインは癌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，さらには乳癌治療のバイオマーカーとしても有用と思われる．一方，乳癌治療薬の中で，アロマターゼ阻害薬（AI）は閉経後ホルモン感受性乳癌患者の治療に用いられる．AIは，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，結果として日常生活の行動を制限し 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．しかしながら，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．

以上のような背景を踏まえ，本研究の第一章では，乳癌患者から抽出した乳癌組織を，Thermoreversible gelatin polymer（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

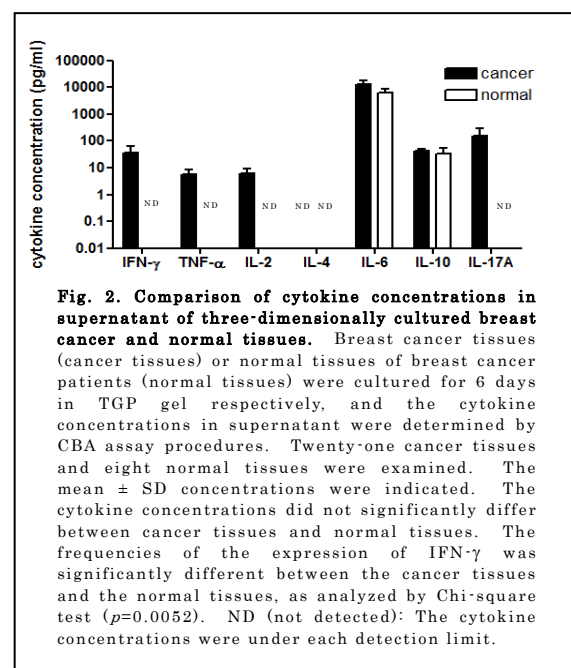
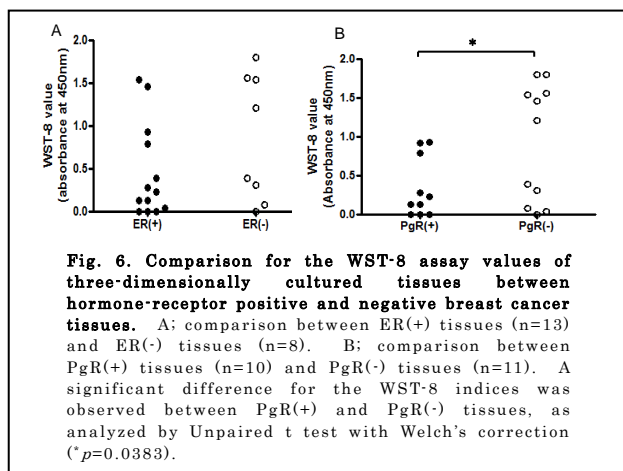
進の可能性について展望した。さらに第二章では、閉経後乳癌治療に併発する骨関節症状に対する vitamin E (VE) の効果と、乳癌治療の副作用軽減を目的とした VE 投与の有用性およびその個別化投与推進のための免疫内分泌系バイオマーカーを検索した。

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本研究の目的とした。

\*「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。

## 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

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もしく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、そ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。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 (Fig. 2)。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 (Fig. 2) 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。次に、乳癌組織をホルモン受容体の有無で二群に分け、その増殖

**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		total
		Higher	Lower	
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 (\* $p=0.0306$ ).

能を比較した。ホルモン受容体陽性癌組織は、受容体陰性癌組織に比べて増殖能が低かった (Fig. 6, Table 3)。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唆した。また、患者を乳癌病期である TNM 分類によりステージ IIA または IIB 以上の 2 群に分け、その群間で三次元培養後の各種サイトカイン産生の有無に

ついて頻度解析を行った。IIB 以上の患者では TNF- $\alpha$ 産生の頻度が有意に高かった (Table 4)。これより、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 (Fig. 6, Table 3)。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唆した。また、患者を乳癌病期である

TNM 分類によりステージ IIA または IIB 以上の 2 群に分け、その群間で三次元培養後の各種サイトカイン産生の有無について頻度解析を行った。IIB 以上の患者では TNF- $\alpha$ 産生の頻度が有意に高かった (Table 4)。これより、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。

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

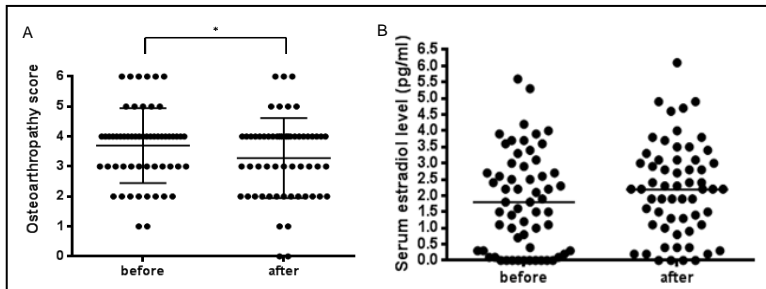
The incidence of cytokine in cultured cancer tissue		TNM stage			P value
		Stage IIA	Over stage IIB	Total	
IFN- $\gamma$	Positive	7	4	11	$p>0.05$
	Negative	7	2	9	
TNF- $\alpha$	Positive	3	5*	8	* $p=0.0096$
	Negative	11	1	12	
IL-2	Positive	4	3	7	$p>0.05$
	Negative	10	3	13	
IL-4	Positive	0	0	0	not analyzed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

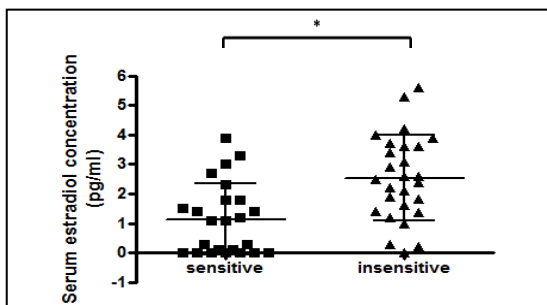
On the other hand, the patients were divided into the stage IIA and over stage IIB groups. Then, the statistical analysis was performed by Chi-square test for the incidence of cytokine production from their three-dimensionally cultured cancer tissues into culture medium. The patients with stages over 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

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検討した。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



**Fig. 8. Osteoarthritis scores (n=51) 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.



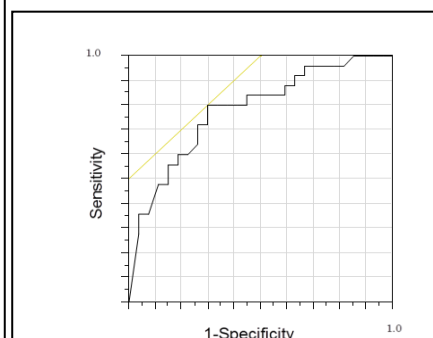
**Fig. 11. Comparison of serum estradiol concentrations between vitamin E sensitive or insensitive patients.** Serum estradiol concentrations, before administration of vitamin E, were compared between the vitamin E responsive patients (sensitive;  $n=24$ ) and the vitamin E unresponsive patients (insensitive;  $n=27$ ). 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)		Total
	Low: $1.8 \geq$	High: $1.8 <$	
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 osteoarthritis 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 osteoarthritis caused by aromatase inhibitor (\* $p=0.0004$ ).

ル酢酸エステルとして) を 150 mg/日, 経口摂取した. また, VE 投与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. 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 (Fig. 8A). また, 血清中の平均エストラジオール (E2) 濃度は, VE 投与後に有意な変動はなかった (Fig. 8B). VE の骨関節症状緩和効果が認められた患者 (感受性群) と効果のなかった患者 (非感受性群) 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 (Fig. 11). 次に, VE 投与前の血清中 E2 値が低値を示した群 ( $\leq 1.8$  pg/mL) と, 血清中 E2 値が高値を示した群 ( $> 1.8$  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 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



**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).

患者の割合が有意に高かった (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 解析で求めた曲線下面積が

0.78074 であったことから明らかとなった (Fig. 12). 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 (Fig. 12)．以上より，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．

## 総合考察

第一章の結果から，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数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，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．

第二章の結果より，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．また，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．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．

### 【研究結果の掲載誌】

- (1) *Transl Oncol.* 2015; 8(4): 318-326.
- (2) *J Cancer.* 2015; 6(4): 367-376.

## 論文審査の結果の要旨

乳癌治療に関わる患者の時間的、経済的、精神的、および身体的な負荷は非常に大きく、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および維持が必要となる。乳癌治療の個別化は、その目的を達成するためにも重要である。乳癌治療の個別化は、HER2をはじめとするバイオマーカー研究によって進歩したが、標的分子が特定困難な乳癌の化学療法においては依然として個々の患者に合った治療法の確立が待たれる。

清海杏奈氏の博士学位論文は、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ている。

本論文の第一章では、乳癌患者から摘出した乳癌組織を、*thermoreversible gelatin polymer (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ビタミン E の効果と、乳癌治療の副作用軽減を目的としたビタミン E 投与の有用性およびその個別化投与推進のための免疫内分泌系バイオマーカーを検索した。

まず第 1 章では、TGP ゲル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、三次元培養乳癌組織の培養上清に検出され正常乳腺組織培養上清には認められないことから、これらが癌に特異的なサイトカインであることを示唆した。またホルモン受容体陰性乳癌組織が、三次元培養系において進行性に増殖できることを示した。さらに、病期が IIA 以上の患者より得た癌組織では TNF- $\alpha$  産生の頻度が有意に高いことから、TNF- $\alpha$  が乳癌病期を示すバイオマーカーとなり得ることを示した。

第 2 章では、閉経後乳癌患者におけるアロマターゼ阻害薬起因性骨関節症状に対するビタミン E 投与の有効性、およびビタミン E 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検討した。ビタミン E はアロマターゼ阻害薬に基づく骨関節症状の緩和に有効であり、またビタミン E 投与は、血清中のエストラジオール濃度に有意な変動を与えないことを示した。さらに患者の血清エストラジオール濃度が、アロマターゼ阻害薬に由来する骨関節症状に対するビタミン E の有効性を示すバイオマーカーとなり得ることを示唆した。

以上本研究内容は、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。

このように本論文は、臨床的に価値のある種々の内容を含んでおり、博士（薬学）の学位に十分値するものと判断した。