

◀ **Fig. 1** Map of the 5′-flanking region of *REIC/Dkk-3* and the bisulfite genomic DNA sequence. Upper figure demonstrates the promoter region of *REIC/Dkk-3*. Gray bars indicate exons, and the bent arrow indicates the transcription start site (TSS) (+1). Thin vertical lines on the horizontal line indicate the sites of CpG dinucleotides. Arrow heads indicate the restriction sites of BstUI. COBRA primer sets are indicated by pairs of bold arrows. Dark gray bar under the COBRA primer sets indicates RRCOBRA. Methylation status of individual subcloned DNA fragments of each cell line is shown below. Each circle represents a CpG dinucleotide in 5′-flanking region of *REIC/Dkk-3* (for −213 to +205 nt). The numbers at the top indicate the CpG dinucleotide in the RRCOBRA (from 5′ to 3′). These numbers correspond to those depicted in upper figures. Open circle represents non-methylated CpG dinucleotide. Black circle represents methylated CpG dinucleotide

cell lines (MDA-MB-231) with 5-aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-CdR) at the concentration of 5 and 8 μM for 6 days with medium changes on days 1, 3, and 5. Treated and untreated cells from individual triplicate flasks were harvested on day 6 to determine the *REIC/Dkk-3* type-a expression using RT-PCR.

ER, PgR, and HER2 status in primary breast cancers

Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), and HER2 status in primary breast cancers were obtained from patient medical records. HER2 positive was defined as a score of 2+ and 3+ by immunohistochemistry.

Statistical analyses

The frequencies of *REIC/Dkk-3* methylation between two groups were compared using the Fisher's exact test or Mann–Whitney's *U* test when appropriate. Probability value less than 0.05 was defined as being statistically significant. All data were analyzed by JMP9 for Windows (SAS Institute, Cary, NC).

Results

DNA methylation status in the promoter region of *REIC/Dkk-3* type-a

The results of bisulfite genomic DNA sequencing of RRCOBRA are shown in Fig. 1. Each CpG in the 5′-flanking region and in exon1a was heavily methylated in MCF7, MDA-MB-231, and ZR75-1. The CpGs in the 5′-flanking region of exon1a were lightly to moderately methylated, but the CpGs in exon1a were rarely methylated in HCC1806 and HCC1599. In contrast, most of the CpGs were rarely methylated in H1299.

We performed the linear regression analysis using the nested qCOBRA and confirmed the quantitative capacity (data not shown). Representative examples of the COBRA

assay in breast cancer cell lines are shown in Fig. 2a. The percentages of *REIC/Dkk-3* type-a methylation were calculated by qCOBRA in each cell line and primary tumor (Fig. 2b, c, respectively) and summarized in Table 1. We decided the samples with more than 10% of digested bands as methylation positive in this study. Aberrant methylation was detected in 7 of the 7 (100%) breast cancer cell lines, 16 of the 37 (43.2%) primary breast cancers, 5 of the 11 (45.4%) lung cancer cell lines, 11 of the 42 (26.2%) primary lung cancers, 0 of 4 (0%) MPM cell lines, 7 of the 27 (25.9%) USA primary MPMs, 7 of the 18 (38.9%) Japanese primary MPMs, 8 of the 21 (38.1%) primary gastric cancers, and 10 of the 20 (50.0%) primary colon cancers. *REIC/Dkk-3* methylation was not detected in 10 normal breast tissues and 10 normal lung tissues (data not shown). The methylation of *REIC/Dkk-3* type-a in the breast cancer cell lines was more frequent than that in the lung, MPM, and prostate cancer cell lines ($p = 0.02$, $p = 0.01$, and $p = 0.04$, respectively). However, no significant differences in methylation were observed among the primary breast, lung, MPMs, gastric, and colon cancers (Fig. 2c). The results of qCOBRA in five breast cancer cell lines and a lung cancer cell line (H1299) corresponded with the results of bisulfite sequencing.

REIC/Dkk-3 mRNA expression in cell lines and correlation with qCOBRA assay

Representative example of RT-PCR for *REIC/Dkk-3* type-a and type-b in the breast cancer cell lines was shown in Fig. 2d. Expression of *REIC/Dkk-3* type-a was only detected in HCC1599 and HCC1806 cells, which rarely to moderately harbored *REIC/Dkk-3* methylation. Expression of *REIC/Dkk-3* type-b was also detected in HCC1599 and HCC1806 cells. The results of expression of *REIC/Dkk-3* type-a and type-b in all cell lines ($n = 28$) were summarized in Table 2. There was a correlation between the expression of *REIC/Dkk-3* type-a and type-b ($p < 0.01$). The relative expressions of *REIC/Dkk-3* type-a mRNA and the percentages of *REIC/Dkk-3* type-a methylation are shown in Fig. 3. The expression of *REIC/Dkk-3* type-a and *REIC/Dkk-3* type-a methylation was inversely correlated in the cell lines that were examined ($p < 0.01$). To confirm that methylation was responsible for the gene silencing, heavily methylated MDA-MB-231 cells were treated with 5-Aza-CdR. *REIC/Dkk-3* type-a mRNA expression was restored by the treatment of 5-Aza-CdR in a dose-dependent manner (Fig. 4).

REIC/Dkk-3 methylation and clinicopathological correlation

We next examined the relationships between the *REIC/Dkk-3* methylation status and the clinicopathological

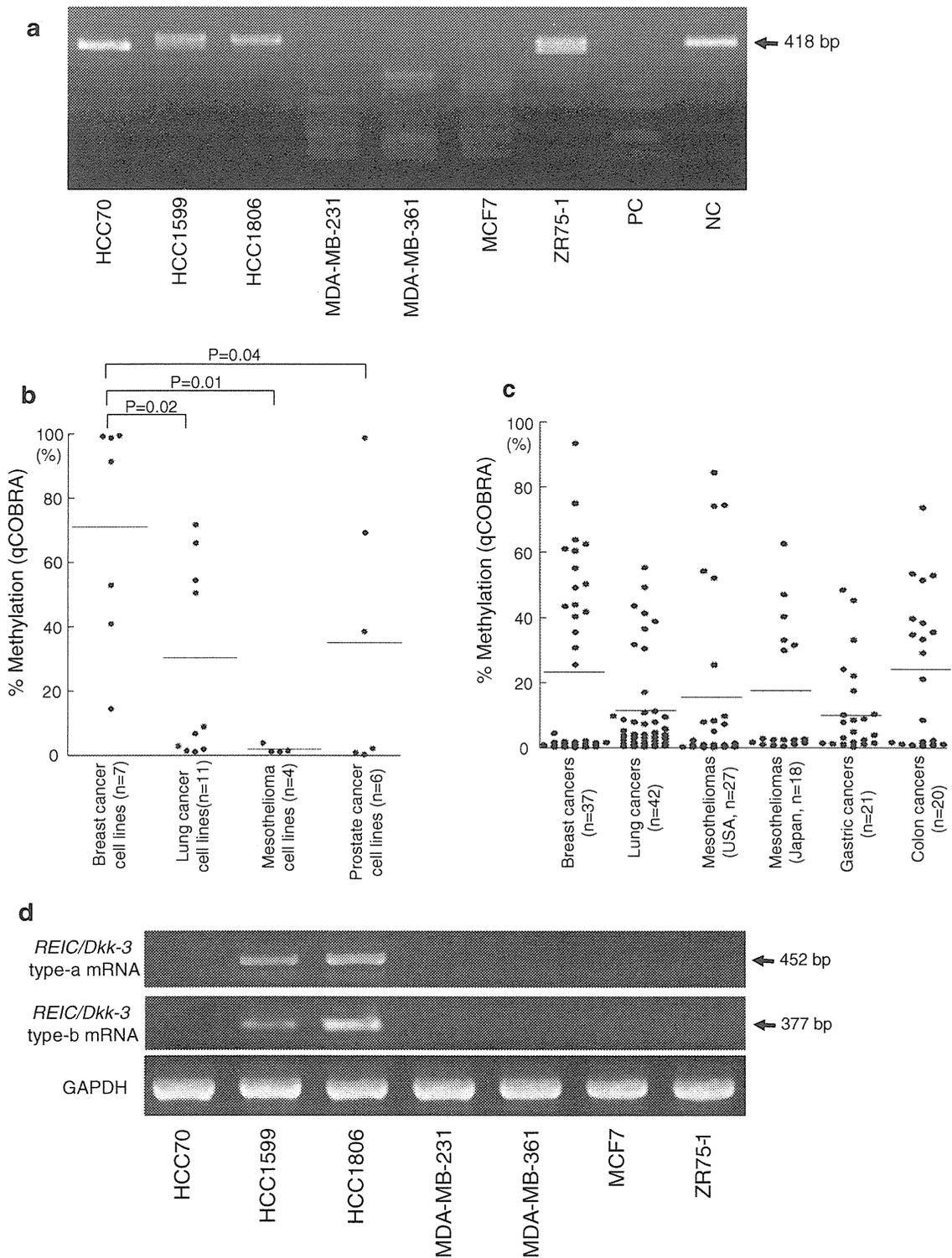


Fig. 2 Quantitative COBRA assay. The results of COBRA assay for *REIC/Dkk-3* type-a in breast cancer cell lines were shown in **a**. Methylated alleles were fragmented with restriction enzyme modification, and unmethylated alleles were uncut. Percentages of digested band in cell lines (**b**) and primary tumors (**c**) were quantitated by NIH

ImageJ 1.37 V software. The *horizontal bars* indicate the average in each group. The mRNA expression of *REIC/Dkk-3* type-a and type-b in breast cancer cell lines was shown in **d**. *PC* universal methylated DNA as positive control; *NC* universal unmethylated DNA as negative control

Table 1 Rate of *REIC/Dkk3* methylation in each human cancer by quantitative COBRA assay

Organ	Number of <i>REIC/Dkk3</i> methylated sample (%)	
	Cell lines	Primary tumors
Breast cancer	7 of 7 (100%)	16 of 37 (43.2%)
Lung cancer	5 of 11 (45.4%)	11 of 42 (26.2%)
Malignant pleural mesothelioma		
USA	0 of 4 (0%)	7 of 27 (25.9%)
Japanese	ND	7 of 18 (38.9%)
Gastric cancer	ND	8 of 21 (38.1%)
Colon cancer	ND	10 of 20 (50.0%)
Prostate cancer	3 of 6 (50%)	ND

ND not determined

factors described in Table 3. For the breast cancers, we observed that ER-positive cases were more common in the methylated group than in the non-methylated group ($p = 0.03$). No significant relationships between *REIC/Dkk-3* methylation and the other clinicopathological factors were observed.

Discussion

In this study, we demonstrated that arbitrary CpG methylation in *REIC/Dkk-3* type-a promoter region was frequently observed in solid malignancies. Regarding qCOBRA in this study, we confirmed the accuracy of this assay by linear regression analysis because we performed nested PCR. We decided the samples with more than 10% of digested bands as methylation positive to maintain compatibility with conventional COBRA assay, as we could distinguish 10% of digested band on the agarose gel electrophoresis. Colella et al. (2003) also used a 10% threshold to declare methylation when qCOBRA was compared with pyrosequencing methylation analysis. So a 10% threshold seems to be reasonable criteria to distinguish methylation positive. We examined cell lines using qCOBRA assay, and the accuracy of the qCOBRA was also confirmed by bisulfate genomic DNA sequencing and linear regression analysis.

The *REIC/Dkk-3* type-a methylation, which was determined using qCOBRA assay, revealed to be inversely correlated with the *REIC/Dkk-3* type-a mRNA expression among the cell lines ($p < 0.01$), and the restoration of *REIC/Dkk-3* type-a expression by 5-Aza-CdR treatment was observed in a *REIC/Dkk-3* type-a methylated cell line. These results indicate that DNA methylation of *REIC/Dkk-3* type-a was responsible for silencing *REIC/Dkk-3* type-a expression. As reported previously, we confirmed that there was a correlation between *REIC/Dkk-3* type-a expression

Table 2 Expression of *REIC/Dkk-3* type-a and type-b in various cancer cells

Organ	mRNA expression	
	Type-a	Type-b
<i>Breast cancers</i>		
HCC70	–	–
HCC1599	+	+
HCC1806	+	+
MDA-MB-231	–	–
MDA-MB-361	–	–
MCF7	–	–
ZR75-1	–	–
<i>Lung cancers</i>		
H23	+	–
H44	–	–
H125	+	–
H157	+	+
H1299	+	+
H1819	+	+
H1963	+	+
H1975	–	+
H2009	–	–
H358	–	–
A549	+	+
<i>MPMs</i>		
H2052	+	+
H2373	+	+
H2452	–	–
H290	+	+
<i>Prostate cancers</i>		
Caki-1	+	+
Caki-2	+	+
Du145	+	+
KPK	+	+
LNCap-FGC	–	–
PC3	–	–

and type-b expression in the cell lines that we examined ($p < 0.01$). Discrepancy of the expression level between *REIC/Dkk-3* type-a and type-b was observed in lung cancer cell lines, although the expression of *REIC/Dkk-3* type-a completely corresponded with the expression of *REIC/Dkk-3* type-b in other cell lines, indicating that *REIC/Dkk-3* type-b might be utilized for the expression in a tissue-specific manner, as Kobayashi et al. (2002) described.

Among the cancers that were examined, *REIC/Dkk-3* type-a methylation was more frequently detected in breast cancer cell lines, although moderate methylation was also observed in other cancers. A previous report showed that the introduction of *REIC/Dkk-3* into some breast cancer

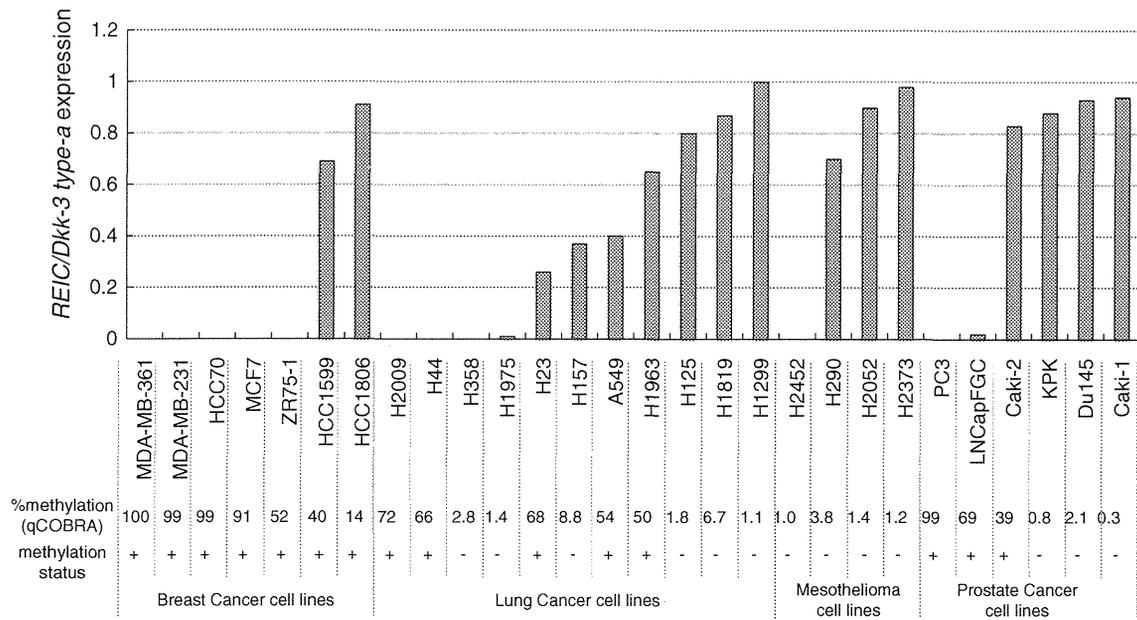


Fig. 3 Relative expression of *REIC/Dkk-3* type-a mRNA and percentages of *REIC/Dkk-3* methylation in each cell line. Columns show the relative expression of *REIC/Dkk-3* type-a mRNA in each sample.

The expression ratio was defined as the ratio of particular sample when compared to those of H1299. % methylation was calculated by qCOBRA assay

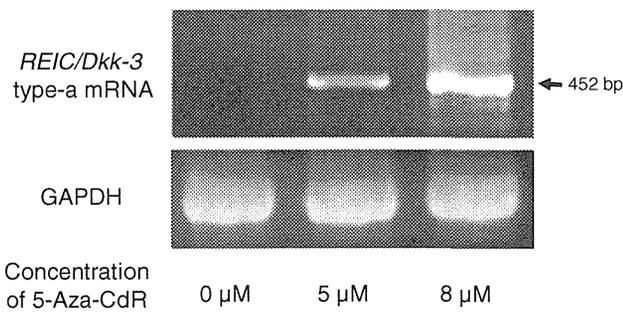


Fig. 4 Restoration of *REIC/Dkk-3* type-a mRNA expression in MDA-MB-231 cells. The effect of 5-Aza-CdR on the restoration of *REIC/Dkk-3* type-a mRNA expressions in heavily methylated breast cancer cells (MDA-MB-231). *REIC/Dkk-3* type-a mRNA was detected by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control

cells had an antitumor effect (Kawasaki et al. 2009). In addition, the introduction of *REIC/Dkk-3* into cancer cells had a direct effect on the induction of apoptosis and an indirect effect on the activation of tumor immunity in NK cells through the up-regulation of IL-7 (Sakaguchi et al. 2009). Furthermore, *REIC/Dkk-3* induces the differentiation of human CD14+ monocytes into a novel cell type, resembling immature dendritic cells generated with IL-4 and GM-CSF (Watanabe et al. 2009). These findings support the possible utility of *REIC/Dkk-3* gene therapy for not only breast cancers but also a broad range of human malignancies. Indeed, *REIC/Dkk-3* gene therapy is ongoing for prostate cancer (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01197209>).

Regarding the clinicopathological factors, we found that ER-positive breast cancer was more common in the

methylated group than in the non-methylated group in the present study. In contrast, Veeck et al. (2009) reported that there was no correlation between *REIC/Dkk-3* methylation and ER and PgR statuses. In other cancers, no significant relationship was observed between the *REIC/Dkk-3* methylation status and any of the clinicopathological factors that were examined. Previous study has shown that *REIC/Dkk-3* methylation was associated with poor survival in primary breast cancers (Veeck et al. 2009). We could not compare these results directly because they examined the *REIC/Dkk-3* type-b methylation, which has a lower promoter activity than that of *REIC/Dkk-3* type-a. In addition, the number of cases in this study may have been too small for the survival analysis, since the primary purpose of this study was to detect *REIC/Dkk-3* type-a methylation and to examine the correlation between methylation and expression. In lung cancer, reduced expression of *REIC/Dkk-3* was previously shown to be frequent in poorly differentiated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Nozaki et al. 2001). Further investigations are needed to determine the clinicopathological impact of *REIC/Dkk-3* type-a methylation.

In conclusion, we found that the promoter region of *REIC/Dkk-3* type-a was frequently methylated in breast, lung, gastric, colon, and prostate cancers and MPMs. *REIC/Dkk-3* type-a methylation and *REIC/Dkk-3* type-a mRNA expression were inversely correlated in the cell lines that were examined. Our results suggest that *REIC/Dkk-3* type-a methylation is an important mechanism in the pathogenesis of various types of malignancies. Since gene therapy using

Table 3 Clinicopathological factors and *REIC/Dkk-3* methylation in various primary cancers

Variables	Number of methylation-positive samples (%)
Total (<i>n</i> = 38)	16 (39)
<i>A. Primary breast cancers</i>	
Age	
<65 (<i>n</i> = 32)	14 (44)
≥65 (<i>n</i> = 6)	1 (17)
Histology	
Papillotubular (<i>n</i> = 8)	2 (25)
Solid-tubular (<i>n</i> = 11)	4 (36)
Scirrhus (<i>n</i> = 17)	9 (53)
Others (<i>n</i> = 2)	0
T categories	
1 (<i>n</i> = 11)	6 (55)
2 (<i>n</i> = 16)	5 (31)
3 (<i>n</i> = 3)	1 (33)
4 (<i>n</i> = 8)	3 (38)
N categories	
0 (<i>n</i> = 15)	6 (40)
1 (<i>n</i> = 23)	9 (39)
M categories	
0 (<i>n</i> = 36)	14 (23)
1 (<i>n</i> = 2)	1 (50)
Stage	
I (<i>n</i> = 9)	5 (56)
II (<i>n</i> = 15)	5 (33)
III (<i>n</i> = 12)	4 (33)
IV (<i>n</i> = 2)	1 (50)
Estrogen receptor*	
Positive (<i>n</i> = 19)	11 (58)
Negative (<i>n</i> = 18)	4 (22)
Progesterone receptor	
Positive (<i>n</i> = 18)	9 (50)
Negative (<i>n</i> = 15)	6 (40)
HER2 status	
Positive (<i>n</i> = 11)	3 (27)
Negative (<i>n</i> = 19)	10 (53)
Total (<i>n</i> = 41)	11 (27)
<i>B. Primary lung cancers</i>	
Age	
<65 (<i>n</i> = 17)	3 (18)
≥65 (<i>n</i> = 24)	8 (33)
Histology	
Adenocarcinoma (<i>n</i> = 27)	7 (26)
Squamous cell carcinoma (<i>n</i> = 14)	4 (29)

Table 3 continued

Total (<i>n</i> = 41)	11 (27)
T categories	
1 (<i>n</i> = 27)	7 (26)
2 (<i>n</i> = 12)	4 (33)
3 (<i>n</i> = 0)	0
4 (<i>n</i> = 2)	0
N categories	
0 (<i>n</i> = 29)	8 (28)
1 (<i>n</i> = 10)	2 (20)
M categories	
0 (<i>n</i> = 39)	11 (28)
1 (<i>n</i> = 2)	0
Stage	
I (<i>n</i> = 28)	8 (29)
II (<i>n</i> = 4)	1 (25)
III (<i>n</i> = 7)	1 (14)
IV (<i>n</i> = 2)	0
Total (<i>n</i> = 21)	8 (38)
<i>C. Primary gastric cancers</i>	
Age	
<65 (<i>n</i> = 10)	5 (50)
65 ≤ (<i>n</i> = 11)	3 (27)
Histology	
Intestinal (<i>n</i> = 10)	5 (50)
Diffuse (<i>n</i> = 11)	3 (27)
T categories	
1 (<i>n</i> = 3)	1 (55)
2 (<i>n</i> = 8)	4 (50)
3 (<i>n</i> = 7)	2 (29)
4 (<i>n</i> = 3)	0
N categories	
0 (<i>n</i> = 7)	4 (57)
1 ≤ (<i>n</i> = 14)	4 (29)
Stage	
I (<i>n</i> = 6)	4 (67)
II (<i>n</i> = 3)	1 (33)
III (<i>n</i> = 5)	3 (60)
IV (<i>n</i> = 7)	0
Total (<i>n</i> = 20)	10 (50)
<i>D. Primary colon cancers</i>	
Age	
<65 (<i>n</i> = 9)	5 (56)
65 ≤ (<i>n</i> = 11)	5 (46)

Table 3 continued

Total ($n = 20$)	10 (50)
Histology	
Well ($n = 5$)	1 (20)
Moderately ($n = 11$)	6 (55)
Poorly ($n = 3$)	2 (67)
Others ($n = 1$)	1 (100)
T categories	
1 ($n = 2$)	1 (50)
2 ($n = 0$)	0
3 ($n = 14$)	6 (43)
4 ($n = 3$)	3 (100)
N categories	
0 ($n = 8$)	4 (50)
1 ≤ ($n = 12$)	6 (50)
M categories	
0 ($n = 12$)	6 (50)
1 ($n = 8$)	4 (50)
Stage	
I ($n = 3$)	2 (67)
II ($n = 4$)	1 (25)
III ($n = 5$)	3 (60)
IV ($n = 8$)	4 (50)
Location	
Right ($n = 8$)	5 (63)
Left ($n = 11$)	4 (36)

* $p < 0.05$

REIC/Dkk-3 expressing adenovirus vectors is currently ongoing for the treatment of prostate cancer, similar therapeutic modalities may be applicable for other types of cancers.

Acknowledgments We thank Professor Adi F. Gazdar, Hammon Center for Therapeutic Oncology Research, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, TX, for kind gift of cell lines.

Conflict of interest None.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH (2005) Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* 65:9617–9622
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3:683–686

- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JPI, Krahe R (2003) Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG site. *Biotechniques* 35:146–150
- Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M, Kashiwakura Y, Ebara S, Saika T, Watanabe M, Huh NH, Kumon H (2007) Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* 14:765–772
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357–362
- Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza BA, Meyers PA, Gorlick R (2004) Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res* 64:2734–2739
- Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT, Chen WY (2004) Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* 23:9183–9189
- Kashiwakura Y, Ochiai K, Watanabe M, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaoka M, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH, Kumon H (2008) Down-regulation of inhibition of differentiation-1 via activation of activating transcription factor 3 and Smad regulates REIC/Dickkopf-3-induced apoptosis. *Cancer Res* 68:8333–8341
- Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H (2009) REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. *Cancer Gene Ther* 16:65–72
- Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N, Shimizu K (2002) Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 282:151–158
- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA (1999) Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238:301–313
- Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arai Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H, Huh NH (2004) Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* 171:1314–1318
- Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG (2008) Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 29:895–904
- Maehata T, Taniguchi H, Yamamoto H, Noshio K, Adachi Y, Miyamoto N, Miyamoto C, Akutsu N, Yamaoka S, Itoh F (2008) Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 14:2702–2714
- Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura T, Andou A, Miyazaki M, Shimizu N, Namba M (2001) Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 19:117–121
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2004) Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 91:707–713
- Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Ochiai K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH (2009) Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of interleukin-7. *J Biol Chem* 284:14236–14244
- Toyooka S, Shimizu N (2004) Models for studying DNA methylation in human cancer: a review of current status. *Drug Discov Today* 1:37–42

- Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M (2000) A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 268:20–24
- Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima I, Namba M (2001) Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 289:257–263
- Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, Schüffler PJ, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E (2009) Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* 9:217
- Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH, Kumon H (2009) Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. *Int J Oncol* 34:657–663
- Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25:2532–2534
- Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L (2008) Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* 29:84–92

早期乳がんに対する手術療法 — 乳房切除から乳房再建まで —

土井原博義

岡山大学病院 乳腺・内分泌外科

キーワード：乳がん，乳房切除術，乳房温存療法，乳がんラジオ波熱凝固療法，乳房再建術

Surgery for early breast cancer : From mastectomy to breast reconstruction

Hiroyoshi Doihara

Department of Breast and Endocrine Surgery, Okayama University Hospital

はじめに

乳がんは現在本邦では年間約54,000人の女性が罹患し、12,000人が死亡すると報告されており、罹患率は1990年代前半より女性の癌罹患率で第1位、死亡率は第5位でいずれも年々増加している疾患である (<http://ganjoho.jp/public/index.html>)。その診断に関しては集団検診や診断方法、診断機器の進歩により、早期乳がんは増加しているものの依然として進行癌として発見される症例も少なくない。また35歳以下のいわゆる若年性乳がんの罹患数も増加しており、整容性や妊孕性の問題、遺伝性乳がんなど新たな課題も抱えている。一方、治療法には手術療法、薬物療法、放射線療法などがあるが、単一の治療が施行されることは少なく、2つあるいはすべてを組み合わせた集学的治療が中心である。特に薬物療法の進歩は目覚ましく、化学療法剤、内分泌療法剤あるいは分子標的治療薬など次々に新薬が開発されており、臨床試験結果を含めて新しいエビデンスが多数みられる。

今回は手術療法を中心に標準的な手術療法から乳房再建術、さらに低侵襲治療であるラジオ波熱凝固療法 (RFA)、センチネルリンパ節生検について岡山大学病院での取り組みについて紹介する。

乳がんの手術療法の変遷 (図1)

Halsted が根治的乳房切除術 (乳房切除+大、小胸筋切除+腋窩郭清：胸筋合併乳房切除) を報告したのは1882年のことでこの術式が乳がん手術の幕開けとなった。その後1950年、60年代には胸骨傍や鎖骨上リンパ節も郭清するという拡大乳房切除術も行われたが、根治的乳房切除の手術成績を凌駕することはなく、また術後の醜形のことによって受け入れられなかった。それに代わって行われるようになったのが非定型的乳房切除術 (胸筋温存乳房切除術) で Patey 法 (乳房切除+小胸筋切除+腋窩郭清) と Auchincloss 法 (乳房切除+腋窩郭清) で長期的な手術成績が Halsted 法と遜色ないにもかかわらず、美的改善が著しく、腕の運動、浮腫などの運動生理学的改善もみられたということで広く行われるようになり、現在でも標準手術方法として施行されている術式である。その次に登場したのが乳房温存療法で1973年 Veronesi, 1976年 Fisher らにより乳房切除術との比較試験の結果、生存率に遜

平成24年5月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-7265 FAX：086-235-7269
E-mail：hdoihara@md.okayama-u.ac.jp

— ◆ プロフィール ◆ —



- 昭和57年 岡山大学医学部卒業
- 昭和57年 岡山市民病院 外科
- 昭和59年 国立病院四国がんセンター
- 平成6年 岡山大学医学部 第二外科 助手
- 平成9年 岡山大学医学部 第二外科 講師
- 平成15年 岡山大学病院 乳腺・内分泌外科 診療科長
- 平成18年 岡山大学内分泌センター 外科部門長
- 平成19年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍・胸部外科学 准教授
- 平成20年 岡山大学乳がん治療・再建センター センター長
- 平成22年 NPO 法人瀬戸内乳腺事業包括的支援機構 理事長
- 平成22年 岡山大学病院 乳腺・内分泌外科 教授

色なく、さらに整容性に優れた術式として広く許容されるようになった。これは乳がんの biology に関する考え方の変化、すなわち乳がん局所病説 (halstedian theory) から乳がん全身病説 (alternative theory) への変化によることが大きい。Fisher ら¹⁾の20年フォローの報告により、乳房切除術と乳房温存術において無再発生存率、生存率は同等であり、さらに乳房温存術に局所放射線療法を併用することにより局所再発率が有意に減少することが明らかになった。

現在本邦での術式の変遷を示すが(図2)、乳房温存療法が60%を占めており、手術療法の中心となっている²⁾。

乳房温存療法

2005年「標準的な乳房温存療法の実施要項の研究」班より乳房温存療法ガイドラインが発表された³⁾。適応は①腫瘍径3cm以下(良好な整容性が保たれるのであれば4cm以下)、②広範な乳管内進展を示す所見がない(マンモグラフィで広範な石灰化を認める症例は除く)、③多発病巣のないもの、④放射線治療が可能であること、⑤患者が乳房温存療法を希望することとなっ

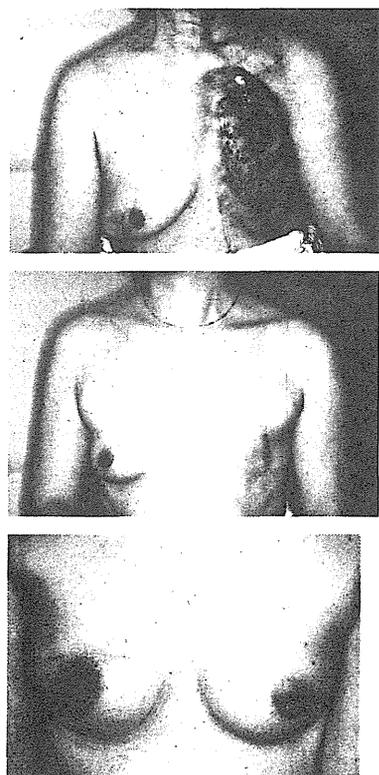


図1 乳がん手術療法の変遷
左：胸筋合併乳房切除術，中：胸筋温存乳房切除術，右：乳房温存療法。

ている。乳頭腫瘍間距離やリンパ節転移の有無は問わない。実際の術式は腫瘍辺縁から1~2cmの安全域を取って切除する円状部分切除と乳房のほぼ1/4を切除する扇状部分切除からなる。切除断端陽性は局所再発の high risk 因子なので可能な限り、術中の凍結病理診断にて断端陰性を確認するよう努めている。腋窩郭清は次項で示すセンチネルリンパ節生検を行い、転移陽性であれば郭清を施行する。生存率に関しては前述のとおり、乳房切除術と差は無いが、QOLに関してみると身体面、精神面、社会面などの健康関連QOLや性的面のQOLに関しては明らかな差は無いようであるが、身体イメージの面からの検討では乳房温存療法が乳房切除術より明らかに優っている⁴⁾。

センチネルリンパ節生検

腋窩リンパ節郭清の意義は、①病期の決定、②治療方針の決定、③腋窩リンパ節再発の予防(局所コントロール)と考えられている。また腋窩郭清により上肢の浮腫、疼痛、知覚鈍麻や拳上障害などの合併症が少なからず起こり得る。従って不要なリンパ節郭清を省略するために考えられたのがセンチネルリンパ節生検でセンチネルリンパ節とは「がんからのリンパ流を最初に受けるリンパ節：見張りリンパ節」のことである。実際の同定方法は色素法とラジオアイソトープ(RI)法があり、色素法はインジゴカルミンやインドシアニングリーンといった色素を腫瘍周囲や乳頭直下に注射し、染色されるリンパ節を術中に同定する方法である。一方RI法は手術前日または当日朝に^{99m}Tc フチン酸または^{99m}Tc スズコロイドなどの核種を腫瘍周囲の皮下または皮内に注射し、リンフォシンチグラフィでセンチネルリンパ節の部位を確認後、術中にガンマープ

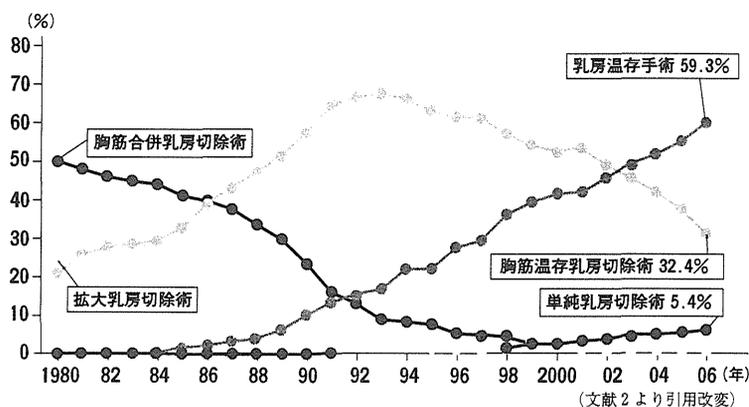


図2 本邦での術式の変遷

ローブを用いてRIを取り込んだセンチネルリンパ節を同定する方法である。「臨床的腋窩リンパ節転移陰性の原発性乳癌に対するセンチネルリンパ節生検の安全性に関する多施設共同臨床試験」(主任研究者：中村清吾)⁵⁾によれば11,489例の登録例の内、色素法単独の同定率は97.6%，RI法97.1%，色素+RI法99.0%といずれも良好な同定率を示しているが、併用法が有意に単独法より優れているという結果であった。なお副作用は色素によるものが3例にみられたが、いずれも軽度であった。当院ではインジゴカルミンおよび^{99m}Tcフチン酸による併用法で施行しており(図3)、同定するのにある程度のlearning curveが必要であるが、比較的容易な手術手技である。

早期乳がんに対するラジオ波熱凝固療法 (Radiofrequency ablation : RFA)

RFAは肝臓がんの分野ではすでに保険適応となり、必須の治療となっているが、乳がんの分野ではまだ臨床試験でのみ施行している治療法である。乳房皮膚には針穿刺による創のみでメスによる切開創が無いため極めて整容性は良好である。岡山大学病院では2005年7月に倫理委員会で承認され、現在まで12例に施行した。適応は①組織学的に確認された乳癌症例、②病変は1個でMMG、超音波、MD-CT、MRマンモのすべ

ての modality で長径2 cm以下、③針生検でホルモンレセプター、HER2/neu、脈管侵襲、tumor gradeが判明していること、④広範な乳管内進展がない症例、⑤出血、凝固異常のない症例、⑥患者本人から同意の得られている症例としている。臨床試験での primary endpoint は安全性の評価、secondary endpoint は臨床的有効性の評価、有害事象の発現頻度と程度とした。実際の手術手技(図4)は全身麻酔下で①センチネルリンパ節生検を施行、②超音波ガイド下で cool-tip RF ニードルにて腫瘍のほぼ中央を穿刺、③5 Wより通電を開始し、1分間に10Wずつ出力を上昇、④インピーダンスが上昇すれば自動的に roll off が入り、焼灼が終わる、⑤腫瘍の中心温度を測定し、60℃以上であればすべての手技が終了となる。なお皮膚の熱傷予防のため腫瘍直上の皮下および直下の大胸筋前面に5%ブドウ糖を注入し、距離をとるとともに通電中は皮膚を氷で冷却するようにしている。12例の結果：平均年齢55歳(36~78)、腫瘍径1.4cm(0.7~2.0)、中心温度89.7℃(72~100)、焼灼時間10.7分(7.5~13)、5%ブドウ糖注入量40ml(10~60ml)となっていた。2泊3日で治療が可能であり、現在まで合併症および局所再発は認めていない。

早期乳がんに対するRFAは短時間で施行することが可能で整容性も良好な低侵襲治療で究極的な乳房温

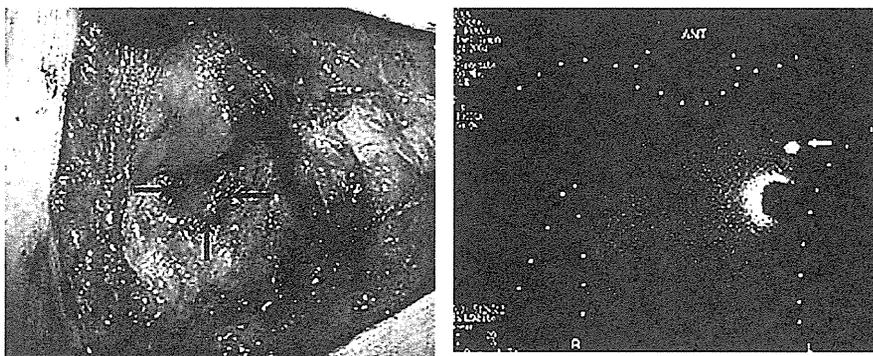


図3 センチネルリンパ節の同定法
左：色素法、インジゴカルミンによる青染リンパ節を示す。右：ラジオアイソトープ法、リンフォシンチグラフィによって hot に描出されたリンパ節を示す。

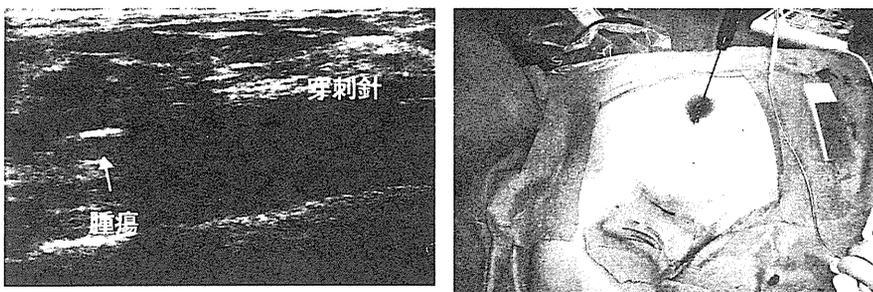


図4 ラジオ波熱凝固療法
左：超音波ガイド下での腫瘍穿刺、右：乳輪より Cool tip RF needle を用いての穿刺。

存療法であるが、予後を含めた長期的な安全性について確立された報告はない。従って現在本邦では手技および安全性を確立するためおよび保険収載をめざして臨床試験を施行中である。

乳房再建術

乳癌手術症例の約40%は乳房切除術を受けているが、女性のシンボルともいわれる乳房を失うことによる精神的なダメージははかり知れないものがあり、術後のQOLに大きな影響がある。そこで施行されるようになったのが乳房再建術でこれには再建時期によって一期再建；乳房切除術と同時に進行、二期再建；乳房切除後期間をおいて行う方法があり、また再建の方法によって自家組織（広背筋皮弁、腹直筋皮弁、腹壁脂肪弁など）を用いる方法と人工乳房（生食バッグや

シリコンインプラント）を用いる方法がある（図5）。岡山大学病院では乳腺外科と形成外科の協働にて乳房切除と乳房再建を行うために2008年5月乳がん治療・再建センターを設立した（図6）。本センターの目標は①総合的な乳がん医療を行う、②科学的根拠に基づいた診断、治療を行う、③整容性を求めた乳房再建術を行うとしている。当院で主に施行している術式は広背筋皮弁と顕微鏡を用いて血管吻合を行う深下腹壁動脈穿通枝皮弁でセンター開設後101例（2008年5月～2010年12月）に施行した。その内訳は一期再建74例、二期再建27例、広背筋皮弁による再建50例、深下腹壁動脈穿通枝皮弁33例、生食バッグ14例、シリコンインプラント6例となっていた（図7）。合併症は皮膚及び脂肪部分壊死9例、感染5例、漿液腫8例にみられたが、いずれも軽度で保存的治療にて軽快している。本セン

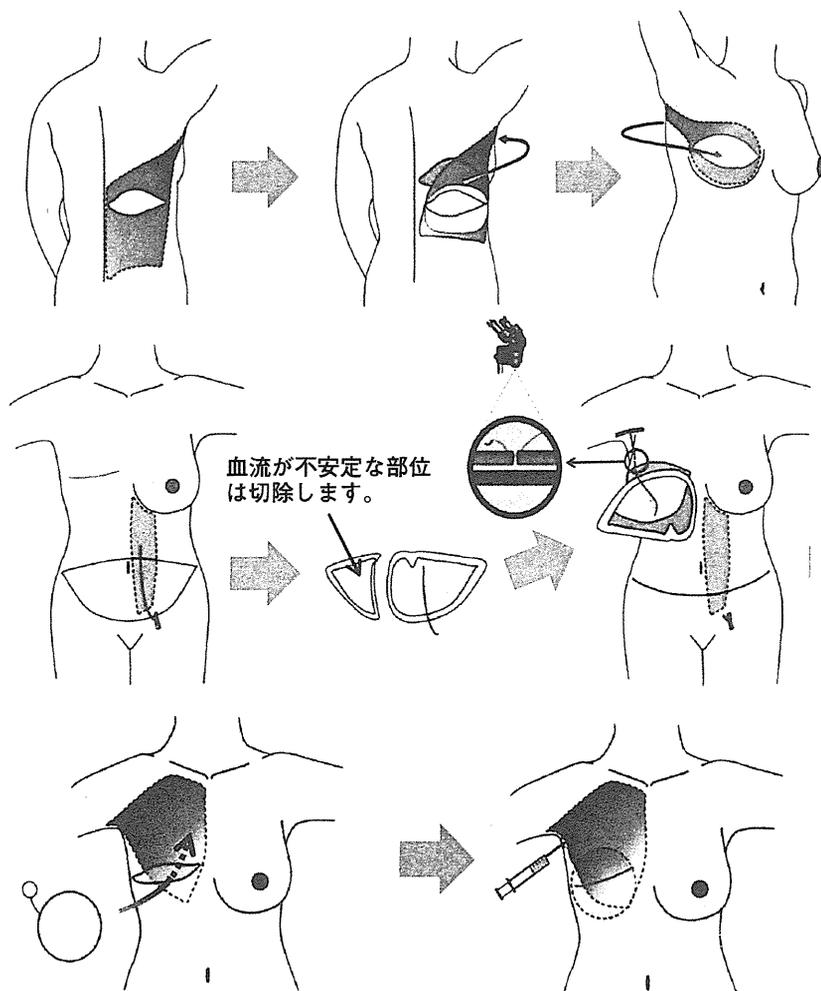


図5 乳房再建方法
上段：広背筋皮弁（LD）、中段：深下腹壁動脈穿通枝皮弁（DIEP）、下段：生食バッグ

乳がんセンター開設

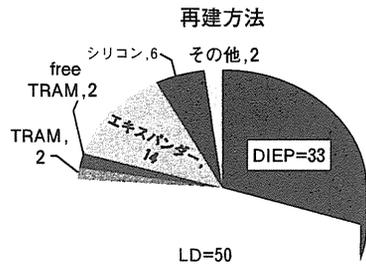
岡山大学病院（岡山市鹿田町）は、乳がんによる乳房の切除から、失った胸の形を再び作り直す再建手術まで一貫して治療する「乳がん治療・再建センター」を院内の大学病院で初めて開設した。専門医や看護婦らが診療科の壁を越えて連携し、質の高い医療を提供する狙い。26日、第1例の手術を行う。（長直弘）



岡山大学病院（岡山市鹿田町）は、乳がんによる乳房の切除から、失った胸の形を再び作り直す再建手術まで一貫して治療する「乳がん治療・再建センター」を院内の大学病院で初めて開設した。専門医や看護婦らが診療科の壁を越えて連携し、質の高い医療を提供する狙い。26日、第1例の手術を行う。（長直弘）

診療科の壁越え連携 1日で切除→再建手術

図6 山陽新聞掲載 2008年5月25日



LD：広背筋皮弁
DIEP：深下腹壁動脈穿通枝皮弁
TRAM：腹直筋皮弁

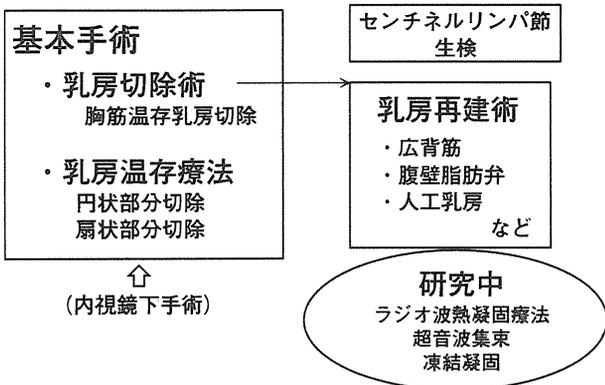


図8 乳がん手術療法のまとめ

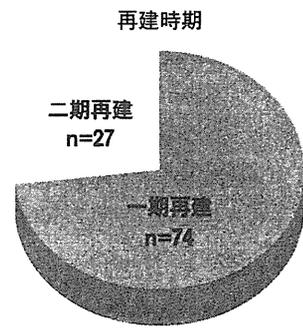


図7 乳房再建結果 (N = 101)

ターの現在の取り組みとしては近隣の病院へのニュースレターの配布（年2回）や一般女性を対象とした市民公開講座の開催を通して、乳がん検診の普及や最新情報の提供、乳房再建の有用性を紹介している。また臨床研究では再建乳房の整容性やQOLを評価するための基準をつくることや下着メーカーとの共同研究でセミオーダー下着の作成に取り組んでおり、再建乳房の変形の予防や患者満足度の向上に努めている。

まとめ

乳がん手術療法について歴史的変遷と手術手技および当院で取り組んでいるラジオ波熱凝固療法および乳房再建術について紹介した（図8）。乳がんの治療は手術療法だけでなく、薬物療法、放射線療法も重要な位置づけにあり、診療科を越えた全人的な医療が必要である。また看護師、薬剤師、理学療法士といったコメディカルとの協働、いわゆるチーム医療が患者、家族の満足度を上げるのに不可欠であると考えている。

文献

- 1) Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N: Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. N Engl J Med (2002) 347, 1233-1241.
- 2) Sonoo H, Noguchi S: Results of questionnaire survey on breast cancer surgery in Japan 2004-2006. Breast Cancer (2008) 15, 3-4.
- 3) 乳房温存療法ガイドライン、「標準的な乳房温存療法の実施要項の研究班」編、金原出版、東京（2005）。
- 4) Engel J, Kerr J, Schlesinger-Raab A, Sauer H, Hölzel D: Quality of life following breast-conserving therapy or mastectomy: results of a 5-year prospective study. Breast J (2004) 10, 223-231.
- 5) 「臨床的腋窩リンパ節転移陰性の原発性乳癌に対するセンチネルリンパ節生検の安全性に関する多施設共同臨床試験」（主任研究者 中村清吾）：厚生労働科学研究費補助金医療技術実用化総合研究事業（H19-がん臨床一般-023）総括・分担研究報告書（2010）。

薬物療法を受ける乳癌患者に対する 生殖機能温存相談システムの構築を目標とした 妊娠可能期乳癌患者に対するアンケート調査

枝園 忠彦^{*1,4} 岡田 知子^{*1} 露無 祐子^{*1} 江見 弥生^{*2}
 西山 慶子^{*1} 増村 京子^{*1} 溝尾 妙子^{*1} 野上 智弘^{*1}
 岩本 高行^{*1} 元木 崇之^{*1} 平 成人^{*1} 松岡 順治^{*1}
 中塚 幹也^{*3} 片岡 明美^{*4} 増田 慎三^{*4} 川畑 貴美子^{*4}
 宮下 美香^{*4} 徳永 えり子^{*4} 土井原 博義^{*1}

Active Counseling about Fertility Preservation for Breast Cancer Patients Receiving Systemic Therapy : Shien T^{*1,4}, Okada N^{*1}, Tsuyumu Y^{*1}, Emi Y^{*2}, Nishiyama K^{*1}, Masumura K^{*1}, Mizoo T^{*1}, Nogami T^{*1}, Iwamoto T^{*1}, Motoki T^{*1}, Taira N^{*1}, Matsuoka J^{*1}, Nakatsuka M^{*3}, Kataoka A^{*4}, Masuda N^{*4}, Kawabata K^{*4}, Miyashita M^{*4}, Tokunaga E^{*4} and Doihara H^{*1} (^{*1}Breast Cancer Treatment and Reconstruction Center, Okayama University Hospital, ^{*2}Graduate School of Health Sciences, Okayama University, ^{*3}Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Hospital, ^{*4}Kataoka Group, Research Group of Japanese Breast Cancer Society)

Systemic therapies have been shown to effectively improve the prognosis of BC patients ; however, such therapies become more and more harmful as their duration increases. We investigated the establishment of an effective counseling system to preserve the fertility of young BC patients receiving systemic therapy in this study. We administered a questionnaire about pregnancy, counseling, and fertility issues directly to 21 young BC patients (<45) who were receiving systemic therapy. Five patients (24%) had wanted to give birth before the start of treatment. Three (60%) of these patients were married and over 40 years of age, and two (40%) patients already had a child (40%). Seven patients (33%) had not been informed about the influence of systemic therapy on fertility. Not all women hoped to receive counseling with their husband or partner. In this study, it was difficult to select patients for counseling depending on the age and number of family members. Frequent counseling with patients and their families might improve their understanding about the influence of the treatment on fertility and make effective fertility preservation possible.

Key words : Systemic therapy, Fertility, Breast cancer

Jpn J Breast Cancer 27(3) : 313~320, 2012

はじめに

1986年米国の The National Coalition for Cancer Survivorship (NCCS) は癌の診断を受けたのち社会生活を送っていく患者を Cancer survivor と定義し、患者個人が多くの社会的問題を抱えると

*1 岡山大学病院 乳癌治療・再建センター

*2 岡山大学大学院 保健学研究科

*3 岡山大学病院 産婦人科

*4 乳癌学会班研究 片岡班

ともに周りの家族・友人に大きな変化や影響を及ぼすことから、さまざまな支援や対策が必要であるとしている¹⁾。こういった問題は患者の社会的背景によって個々で異なっており、すべてが画一的にガイドラインなどによって対応できるものばかりではない。ただ、患者からの要望の高まりによって近年その重要性は広く認識され、さらに医療や薬物の進歩によって個別に対応することも可能になってきており医療者側には患者背景を鑑みた適切な判断が求められるようになってきた。

現在日本における乳癌患者はいまだ増加傾向にあり、40歳以下の閉経前の妊娠可能な女性においても同様に増加している。若年であっても乳癌治療とりわけ、術後補助療法の進歩によって多くの患者は再発を認めることなくその後を過ごすことが可能となってきた。しかしその反面、社会や家庭において大変重要な役割を果たすべき年代の Cancer survivor にとって、この時期における乳癌の治療が及ぼす、精神的・身体的影響は非常に大きい。なかでも薬剤治療が及ぼす生殖機能や胎児への影響は、挙児希望のある Cancer survivor にとっては非常に重要な問題となる。具体的には胎児への影響では内分泌療法として使用される Tamoxifen の催奇形性、分子標的治療剤トラスツズマブによる羊水減少の報告や胎児組織の HER2 への影響があげられる^{2,3)}。また、化学療法においては薬物療法投与時の年齢と投与される薬物によって異なるとされるが、40歳近くなればなるほど無月経となる比率は上昇しその後も月経は再開せず閉経となる可能性も高くなる^{4,5)}。また、月経が再開したとしてもその後に正常な妊娠・出産がどの程度可能かというデータは今のところまったくない。

他方、社会的には女性の社会における役割の増加や晩婚化、またはそれと並行して周産期医療や生殖医療の進歩により高齢出産や不妊治療が比較的安全に行われるようになってきた。薬物療法を受ける乳癌患者に対して薬物療法を行った後に妊娠出産の機会を得るために最新の生殖医療を活用することは可能となってきている。ただ、乳癌治療と生殖医療のそれぞれの専門家をそれぞれの利点を保ったうえでうまく連携させ、生殖医療を必

要とする Cancer survivor に適切にその機会を与えるためには、カウンセリングを主とした多職種によるシステムの構築が必要であると考えた⁶⁾。今回われわれは、まずそのシステム作りの第一歩として現在の患者の考えやニーズを把握するために聞き取り調査を行った。

1. 対象

対象は2009年4月以前に45歳以下で乳癌と診断され岡山大学病院で治療が開始されその後、術後療法または経過観察を行っている患者のうち聞き取り調査に同意した21名。

2. 方法

書面にて聞き取り調査の同意を得たのち、外来にて乳腺外来担当看護師2名（うち1名は認定看護師）のいずれかが半構成的面接法により個別に個室にて約30分程度聞き取りを行い、その結果を分析・評価した。検討項目は①乳癌薬物療法が生殖機能へ及ぼす影響に関する医師の説明と患者の希望の現状 ②生殖機能温存に関するカウンセリングをいつ・誰に・誰と一緒に受けたいかとし、これに沿った質問事項として調査開始前に4つの項目を作製した（表1）。聞き取りを行う看護師は、この4つの項目について回答を得るとともになぜそういった回答に至ったかそれぞれの患者の意見を随時聞き取った。

3. 結果

患者背景を表2に示す。アンケート施行時の平均年齢は38.9歳（27-44）、診断時既婚者は14例（67%）、未婚者はたは離婚後の患者は7例（33%）であった。診断時16例（76%）が子供をもっていた。手術は12例（57%）に乳房部分切除術、9例（43%）が乳房全摘術をうけておりそのうち7例（33%）が乳房再建術を受けていた。リンパ節転移は10例（47%）に認めた。補助薬物療法は8例（38%）が術前化学療法を、7例（33%）が術後化学療法を行っており、12例（57%）は術後内分泌療法を行っていた。薬物療法をまったく行っていなかったのは非浸潤性乳管癌（DCIS）に対して乳房全摘術および再建術を行った1例のみ

表1 質問事項

質問内容	
質問1	乳癌の診断を受けた時に挙児希望はありましたか？ また診断後現在までにその希望に変化はありましたか？
質問2-1	これまでに担当医から乳癌の薬物療法が生殖機能に及ぼす影響に関して説明を受けましたか？ 受けた場合、それはどの時期でしたか？
質問2-2	乳癌薬物療法が生殖機能に及ぼす影響の説明は治療のどの時期に受けたいと思いますか？
質問3	乳癌の薬物療法が生殖機能に及ぼす影響や生殖機能温存の方法についてだれと説明を受けましたか？ また、誰と一緒に受けたいと思いますか？
質問4	乳腺科の医師（男性）と女性の生殖機能に関して話をするということについてどう思いますか？

表2 患者背景 (n = 21)

	患者数
年齢 平均 (範囲)	38.9 (27-44)
診断時の婚姻状況	
既婚	14 (67%)
既婚 (離婚)	3 (14%)
未婚	4 (19%)
子供	
無	5 (24%)
有 (1/2/3/4)	6/3/5/2
手術	
温存	12 (57%)
全摘	2 (10%)
全摘 + 再建	7 (33%)
リンパ節転移	
無	11 (52%)
1 - 3 個陽性	7 (33%)
4 個以上陽性	3 (14%)
免疫染色結果	
ER + /HER2 -	14 (67%)
ER + /HER2 +	2 (10%)
ER - /HER2 -	3 (14%)
ER - /HER2 +	2 (10%)
薬物療法	
術後化学療法	7 (33%)
術後内分泌療法	12 (57%)
術前化学療法	8 (38%)
術後放射線療法	
有	11 (52%)

表3 質問1 「乳癌の診断を受けた時に挙児希望はありましたか？ また診断後現在までにその希望に変化はありましたか？」に対する回答

	患者数
診断時挙児希望	
有	5 (24%)
無	11 (48%)
どちらともいえない	5 (24%)
説明後希望に変化	
有	0
無	14 (100%)

だった。

1) 薬物療法の生殖機能への影響に関する説明の現状

「乳癌の診断時に挙児希望があったか？」という質問について、5例(24%)があったと答えた

(表3)。5例のうち、既婚者が3名(60%)、診断時40歳以上2名(40%)、診断時すでに子供がいた患者は2名(40%)だった。「これまでに担当医師から薬物療法が生殖機能へ及ぼす影響について説明を受けたか？」という質問に対しては、14

表4 質問2-1「これまでに担当医から乳癌の薬物療法が生殖機能に及ぼす影響に関して説明を受けましたか？ 受けた場合、それはどの時期でしたか？」質問2-2「乳癌薬物療法が生殖機能に及ぼす影響の説明は治療のどの時期に受けたいと思いますか？」に対する回答

質問2-1	患者数	質問2-2	患者数
説明 無	7 (33%)	説明希望時期	
説明 有	14 (67%)	癌の診断告知時	7 (33%)
癌の診断告知時	3 (21%)	薬物療法開始前	11 (52%)
薬物療法開始前	8 (57%)	薬物療法中	0
薬物療法中	3 (21%)	わからない	3 (15%)

表5 質問3「乳癌の薬物療法が生殖機能に及ぼす影響や生殖機能温存の方法について誰と説明を受けましたか？ また、誰と一緒に受けたいと思いますか？」に対する回答

	患者数
誰と一緒に説明を聞いたか (n = 14)	
本人のみ	9 (64%)
夫またはパートナー (未婚)	5 (36%)
両親	0
誰と一緒に説明を聞きかかったか (n = 21)	
本人のみ	4 (19%)
夫またはパートナー (未婚)	10 (48%)
両親	3 (14%)
わからない	4 (19%)

例 (67%) が受け、7例 (33%) が受けていなかった。説明を受けた時期は、診断告知時および薬物療法前が3例 (21%)、8例 (57%) で薬物療法中に受けた症例が3例 (21%) あった (表4)。また、受けていない症例のうち1名は育児希望があったと答えた。

「誰と一緒に説明を聞いたか？」という質問に対しては、本人のみ9名 (64%) で、夫またはパートナーと聞いた患者は5名 (36%) だった。(表5)

2) 薬物療法の生殖機能への影響および生殖機能温存に関する説明に対する患者の希望

説明を受けた患者のうち、説明によって希望が変化した患者はいなかった (表3)。説明を聞く時期について、「いつ説明を聞くのがよいか？」という質問に対して、7例 (33%) が診断告知時、11例 (52%) が薬物療法開始前だった。理由として、「診断告知時には癌の診断の衝撃によって、それ以外のことは考えられなかった」、「診断時は

自分の命が最優先であると考えた」または「自分は希望があったが、家族から治療を優先するように勧められた」との意見が聞かれた。薬物療法中がよいと答えた患者はいなかった (表4)。

「誰と一緒に説明を聞きかかったか？」という質問に対しては、本人のみ、夫またはパートナー、両親がそれぞれ4例 (19%)、10例 (48%)、3例 (14%) であり、必ずしも既婚者は夫とともに説明を聞きたいということはなかった。また、実際に説明を聞いた14例のうち4例が夫やパートナーとともに説明を聞きかかったにもかかわらず実際は本人のみで説明を聞いていた (表5)。

生殖機能に関して乳腺科担当医師 (男性) と話をすることに関して、13名 (71%) が問題ない、3名 (14%) が話しづらいと答えた。話しづらい理由はすべて、異性であるためであった (表6)。

その他、説明を受けた患者14名のうち2名 (14%) は、薬物療法によって月経が停止することは知っていても、そのことが生殖機能に影響を及ぼ

表6 質問4「乳腺科の医師（男性）と女性の生殖機能に関して話をすることについてどう思いますか？」に対する回答

	患者数
乳腺科医と相談することについて	
問題ない	13 (71%)
話しづらい	3 (14%)
わからない	5 (24%)

している（妊娠できない可能性がある）ことは理解できていなかった。

4. 考 察

乳癌の治療において術前術後の薬物療法は再発転移の原因となる微小転移に対して治療を行う全身療法であり、前向き試験から得られたエビデンスに基づいて適切な薬物療法を過不足なく行うことがガイドラインで強く推奨されている⁷⁾。しかし、それぞれの薬物療法の影響により内分泌療法を行う場合最低5年間の挙児は困難であり、化学療法を行う場合は投与終了後の月経の状態によってその後の挙児は不可能となる可能性がある。また、社会的背景として初婚・初産年齢の上昇が乳癌のリスクを上昇させるとともに、さらに薬物療法による生殖機能への影響も大きくかつ重大とさせている。今回われわれは、そういった現状の中増加する妊娠可能期の乳癌 Cancer survivor において今後さらに必要性が増すと考えられる生殖機能温存療法において、それを必要とする患者に円滑に情報を提供し、適切な乳癌治療を行ったうえで実際に生殖機能の温存ができるようにするためのシステム作りが必要と考えた。そして、そのための第一段階として今回の調査を行った。

現段階でどの程度担当医から薬物療法が生殖機能に及ぼす影響について説明がなされているかについて調査を行った。当院では5名の乳腺科医がそれぞれの担当患者に対して術前術後の薬物療法の適応決定とその説明を行っていたが、結果今回アンケートをとった患者の33%で説明が行われていなかった。そして行われていても、患者が正確に理解しているとは思えない症例も認められた。生殖機能温存のためのシステム作りにおいてわれ

われ乳腺科医が行うべきもっとも重要なことは、正確な情報を患者に与えることである。またその説明においては生殖機能への影響だけを話し理解を得ることは困難であり、乳癌の治療の流れと予後を同時に正確に伝えることが必要である。今回の結果を踏まえて、担当医間で差が出ないように乳癌の薬物療法の流れと生殖機能に与える影響についてパンフレットを作成し、説明に使用するようにした。

次に生殖機能温存の相談を無駄なく適切に行うためには、患者の挙児希望を的確に把握することが重要である。今回の調査で、「既婚である」、「すでに子供がいる」、「40歳以上である」といった点などで初診時に患者の挙児希望を医療者側が一律に判断することは困難であることが明らかとなった。また、診断時に個別に挙児希望の確認をとっても、「乳癌診断の衝撃によりその他のことが正常に判断できなかった」、「乳癌=死という考えから子供が欲しくても何よりも自分の命を最優先する」といった考えから治療が進んで少し落ち着いた時点で改めて挙児希望がでるといったことも少なくないことが分かった。しかし、薬物療法が始まってからでは対処しにくい現状があり、考慮すべき重大なポイントと考えられた。また、「誰と説明を受けたいか？」という点に関しても、患者それぞれの家庭や社会背景が異なることから決まった回答は得られず、患者の希望に合わせて説明の状況・参加者などを変える必要があると考える。こういったことから、対象となりうる患者に対してはとくに薬物療法が開始されるまでに、何回か声をかける必要があると考えられた。しかし、乳腺科医や婦人科医がそれを行うことは時間的に困難であり、話しやすい看護師やカウ

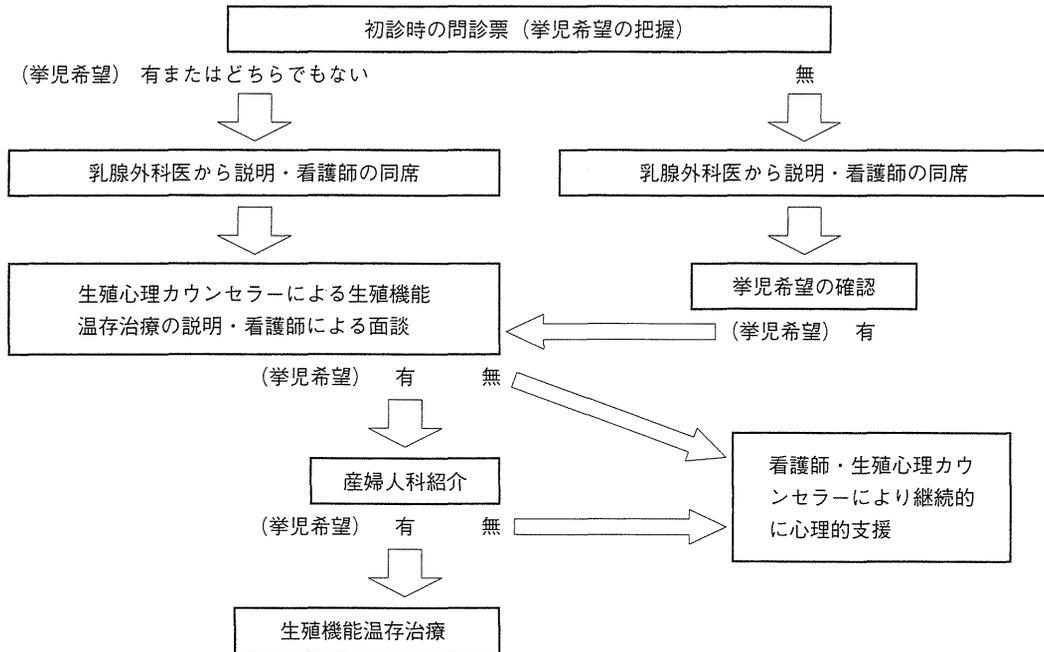


図1 当院における乳癌患者への生殖機能に関する相談の流れ

セラーなどが医師と患者の間に入って必要に応じて相談を行うことが有効であると考える。

これらの考察により現在当院では図1のようなシステムにのっとり、初診時から生殖機能温存が必要となる可能性が少しでも考えられる場合、乳癌治療に精通した認定看護師と生殖医療に精通した生殖心理カウンセラーが相談を開始している。患者の選別のポイントとして、初診時に自分で記載していただく一般的な問診表に「乳癌の治療が生殖機能に影響を及ぼすことがあります」という一文を加えたうえで、「現在または今後挙児希望はありますか?」という質問を行い、その回答として「挙児希望 有・無・わからない」から選んでいただき、有またはわからないと答えた方には乳癌の診断が確定したのち積極的に生殖機能に関する説明と相談を行うようにしている。相談は1人に対して2回から4回行っている。これらの試みにより、システム運用開始から約半年で最終的に薬物療法前に生殖機能の温存に至る症例も数例あった。今後実際に運用をしながら、問題点を改善していく予定である。

具体的に行う生殖機能温存に関しては、婦人科専門医の判断や技術によって適応やデータに違いがあるためここでは多くは述べないが当院においては既婚者の場合は受精卵凍結保存を、また未婚者の場合は未受精卵の凍結保存そして希望者には卵巣の凍結保存も院内倫理委員会の承認を得ており、施行可能となっている⁸⁾。実際には他の血液疾患や整形外科的腫瘍などを含めても悪性腫瘍に罹患した患者が生殖機能温存の処置をうけて出産までいたったケースは現時点ではまれであり、多くの問題や未確定な要素は多い^{9,10)}。ただ、ここで癌を治療する側としてもっとも問題となるのはいずれの方法にしても生殖機能温存の施行に一定の期間を要することである。卵子を採取するためには、月経周期の期間が必要であるし、卵巣保存には卵巣を採取する手術が必要となる。つまり、生殖機能温存を実際に行う場合、乳癌の薬物療法前に一定の準備期間(約1カ月)を作らねばならないことになる。実際に施行が決まった場合、乳癌治療のどの段階で生殖機能温存の処置を行うかを患者と相談の上決めねばならず、当院ではそれ

によって術前化学療法の適応も考えられた患者が先に手術を行った後、薬物療法を行う前に生殖機能温存を行うように変更した例もみられた。つまり、生殖機能温存の希望が予後には影響しない範囲で乳癌治療の選択に影響を及ぼしたことになる。

生殖医療とくに癌患者に対する医療に関しては技術の進歩とともに社会的背景や倫理的問題が大きく関連している。そのため、血液疾患や癌治療に関連する学会では、患者に対して正しい情報を提供することを求める動きがある¹¹⁾が、精子・卵子などの保存に関する倫理問題への法的整備は遅れており、学会レベルでの自主規制に依存しているのが現状である^{12,13)}。癌関連では2004年に日本癌治療学会、日本産婦人科学会、日本泌尿器学会から抗癌剤や放射線の使用前に癌専門医と生殖医療専門医が協力し生殖機能温存に関して十分な説明をするべきである、との提言が出されている。ただ、いまだ医学的には生殖機能温存のためのガイドラインは確立しておらず、一般的にどの施設でも簡単に受けられる医療となるにはまだ技術的にも倫理的にも問題点は多い。ただ、乳癌は小児から学童期に多い血液疾患や整形外科的な悪性腫瘍とくらべて発症年齢が高く、治療後ただちに妊孕性が問題となる場合が多いだけに可能な限り早急に問題点を1つ1つクリアしていく必要があると考える。

生殖機能温存に関しての取り組みを始めてから気づいた不明な点や、新しい問題も出てきた。卵子の採取のために使用される排卵誘発の乳癌に与える影響や(乳癌がホルモン感受性陰性であればよいが陽性では悪影響か?)、保存にかかる経費、生殖機能温存の倫理的是非、とくに生殖機能温存後再発をきたした場合やその後本人が死亡した場合の保存された受精卵の取り扱いなどである。現時点ではこれらの問題点を、そのまま患者にも説明し理解していただくしかない。今後さらに研究を重ね、解決していくべき問題点であると考え。

今回われわれは乳癌患者の生殖機能温存に関する調査の結果を解析しその課題に対応するための当院における取り組みを報告した。この調査結果は、社会的背景が大きく影響するものであり、大都市や過疎化地域、または同じ地域に住んでいて

もまったく異なる環境や社会的背景を持つ者に一般化することは困難かと思われる。しかし、乳癌のCancer survivorの生活の質を考慮すれば各施設の状況に応じた形での生殖機能温存の取り組みは必要であると考え。

本研究は2009年度乳癌学会班会議「若年性乳癌の特徴とサバイバーシップに関する研究」(片岡班)の分担研究として行ったものであり、岡山大学倫理委員会によって承認をうけ施行(平成22年3月23日 承認 受付番号831)されたものである。

文 献

- 1) Institute of Medicine and National Research Council : From Cancer Patient to Cancer Survivor, The National Academies press, USA, 2006
- 2) Mir O, Berweiler P, Ropert S, et al : Emerging therapeutic options for breast cancer chemotherapy during pregnancy. *Ann Oncol* 19 (4) : 607-613, 2008.
- 3) Pant S, Landon MB, Blumenfeld M, et al : Treatment of breast carcinoma with Trastuzumab during pregnancy. *J Clin Oncol* 26 (9) : 1567-1569, 2008
- 4) Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA : Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 14 (5) : 1718-1729, 1996
- 5) Pagani O, O'Neill A, Castiglione M, et al : Prognostic impact of amenorrhea after adjuvant chemotherapy in premenopausal breast cancer patients with axillary node involvement : Results of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Trial VIVI. *Eur J Cancer* 34 (5) : 632-640, 1998
- 6) 神田善伸, 渡邊知映 : 化学療法を受ける大切なあなたへ、そしてあなたの大切な人へ。冊子
- 7) 日本乳癌学会編 : 科学的根拠に基づく乳癌診療ガイドライン①薬物療法 2010年版, 金原出版, 東京, 2010
- 8) Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al : American Society of Clinical Oncology Recommendations on fertility Preservation in cancer Patients. *J Clin Oncol* 24 : 2917-2931, 2006
- 9) Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al : Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *REPRODUCTIVE Biomed Online* 11 : 300-308, 2005
- 10) 寺本章吉, 加藤 修 : 白血病患者さんの卵子保存。「改訂版」白血病と言われたら。全国骨髓バンク推進連絡協議会編 : 155-167, 2008
- 11) 品川克至, 中塚幹也, 谷本光音 : 不妊について。「改

- 訂版」白血病と言われたら. 全国骨髓バンク推進連絡
協議会編 : 147-155, 2008
- 12) 中塚幹也 : 不妊. 血液・腫瘍科 55 : 585-589, 2007
- 13) 中塚幹也 : 血液疾患治療時の不妊とその対策. 血液フ
ロンティア 15 : 77, 2005
-