

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10474

研究課題名(和文) 乳癌転移巣ER遺伝子変異とCDK4/6阻害剤の相関検討と効果予測法の確立

研究課題名(英文) Correlation of ER gene mutation in breast cancer metastasis with effect of CDK4 / 6 inhibitor

研究代表者

高橋 麻衣子 (Takahashi, Maiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50348661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ER陽性進行再発乳癌では、32%においてESR1遺伝子変異が認められ、内分泌治療耐性のメカニズムの一つであると考えられている。本研究では再発転移巣生検検体22例中16例(64%)に変異を認め、そのうち7例でアロマターゼ阻害薬の投与が行われていた。さらにexon8の変異のうち、Leu536Arg, Tyr537Ser, Asp538Glyの3種類のESR1変異遺伝子をMCF7に導入して変異株の作成を行い、機能解析を行った。その結果ESR1変異細胞株ではTAMの効果はほとんどなく、FUL + PALの組み合わせにおいて最も効率的にRB-E2F1の経路が遮断され、細胞周期の停止が行われていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移巣におけるER遺伝子変異についての研究は、欧米を中心に盛んに行われているが、本邦におけるまとまったデータは存在しない。また、内分泌治療耐性との関係を中心に研究がなされており、本研究で取り上げるCDK4/6阻害剤との関係性についての基礎・臨床データは報告が認められていない。さらに、バイオマーカーとしての有用性が示されれば、高額な薬剤費が予想されるCDK4/6阻害剤の使用に一定の根拠を示すことができ、学術的な成果のみならず、医療経済的なインパクトも高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In ER-positive advanced breast cancer, ESR1 gene mutation is found in 32%, which is considered to be one of the mechanisms for endocrine treatment resistance. In this study, mutations were found in 16 of 22 (64%) relapsed metastatic biopsy specimens, of which 7 were treated with aromatase inhibitors. Furthermore, among the mutations of exon 8, three ESR1 mutant genes of Leu536Arg, Tyr537Ser, and Asp538Gly were introduced into MCF7 to prepare mutant clones, and functional analysis was performed. As a result, in the ESR1 mutant cell line, TAM had little effect, and in the combination of FUL + PAL, the RB-E2F1 pathway was most efficiently blocked and cell cycle arrest was observed.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 ESR1 遺伝子変異 CDK4/6阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホルモン受容体陽性/HER2 陰性の進行再発乳癌に対する薬物治療においては、臨床的に生命の危機が無い限り、内分泌治療を優先して施行する。この期間を可能な限り延長することで、Quality of Life を保ちながら、より長期の延命を図ることが治療戦略として一般的である。しかし、転移巣に対して継続して薬剤をもちいることで、内分泌治療薬に対する耐性を獲得することが知られており、その耐性獲得機序について様々な研究が世界中で行われている。

エストロゲン受容体(ESR1: ER)は転写活性ドメインである activation function 2(AF-2)にエストラジオールが結合し、2 量体を形成して核内で標的因子の転写を促進することが知られている。乳癌の増殖・進展に関わる遺伝子の発現はこの AF-2 の活性に依存しており、タモキシフェンは同部位に結合することで、co-repressor を集めて転写を抑制する。これまで、原発巣における ER の遺伝子変異は 0.4-0.6%と報告されていたが、内分泌治療後の転移巣における検体から採取した genomic DNA (gDNA)を、次世代シーケンサーによりディープシーケンスを行ったところ、32%において遺伝子変異が認められることが報告された。(Toy, Nature Gene, 2013) 遺伝子変異の部位にはある特定の hot spot が存在し、Val534Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Asp538Gly と AF-2 ドメインを形成する exon8 に集中していることが示された。また、これら hot spot の遺伝子変異を in vitro において人為的に作成した ER を発現する細胞株では、エストラジオール(E2)の非存在下で ER の活性が恒常的に認められることが報告された。これにより複数の内分泌治療を施行された転移巣の薬剤耐性機序の一つとして、遺伝子変異の結果 ER が恒常的に活性化し、下流の遺伝子発現を促進することが提唱されている。この機序による薬剤耐性では、アロマターゼ阻害薬(AI 剤)は理論上効果が認められず、in vitro の実験では高容量のフルベストラントのみで、ER の活性を抑制することが可能であった。

ER の活性によって転写される標的遺伝子の一つに、細胞周期の調節を行う cyclinD1 が存在し、CDK4/6 と結合することで、RB のリン酸化を通じて転写因子である E2F1 をリリースすることが知られている。そのため、我々は CDK4/6 阻害剤が恒常的に活性化した ER の下流を効率的に阻害する効果があり、ER の遺伝子変異を同定することで、CDK4/6 阻害剤の効果を予測可能であるとの仮説を立てた。この仮説が示されることで、CDK4/6 阻害剤の効率的な活用が見込まれると考えられる。

2. 研究の目的

ER 陽性進行再発乳癌の内分泌治療後の転移巣の検討では、32%において遺伝子変異が認められ、エストロゲン非存在下で ER の活性が恒常的に認められることから、内分泌治療耐性のメカニズムの一つであると考えられている。cyclinD1 は ER によって転写促進されることから、我々は CDK4/6 阻害剤が ER の下流を効率的に阻害する効果があり、ER の遺伝子変異を同定することで、薬剤の効果を予測可能であるとの仮説を立てた。これを検証すると同時に、再発巣生検検体を対象として、日本人特有の遺伝子変異の有無と薬剤耐性との相関を検証することが本研究の目的である。

現在までの ER 遺伝子変異の知見はいずれも海外のデータであり、本邦における ER 変異についての報告は未だに認めていない。そこで、本研究では ER の AF-2 ドメインに対するディープシーケンスを行い、日本人において特有の遺伝子変異が認められるか否かを同時に検証する。この結果を臨床データと統合して解析することで、ER 遺伝子変異の内分泌治療耐性との相関が明らかになると同時に、新たな遺伝子変異を基礎研究によりその機能を明らかにすることが可能となると考えられた。

転移巣における ER 遺伝子変異についての研究は、欧米を中心に盛んに行われているが、本邦におけるまとまったデータは存在しない。また、内分泌治療耐性との関係を中心に研究がなされており、本研究で取り上げる CDK4/6 阻害剤との関係性についての基礎・臨床データは報告が認められていない。さらに、バイオマーカーとしての有用性が示されれば、高額な薬剤費が予想される CDK4/6 阻害剤の使用に一定の根拠を示すことができ、学術的な成果のみならず、医療経済的なインパクトも高いと考えられる。

欧米を中心として、乳癌転移巣の生検検体の遺伝子変異に対応した薬剤を使用することで、予後の延長が見込めるか否かの臨床試験が施行中であり(SAFIR02 試験、UMBRELLA 試験など)、近未来の乳癌治療コンセプトとして、受け入れられつつある。しかし、これら臨床試験のベースとなる遺伝子変異と対応薬剤の奏効の関連性は、必ずしも高いエビデンスを持つわけでは無く、見切り発車の要素も伺える。そのため将来的に本邦において、同様の臨床試験を行う際の基礎的な知見を蓄積することも大きな目的である。

3. 研究の方法

(1) 日本人の ER 陽性/HER2 陰性乳癌患者における転移巣 ER 変異の検証

これまでに報告された ER の遺伝子変異の知見はいずれも海外のデータであり、本邦における ER 変異についての報告は未だに認めていない。本研究では再発巣生検検体を対象として、ER の AF-2 ドメインに対するディープシーケンスを行い、日本人において特有の遺伝子変異が認められるか否かを検証する。

既に AF-2 ドメインを構成する ER 遺伝子の exon4 から exon8 までのプライマーデザインを設定し、針生検検体のパラフィン包埋切片から抽出した gDNA をテンプレートとして、PCR による

増幅が確認された。PCR はバーコード標識を含む特定のプライマーにより 2 回増幅され、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いてシーケンスライブラリーの作成を行う。

解析に使用するサンプルを採取した患者の臨床データは全て揃っており、変異の有無と病勢についての統合解析を行う。特に、ホルモン治療・化学療法の前治療数・検体採取直前の治療薬とその病勢・採取直後の治療薬とその効果判定、について注目して解析を行い、ER 遺伝子変異の有無と相関が認められるかを検証していく。

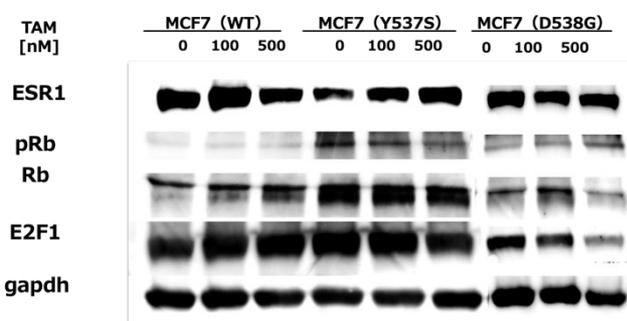


図1 ER 変異株における pRB の亢進は TAM による抑制を受けない

(2) 細胞株における ER 変異の導入と形質の検証

ER 陽性/HER2 陰性の二種類の細胞株に対して、現在判明している変異の好発部位である Leu536Arg, Tyr537Ser, Asp538Gly の 3 種類の遺伝子変異を導入する。我々は以前施行した実験で、任意の部位に遺伝子変異を挿入する技術を確認しており、今回も本手法により変異を作成する。作成した細胞株については、増殖能力、タモキシフェン・フルベストラントへの増殖抑制効果に対する感受性、Estrogen Responsive Element (ERE) luciferase 法によるエストロゲン受容体活性の評価、これら薬剤による ERE luciferase 活性への影響を評価、ER の標的遺伝子である cyclinD1 の発現検討、などを施行する。

上記の評価はプラスミドによる変異 ER 発現を導入して行うが、余裕があればノックイン法によりゲノム上の ER 遺伝子に直接遺伝子変異を導入し、endogenous な発現下で同様の現象が生じるか否かを検討していく。

(3) ER 変異細胞における RB-E2F1 経路の活性化検証と CDK4/6 阻害剤の効果判定

我々は既に CDK4/6 阻害剤が E2F1 発現に与える影響について細胞株で検証し、2014 年に報告している。(Zhussupova, Takahashi et al., PLOS ONE) この実験環境をそのまま応用し、ER 変異細胞株について、cyclinD1, CDK4/6 の発現解析。さらに RB 蛋白とそのリン酸化の状態、遊離 E2F1 の増減について検証していく。さらに、これらをタモキシフェンおよびフルベストラントを添加した状態で、どのような変化が生じるかを検討する。また、細胞周期回転の亢進が生じているか否かをフローサイトメトリーにて検討する。

さらに、in vivo マウスモデルを用いて CDK4/6 阻害剤の添加による腫瘍増大抑制の評価を行う。我々の仮説では、ER 遺伝子変異を認める腫瘍では、CDK4/6 阻害剤の腫瘍抑制効果が大きいと考えているが、単剤の効果のみならず、タモキシフェン・フルベストラントなどの内分泌治療の併用や、各種チロシンキナーゼ阻害薬・mTOR 阻害薬・IGFR 阻害薬・FGFR 阻害薬などの併用についても検証を行う。これにより、ER 遺伝子変異を生じた細胞株が、どの増殖エンジンを介して耐性を獲得したかの同定を行い、今後の検証につなげていく。

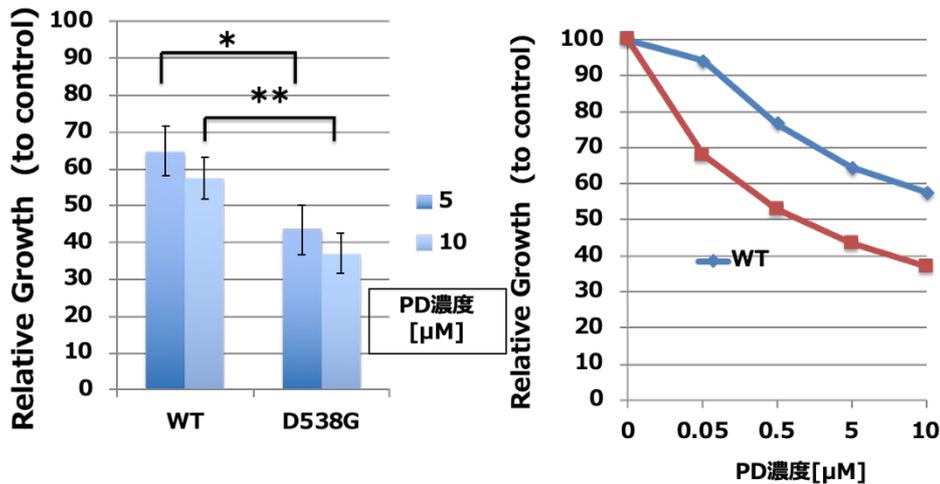
4. 研究成果

(1) 日本人の ER 陽性/HER2 陰性乳癌患者における転移巣 ER 変異の検証

慶應義塾大学病院において、進行再発乳癌と診断され、再発転移巣の生検で ER 陽性乳癌と診断された 22 例について、これら転移巣における ER 遺伝子のシーケンスを行った。22 例中 16 例 (64%) に変異を認め、そのうち 7 例で進行再発乳癌に対するアロマターゼ阻害薬 (AI 剤) の投与が行われていた。一方で 6 例の変異陰性症例では、1 例のみで AI 剤の投与が施行されていた。手術時の年齢が低く、術後補助療法としてタモキシフェンを使用している患者に、ER 変異を多く認めたが、それら症例では進行再発乳癌に対して AI の使用が行われる頻度が高いからだと考えられた。

(2) 細胞株における ER 変異の導入と形質の検証

図2 D538G 変異株においてバルボシクリブの効果が高い (*p<0.001, **p=0.018)



ER 陽性乳癌における内分泌療法耐性に ESR1 遺伝子変異が関与しているとの報告があり、その変異部位には特定の hot spot があることが知られている。我々はこれら変異と乳癌治療に使用される薬剤感受性の相関を検討するため、AF-2 ドメインを形成する exon8 の変異のうち、Leu536Arg, Tyr537Ser, Asp538Gly の3種類の ESR1 変異遺伝子を ER 陽性乳癌細胞株 MCF7 に導入し変異株の作成を試みた。これら変異株を用いて CDK4/6 阻害剤等の感受性と、細胞増殖に関わる蛋白(CyclinD1・CDK4 および CDK6・Rb・pRb・E2F1)発現の変化について検討した。ESR1 plasmid にそれぞれ3種類の遺伝子変異(mut536/mut537/mut538)を導入し、MCF7 細胞にトランスフェクション後、薬剤によるセレクションを行って stable clone (mut537 /mut538)の作成に成功した。変異 ESR1 の高発現下では、細胞増殖能の亢進が観察され、pRb および E2F1 蛋白の発現が上昇していた。

(3) ER 変異細胞における RB-E2F1 経路の活性化検証と CDK4/6 阻害剤の効果判定

上記で作成した変異株に対して複数の条件下で3種類の薬剤(Tamoxifen;TAM, Fulvestrant;FUL, Palbociclib;PAL)を投与し、MTT 法を用いて各薬剤の IC50 を確認した後に細胞周期への影響について検討した。さらに、その際の蛋白発現の結果を western blotting 法で検討した。TAM の投与では ESR1 の発現に影響はなく、下流の蛋白発現に影響は示さなかったが(図 1)、FUL もしくは PAL を投与することで pRb および E2F1 の発現低下を認め、FUL 投与下では ESR1 発現の低下も認めた。変異株 D538G においては、wt と比較して PAL の効果が有意に高いが(図 2)、阻害ポイントの違いからか、PAL 投与では pRb の発現低下に反比例して Rb の発現上昇が特徴的であり、フィードバック機構が働いていると考えられた。また PAL + FUL の併用ではこれら pRb、Rb、E2F1 いずれの発現も抑制された。これらの結果から、ESR1 変異細胞株では TAM の効果はほとんどなく、FUL + PAL の組み合わせにおいて最も効率的に RB-E2F1 の経路が遮断され、細胞周期の停止が行われることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 前田日菜子 高橋麻衣子 他、 ESR1 遺伝子変異細胞株の内分泌療法耐性と CDK4/6 阻害剤による耐性克服メカニズムの検討、第 26 回日本乳癌学会学術総会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：林田 哲
ローマ字氏名：HAYASHIDA, Tetsu
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：80327543

研究分担者氏名：関 朋子
ローマ字氏名：SEKI, Tomoko
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：70528900

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。