

令和元年6月17日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07023

研究課題名(和文)アンドロゲン受容体陽性トリプルネガティブ乳癌における新たな治療戦略の検証

研究課題名(英文)Verification of new therapeutic strategies for androgen receptor positive triple-negative breast cancer

研究代表者

浅野 有香 (ASANO, YUKA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床研究医

研究者番号：10806376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では，“アンドロゲン受容体(AR)陽性トリプルネガティブ乳癌(TNBC)における新たな治療戦略の検証”についてCDK4/6阻害剤や抗アンドロゲン剤の有用性を明らかにするとともに、腫瘍免疫やEMTの側面からその分子機構を検証した。今後は、実臨床への応用可能なAR陽性TNBCの新たな治療戦略の構築を目的とした基礎研究や臨床研究を推進していく。具体的には，“アンドロゲンシグナリングから捉えたCDK4/6阻害剤による新たな乳癌治療戦略”(JSPS若手研究B:19K18038)として、研究を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、AR陽性TNBCの代謝競合と免疫微小環境変化についての検証を行った。具体的には抗アンドロゲン剤やCDK4/6阻害剤、あるいはEMT抑制作用が報告されている微小管阻害剤(エリブリン)の修飾による腫瘍免疫微小環境の動的な変化を代謝競合から捉え、分子生物学的に明らかにした。今後は、殺細胞性抗癌剤、分子標的治療薬、内分泌療法、免疫療法など、これらの組み合わせにより更なる効果が期待できる治療選択肢を検索し、臨床応用への一助としたい(併用療法の可能性の検証)。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the usefulness of CDK4/6 inhibitors and antiandrogens in “Verification of new therapeutic strategies in androgen receptor (AR) positive triple negative breast cancer (TNBC)”. The molecular mechanism was also examined from the aspect of tumor immunity and epithelial-mesenchymal transition (EMT). In the future, we will promote basic research and clinical research for the purpose of constructing a new therapeutic strategy for AR-positive TNBC applicable to clinical practice. Specifically, we will continue our research as “A new breast cancer treatment strategy with CDK4/6 inhibitors captured from androgen signaling” (JSPS Young research B: 19K18038).

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 アンドロゲン受容体 腫瘍微小環境 腫瘍免疫

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

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌治療は個別化の時代を迎え、個々のサブタイプに応じた治療標的に基づいた治療が行われている。しかし、ER, PgR, HER2 が陰性であるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) では明らかなターゲットがなく、治療選択肢の少なさや生物学的悪性度より難治性乳癌と考えられている。最近の基礎研究では、TNBC は遺伝子発現プロファイルによりさらに 7 種類のサブタイプに分類されることが示されている。

TNBC のサブタイプにおいて、アンドロゲンシグナリングが関与する luminal AR (LAR) は内分泌活性を有すると考えられている。しかしながら TNBC におけるアンドロゲン受容体をターゲットとした治療は未だ確立されておらず、本研究ではアンドロゲン受容体陽性 TNBC における新たな治療戦略の確立を検証する。これらの分子機構を腫瘍免疫や上皮間葉移行 (EMT) などの腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) の側面から明らかにしていく。本研究における基礎的データは、今後の臨床応用に寄与する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、“アンドロゲン受容体陽性トリプルネガティブ乳癌における新たな治療戦略の検証” について、腫瘍免疫や EMT, 内分泌感受性の観点より分子生物学的アプローチをすすめ、実臨床に応用可能な TNBC の治療戦略を明らかにする。

申請者が樹立した AR 発現モデルや EMT 抑制モデルなどの TNBC 細胞株を用いて親株との比較検討をすすめ (TNBC 細胞株が luminal タイプに類似した細胞特性に変化し、内分泌活性を獲得するなど) 悪性形質獲得や薬剤効果にかかわる機序を解明する。そして AR 陽性 TNBC における CDK4/6 阻害剤 (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) や抗アンドロゲン剤 (enzalutamide, abiraterone) の有用性についての検証をすすめる。さらに免疫療法 (抗 PD-1 抗体, 抗 PD-L1 抗体など) との併用効果も含め、次世代の TNBC 治療につながる治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

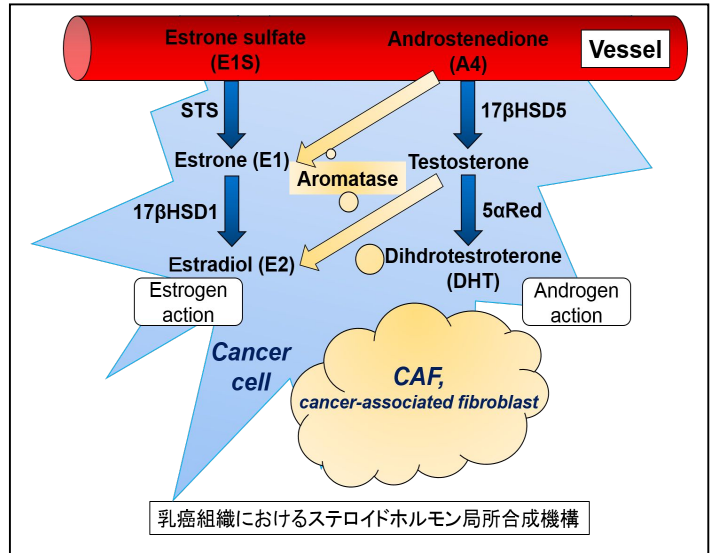
TNBC 細胞株として MDA-MB-231, BT549, OCUB-2 (申請者所属の教室にて樹立), また non-TNBC 細胞株として HER2-enriched 細胞株 OCUB-1 (申請者所属の教室にて樹立), および luminal A 細胞株 MCF-7, T47D を使用する。さらに申請者が作成した EMT 抑制モデルである miR200b-MDA-MB-231, E-cadherin-MDA-MB-231, および AR 発現モデルの AR-MDA-MB-231 を用いて、親株との比較検討をすすめる。

miR200b-MDA-MB-231 や E-cadherin-MDA-MB-231 は親株と比較して EMT が抑制されており、luminal タイプに類似した細胞特性であった (snail, slug, twist, ZEB1, ZEB2 低下) (miR200b/c, miR21 上昇)。TNBC 細胞株におけるこれらの細胞特性の変化に関する遺伝子発現や効果が期待される薬剤の同定、そして分子機構を以下の手法を用いて解明していく。

4. 研究成果

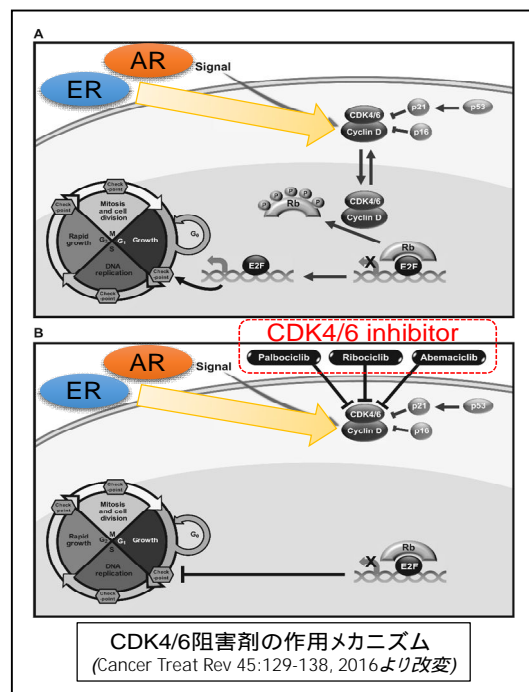
申請者は TNBC における AR の意義を検証しており、AR 発現による予後解析 (*Cancers* 9;4, 2017) や薬剤感受性 (*Br J Cancer* 114:14-20, 2016) を明らかにした。さらに抗アンドロゲン剤耐性の要因である AR のスプライスバリエーションに注目し、androgen-receptor splice variant-7 (AR-V7) 発現のある TNBC は、化学療法感受性が高いことも報告した (*npj Breast Cancer* 2019 in press)。これまでに、AR 発現のある TNBC は、予後良好であるものの化学療法感受性は低く、そして AR-V7 により感受性が高まる可能性を報告した。

癌細胞は単独で生存可能ではなく、周囲の腫瘍微小環境 (TME) に依存して増殖・進展していく (*Nat Rev Cancer* 17:457-474, 2017)。癌細胞は周囲の間質細胞と相互作用を示し (tumor-stromal interactions)、癌細胞近傍の間質細胞は cancer-associated fibroblast (CAF) と称され、エストロゲン合成に重要なアロマターゼの発現が増強していることが示唆されている。乳癌にとって重要なエストロゲンは、アンドロゲンを基質としてチトクローム P450 の一種であるアロマターゼによってのみ合成がなされる。このように局所における



ステロイドホルモンの合成機構は、癌細胞にとって有利な TME を形成している可能性がある。すなわち局所の内分泌環境も、治療反応性に作用する重要な要素と考えられる。申請者は薬物療法の修飾による TME の動的変化や、そのモニタリング指標である腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) のサブセット解析を報告した (*Br J Surg* 103:845-854, 2016)(*Br J Cancer* 119:572-579, 2018)(*ESMO Open* 3:e000305, 2018)(*Anticancer Res* 38:2311-2321, 2018)(*Anticancer Res* 38(1):401-410, 2018)(*PLoS One* 12:e0170634, 2017)(*J Transl Med*, 16:54, 2018)(*J Transl Med* 16:86, 2018)(*J Transl Med* 16:87, 2018)。これらの研究結果より今後は、CAF が局所内分泌環境に与える影響を明らかにし、TME におけるアンドロゲンシグナリングの役割について検証する。

一方で、ER 陽性乳癌において新たな key drug として注目されている CDK4/6 阻害剤 (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) は、国際第 III 相試験で無増悪生存期間 (PFS) の延長は示されたものの、全生存期間 (OS) 延長は得られていない (PALOMA3 試験, *N Engl J Med.* 373:209-19, 2015 / MONARCH2 試験, *J Clin Oncol* 35:2875-2884, 2017)。CDK4/6 阻害剤は、細胞周期の G1/S チェックポイント制御に関わる CDK4/6 を阻害することにより細胞増殖を抑制する。基礎研究においては上皮間葉転換 (EMT) を亢進させて TME を悪化してしまう報告もなされており、



CDK4/6 阻害剤投与後の後治療 (post-progression therapy) の選択は、今後取り組むべき臨床的課題とされている。ホルモン受容体陽性乳癌については、mTOR 阻害剤 (everolimus) や PI3K 阻害剤 (alpelisib) などの臨床的有用性が報告されているものの (BOLERO2 試験, *N Engl J Med.* 366:520-529, 2012 / SOLAR1 試験, *ESMO 2018*) , これらの薬剤における逐次療法などの確立された治療戦略は存在しない。また ER や AR と細胞周期にはクロストークがあるため、エストロゲンやアンドロゲンが受容体に結合すると、cyclin D1 の転写がすすみ、CDK4/6 活性化と retinoblastome (RB) 1 のリン酸化が促進され細胞周期が進行する。すなわちエストロゲンシグナリングのみならずアンドロゲンシグナリングによって CDK4/6 活性は進行するため、AR 阻害はホルモン感受性乳癌での治療効果を得る上で重要な鍵になるものと考えられる。申請者は CDK4/6 阻害剤が luminal 乳癌細胞株に高い感受性を示すことより、AR 陽性 TNBC においても治療効果が期待できるという仮説のものに前研究を行った (JSPS 研究活動スタート支援)。ここで AR を pEGFP-C1-AR Plasmid Vector を用いて TNBC 細胞株に transfection させ、安定細胞株である AR 強制発現 TNBC 細胞株 (MDA-MB-231-AR) の樹立に成功した。MDA-MB-231-AR は CDK4/6 阻害剤に感受性を有しており、これらの TNBC サブタイプの新たな治療選択肢となる可能性を報告した (107th AACR #2343, 2017)(24th APCC Travel Grant Award 受賞, 2017)。

今後は、ホルモン感受性乳癌に対する CDK4/6 阻害剤と抗アンドロゲン剤の併用療法 (combination therapy) mTOR 阻害剤や PI3K 阻害剤などの逐次療法 (sequential therapy) の可能性を探究していく (JSPS 若手研究 B: 19K18038)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Asano Y (筆頭, 他 11 名). Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. *J Transl Med*, 査読有, 16(1): 87, 2018.
2. Asano Y (筆頭, 他 11 名). Prediction of the treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer by subtypes using tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res*, 査読有, 38(4): 2311-2321, 2018.
3. Kashiwagi S, Asano Y (3 番目, 他 10 名). Study on the progression types of cancer in patients with breast cancer undergoing eribulin chemotherapy and tumor microenvironment. *J Transl Med*, 査読有, 16(1): 54, 2018.
4. Takada K, Asano Y (4 番目, 他 10 名). Significance of re-biopsy for recurrent breast cancer in the immune tumor microenvironment. *Br J Cancer*, 査読有, 119(5): 572-579, 2018.
5. Kashiwagi S, Asano Y (2 番目, 他 11 名). Mesenchymal-epithelial transition and tumor vascular remodeling in eribulin chemotherapy for breast cancer. *Anticancer Res*, 査読有, 38(1): 401-410, 2018.
6. Goto W, Asano Y (3 番目, 他 9 名). Predictive value of improvement in the immune tumour microenvironment in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *ESMO Open*, 査読有, 3: e000305, 2018.
7. Goto W, Asano Y (4 番目, 他 8 名). Eribulin promotes antitumor immune responses in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Anticancer Res*, 査読有, 38(5): 2929-2938, 2018.
8. Takada K, Asano Y (4 番目, 他 8 名). Use of the tumor-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to combination therapy with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for advanced HER2-positive breast cancer. *J Transl Med*, 査読有, 16(1): 86, 2018
9. Asano Y (筆頭, 他 12 名). Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer*, 査読有, 17: 888, 2017
10. Asano Y (筆頭, 他 12 名). Expression and clinical significance of androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Cancers*, 査読有, 9(1):4, 2017
11. Kashiwagi S, Asano Y (2 番目, 他 10 名). Use of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to predict the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer. *PLoS One*, 査読有, 12(2):e0170634, 2017
12. Kashiwagi S, Asano Y (3 番目, 他 9 名). Identification of predictive markers of the therapeutic effect

- of eribulin chemotherapy for locally advanced or metastatic breast cancer. BMC Cancer, 査読有, 17: 604, 2017
13. Kashiwagi S, Asano Y (2番目, 他13名). Using TILs to predict therapeutic effect of chemotherapy (Pertuzumab, Trastuzumab, Docetaxel) on HER2-positive breast cancer. Anticancer Res, 査読有, 37:5623-5630, 2017
 14. Asano Y, (筆頭, 他 9 名). Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. Br J Surg, 査読有, 103:845-854, 2016
 15. Asano Y, (筆頭, 他 9 名). Clinical verification of sensitivity to preoperative chemotherapy in cases of androgen receptor-expressing positive breast cancer. Br J Cancer, 査読有, 12;114(1):14-20, 2016
 16. Asano Y, (筆頭, 他 8 名). Predictive Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Efficacy of Preoperative Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. Ann Surg Oncol, 査読有, 23(4):1104-1110, 2016
 17. Asano Y, (筆頭, 他 8 名). Platelet-lymphocyte ratio as a useful predictor of the therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. PLoS One, 査読有, 11(7):e0153459, 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 柏木 伸一郎

ローマ字氏名: KASHIWAGI, Shinichiro

※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。