

乳癌における抗癌剤治療の奏功性を 規定する因子についての研究

岩田 亨*

REVIEW ARTICLE

W'Waves

乳癌は全身的な疾患であるとされ、治療上、抗癌剤療法が担う役割は大きい。とりわけ進行・再発例の病像は多様で、良好な quality of life を得るためには抗癌剤治療の奏功性を規定する因子を検索し、明確な適応基準を確立する必要がある。

最近の研究では種々の抗癌剤が癌細胞の apoptosis を誘導することが報告されている^{1,2)}。これまでに筆者らは進行・再発乳癌に対して *in vitro* sensitivity に基づく抗癌剤治療を行ってきた。

今回の検討では *in vitro* sensitivity と組織学的効果の比較、抗癌剤治療前後での *in vitro* sensitivity の変化、治療後の残存癌細胞における apoptosis の変化について検討した。

対象と方法

1999年3月までに治療された乳癌症例230例中、局所進行例で術前化学療法が行われ抗癌剤治療の前後で組織学的検索が行われた7例を対象とした。

(1) *in vitro* sensitivity

感受性試験は3-(4,5-dimethyl-1-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H tetrazolium bromide (MTT) assay を用いた succinate dehydrogenase inhibition test (SDI 法) で行った³⁾。方法は、まず組織生検を行い、癌組織を細切して癌細胞浮遊液を作製した。細胞数を 1×10^4 /ml に調整し抗癌剤投与

群と対照群に分け、37°C 5% CO₂ 条件下 ASF 301 培地 (味の素) 中で培養した。抗癌剤はアドリアマイシン (ADM)、シスプラチン (CDDP)、5-FU、ラステット (VP 16)、メソトレキセート (MTX) について検討し、濃度は臨床常用量を静脈内投与した場合の最高血中濃度の10倍 (ADM; 4 µg/ml, CDDP; 20 µg/ml, 5-FU; 100 µg/ml, VP 16; 100 µg/ml, MTX; 4 µg/ml) とした。72時間培養後、上清を除去し 0.1 mol/l sodium succinate と 0.4% MTT をおのおの 100 µl を加えた。さらに3時間培養した後に上清を除去し、50% DMSO/2 N KOH 溶液で生細胞中の formazan を溶出し、565 nm における吸光度を測定して酵素活性を定量化した。無処置群の酵素活性に対する抗癌剤投与群の酵素活性の100分率比を算出した。感受性試験は抗癌剤治療の前後で行い *in vitro* sensitivity を比較した。

(2) 抗癌剤治療

抗癌剤治療では ADM 20 mg/m² を 10~14 日間隔で3クール投与した。最終治療後約4週で再切除を行った。

(3) 組織学的検索

ホルマリン固定標本を用いて抗癌剤治療前後での組織学的効果および癌細胞の apoptosis の変化を検索した。組織学的効果はヘマトキシリン-エオジン染色、400倍、10視野での癌細胞数の平均値を計測し、抗癌剤治療前の細胞数に対する治療後の細胞数を百分率として表した。Apoptosis は TUNEL 法⁴⁾ による免疫組織染色で検索した。

* 長崎大学医学部第二外科学教室

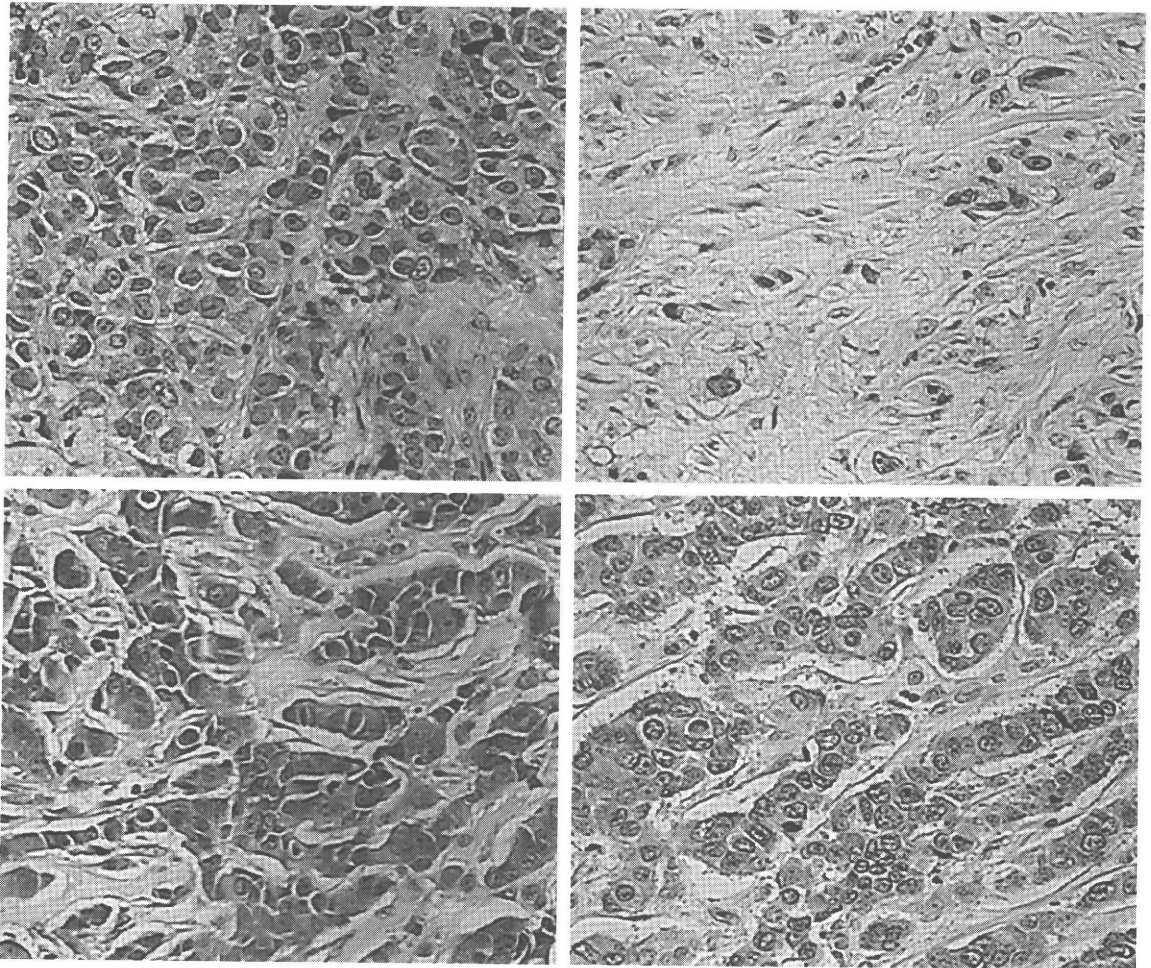


図 1 抗癌剤治療前後での組織学的変化
上段：症例 1 左；治療前，右；治療後
下段：症例 2 左；治療前，右；治療後

Apoptotic index (AI) として 400 倍，10 視野での癌細胞中の apoptosis 陽性細胞数を百分率として計測し，抗癌剤治療前の AI に対する治療後の AI を比較した。

結 果

2 症例の抗癌剤治療前後における組織学的変化を図 1 に例示した。症例 1, 2 の ADM に対する酵素活性比はおのおの 40%，80%であった。また抗癌剤治療後には ADM に対する SD 比は全例で増大し，治療に使用されなかった薬剤についても治療後には SD 比の増大を認めた (図 2)。また全症例における *in vitro* sensitivity, 抗癌剤治療後の

癌細胞数の変化および AI の変化 (図 3) では，各症例において治療前の ADM に対する SD 比は治療後の残存癌細胞数と強い相関性を示した。一方治療前の *in vitro* sensitivity と治療前後での AI の変化との間には相関性は認められなかった。

考 察

乳癌細胞の抗癌剤に対する感受性は癌細胞の mitotic index⁵⁾，細胞増殖周期の S 期分画⁶⁾，p 53^{7,8)} の影響を受けると報告されている。また最近の研究では各種の抗癌剤によって癌細胞の apoptosis が誘導されることが明らかにされている^{1,2,9)}。特に p 53 は mutant type の過剰発現は，

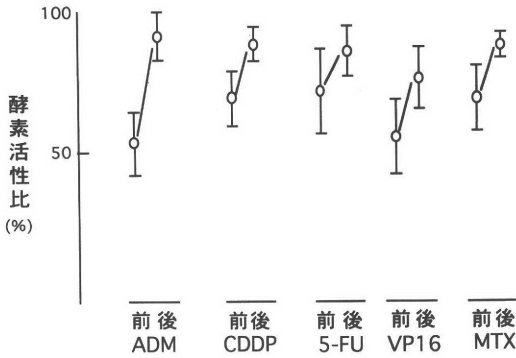


図2 抗癌剤治療前後での *in vitro* sensitivity の変化

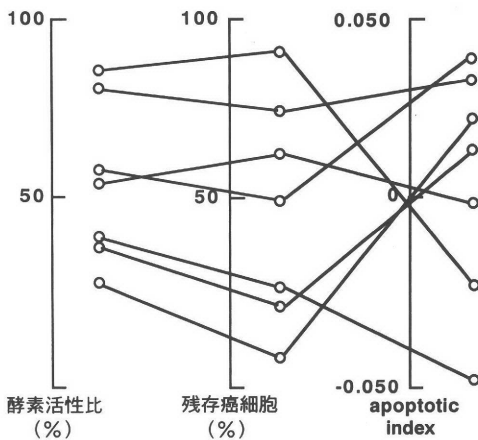


図3 *In vitro* sensitivity と抗癌剤治療前後での癌細胞数, apoptotic index の変化

p53 を介さない programmed cell death を阻害¹⁰⁾ し、一方 wild type の p53 は MDR1 の発現を増加させ¹¹⁾、ADM に対する感受性を低下させると思われる。今回の研究結果は乳癌細胞の ADM に対する感受性の高低は治療後の apoptosis を予測するうえで有用でないことを示しており、このことは apoptosis を阻害する bcl-2 gene の発現は ADM を含む抗癌剤治療の奏功性を予測し得なかったとする臨床報告¹²⁾ を裏づけるものであると思われる。

本研究では ADM に対する感受性は治療後の残存癌細胞数をよく反映していた。また残存癌細胞は ADM のみならず他の薬剤に対しても感受性の低い細胞群であった。このことから ADM の併用薬剤を選択する場合、感受性の高低にかかわらず残存癌細胞に apoptosis の増大を生じる薬剤

を選択することが重要であると思われた。

結論

In vitro sensitivity は抗癌剤による short term の奏功性を予測するうえで有用である。また抗癌剤治療によって残存癌細胞における apoptosis が変化するがその程度は *in vitro* sensitivity とは相関せず抗癌剤治療の奏功性を規定する独立した因子であると思われる。

文献

- 1) Micheau O, Hammann E, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the fas death pathway by anticancer drugs. J Biol Chem, 19: 7987-7992, 1999.
- 2) Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM. Molecular ordering of apoptosis induced by anti-cancer drugs in neuroblastoma cells. Cancer Res, 58: 4453-4460, 1998.
- 3) Iwata T, Kanematsu T. Etoposide enhances the lethal effect of radiation on breast cancer cells with less damage to mammary gland cells. Cancer Chemother Pharmacol, 43: 284-286, 1999.
- 4) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol, 119: 493-501, 1992.
- 5) Akahashi-Tanaka S, Tsuda H, Furukawa H, Watanabe T, Fukutomi T. Prognostic value of histopathological therapeutic effects and mitotic index in locally advanced breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. Jpn J Clin Oncol, 26: 201-206, 1996.
- 6) Gamel JW, Meyer JS, Province MA. Proliferative rate by S-phase measurement may affect cure of breast carcinoma. Cancer, 76: 1009-1018, 1995.
- 7) Ellege RM, Gray R, Mansour E, Yu Y, Clark GM, Ravdin P, Osborne CK, Gilchrist K, Davidson NE, Robert N, Tormey DC, Allred DC. Accumulation of p53 protein as a positive predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil and prednisone for breast cancer. J Natl Cancer, 87: 1254-1256, 1995.
- 8) Jacquemier J, Penault-Llorca F, Viens P, Houvenaghel G, Hassoun J, Torrente M, Adelaide J, Birnbaum D. Breast cancer response to adjuvant chemotherapy in correlation with erbB2 and p53 expression. Anticancer Res, 14: 2773-2778, 1994.
- 9) Mizutani Y, Yoshida O, Bonavida B. Sensitization of human bladder cancer cells to Fas-mediated cytotoxicity by cis-diaminedichloroplatinum (II). J Urol, 160: 561-570, 1998.
- 10) Li R, Sutphin PD, Schwartz D, Matas D, Almog N, Wolkowicz R, Goldfinger N, Pei H, Prokocimer M, Rotter V. Mutant p53 protein expression inter-

- feres with p 53-independent apoptotic pathways. *Oncogene*, 25 : 3269-3277, 1998.
- 11) Li ZH, Zhu YJ, Lit XT. Wild-type p 53 gene increases MDR 1 gene expression but decreases drug resistance in an MDR cell line KBV 200. *Cancer Lett*, 11 : 177-184, 1997.
- 12) van Slooten HJ, Claesen PC, Dierendonck JH, Duval C, Pallud C, Mandart AM, Delobelle-Deroide A, Velde CJH, Vijver MJ. Expression of bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer*, 74 : 78-85, 1996.