

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03721

研究課題名(和文) 間質応答を利用したホルモン受容体陽性乳がんの治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of treatment strategy based on stromal reaction in hormone receptor-positive breast cancer

研究代表者

上野 貴之 (UENO, Takayuki)

公益財団法人がん研究会・有明病院 乳腺外科・部長

研究者番号：40452362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞と間質細胞が共存するための両面培養システムを確立し、ホルモン療法施行時と分子標的治療薬併用時の反応性について、乳癌細胞株と乳腺由来間質細胞を用いて検討した。細胞のRNAシークエンスによる遺伝子発現プロファイルの解析と培養上清代謝産物のメタボローム解析を行った。ホルモン療法の治療効果に關与すると考えられる候補分子、候補シグナルパスウェイの解析のほか、エベロリムスの治療効果や治療抵抗性に關与すると考えられる分子、パスウェイの検討を行った。術前ホルモン療法+CDK4/6阻害薬の術前療法の臨床試験を完了し、結果を学会にて報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン受容体陽性乳がんの予後は他のサブタイプと比べると良好といわれているが、実際には術後5年以上たった段階で再発するような場合も多く(晩期再発)、さらなる治療の改善が必要となっている。ホルモン療法は乳がんの微小環境を変化させる治療であることから、乳がんのみでなく、微小環境も合わせて治療対象とすることにより、より効果的な治療が可能になると考えられる。我々は、生体内に近い環境で乳がん細胞と間質細胞を共培養することができる3次元培養システムを開発し、ホルモン療法や分子標的治療の効果に影響する分子やパスウェイの解析を行った。これらの結果は、より効果的な乳がん治療に結び付くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A bilateral co-culture system for cancer cells and stromal cells has been established. The response to endocrine therapy (estrogen depletion) and concomitant use of mTOR inhibitors was investigated using breast cancer cell lines and mammary gland-derived fibroblasts. Gene expression profiles were analyzed by RNA sequencing of cells and metabolomic analysis of metabolites in culture supernatant was performed. Candidate molecules and candidate signaling pathways that may be involved in the therapeutic effect of hormone therapy were analyzed, as well as molecules and pathways that may be involved in the therapeutic effects of everolimus and resistance to treatment.

A clinical trial of preoperative endocrine therapy plus CDK4/6 inhibitor was completed and the results were reported at the international conference.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：間質応答 内分泌療法 分子標的治療 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

乳がんの治療は臨床的にエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2 発現・遺伝子増幅による分類に基づいて治療方針が決定されているが、乳がんの多様性を十分に反映した治療戦略とはいえない。現在の治療戦略は、乳がん細胞における蛋白発現や遺伝子増幅のみに基づいて治療法が決定されており、がん細胞以外の間質細胞に対する生物学的評価は行われていない。しかし、間質の状態により予後や治療反応性が異なることが報告されるようになり、乳癌組織における間質の理解に対する重要性は増している。

乳がん組織の間質における遺伝子発現を解析した研究で、予後不良群の間質には血管新生が亢進しており、予後良好群では免疫応答に關与する遺伝子発現の増加が認められたと報告されている。腫瘍組織の免疫反応は、近年精力的に研究されており、化学療法や分子標的治療、さらには内分泌療法の治療効果と關係することが報告されている。腫瘍浸潤免疫細胞については、サブタイプ別に検討され、トリプルネガティブや HER2 陽性では、免疫細胞浸潤が予後良好な傾向を示すが、ホルモン受容体陽性乳がんでは、逆に免疫細胞浸潤が低い方が予後良好な傾向を示すことが報告され、サブタイプにより免疫細胞浸潤の意味が異なることが示された。つまり、免疫反応の重要性に関する報告は増えているが、サブタイプによる違いを含め、どの免疫細胞がどの治療法で具体的に重要かについてはまだ不明な点が多い。

分子標的治療である CDK4/6 阻害薬が、がんのインターフェロン反応や PD-L1 の発現に關与していること、さらに制御性 T 細胞の増殖抑制に關与することが基礎的に示唆されている。また、低容量の化学療法を持続的に投与するメトロノミック療法はがん細胞に対する直接作用のみで無く、免疫反応が治療効果に關連することが示唆されている。しかしこれらの薬剤の生体内における具体的な免疫反応と治療効果の關係については不明である。

さらに、間質細胞の性質が乳がん細胞の特性(サブタイプ)をコントロールし、サブタイプを変化させることが報告された。つまり、増殖因子の刺激を受けた間質細胞が乳がんのサブタイプを変化させることが報告されたが、このような乳がん細胞の生物学的特性のダイナミックな変化が、治療に対する反応性や抵抗性に影響することが示唆される。

以上より、乳がん細胞の生物学的特性のみでなく、間質細胞の特性が、乳がんの治療反応性や予後に影響することは強く示唆されているが、生体内においてどの間質細胞のどのような特性がどの治療における治療反応性や治療抵抗性に具体的に關与しているかは明確でない。つまり、乳がんの治療で使用される代表的な治療法に対して、間質細胞のどの特性やプロファイルがどのように治療の反応性または抵抗性に影響するか、が明らかになっておらず、その解明が急がれる。

2. 研究の目的

本研究では、乳がんの代表的な治療法について、具体的に間質細胞の種類や、プロファイルを明らかにし、さらに、間質細胞のどのような状態や組み合わせが治療反応性や抵抗性に影響するかを明らかにし、間質特性を考慮した新たな治療戦略を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

a. 三次元培養系を用いた候補分子の同定

三次元培養系により、治療反応性に影響するがん細胞、間質細胞の候補分子の同定を試みる。具体的には、がん細胞、線維芽細胞の共培養(三次元培養)系を用い、エストロゲン枯渇条件下と、さらに分子標的薬(CDK4/6 阻害薬)添加条件下、低用量シクロホスファミド添加条件下において、がん細胞(MCF7、T47D 等)、線維芽細胞、免疫細胞のそれぞれの遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて解析する。特に、内分泌療法耐性細胞株(長期エストロゲン枯渇培養下で既に作成)と親株との比較解析を行うことにより、治療反応性に關与すると考えられる候補分子、候補パスウェイの同定を試みる。

b. 臨床検体を用いた解析

さらに臨床試験検体において、間質細胞における候補分子の発現やその変化とがん細胞の治療反応性について解析を行う。具体的には、三次元培養で得られた候補分子やパスウェイについて、組織での発現と治療反応性の關連につき検討する。さらにがん細胞と間質細胞におけるオートファジー關連蛋白 beclin1、LC III、ATG16L、BNIP3、Caveolin-1 や CDK4/6 阻害薬の作用に關連する senescence 關連の NTAL、DEP1、STX4、DCR2 等の発現や変化を検討する。ミトコンドリアのオートファジーマーカーである BNIP3L や好氣的解糖のマーカ-の PKM2、LDH-B や乳酸の輸送担体である MCT1 の変化、脂質代謝に關与する FAS(fatty acid synthase)について解析を行う。免疫細胞については、CD3、CD4、CD8、CD20、CD68、FOXP3、PD-1、PD-L1、CXCR3 と治療反応性との關連について解析を行う。

4. 研究成果

ホルモン療法における間質細胞の反応や、分子プロファイルの変化を明らかにし、さらに、間質細胞のどのような状態や組み合わせが治療反応性や抵抗性に影響するかを明らかにし、間質特性を考慮した新たな治療戦略を考案することを目的として、三次元培養系を用いた候補分子の同定を試みた。まず、三次元培養系により、治療反応性に影響するがん細胞、間質細胞の候補分子の同定を行うため、間質細胞として、もともと使用していた皮膚線維芽細胞ではなく、より実際の乳房環境に近い状態を作るため、乳腺線維芽細胞を使用した。乳腺線維芽細胞の培養条件や反応性を確認し、安定して乳腺線維芽細胞の培養を行える体制を確立した。さらに、三次元培養系での生着率や増殖能を確認し、三次元培養系での培養の適正化を行った。その後、がん細胞と乳腺線維芽細胞の共培養(三次元培養)系を用い、エストロゲン枯渇条件(アロマターゼ阻害薬疑似条件)において、がん細胞(MCF7、T47D)、乳腺線維芽細胞のそれぞれの遺伝子発現の変化と代謝物の変化を解析するため、培養後の細胞と培養上清の回収をおこない、候補分子、候補パスウェイの同定のため、RNAシーケンスとプロテオミクス、メタボロミクスを用いて解析を行った。

さらに、mTOR阻害薬であるエベロリムスの治療効果や治療抵抗性に関与する分子、パスウェイを検討するため、両面培養システムを用いて異なるエベロリムス濃度における乳癌細胞と乳腺由来線維芽細胞の反応について検討を行った。3つの異なる濃度を用いて三次元培養を行い、培養上清とRNA回収を行い、それぞれ代謝産物のメタボローム解析、RNAシーケンスによる発現プロファイル解析とパスウェイ解析を行った。ホルモン療法の治療効果に関与すると考えられる候補分子、候補シグナルパスウェイの解析のほか、エベロリムスの治療効果や治療抵抗性に関与すると考えられる分子、パスウェイの検討を行った。

術前におけるホルモン療法と分子標的治療薬(CDK4/6阻害薬)の治療効果や治療抵抗性に関与する分子やパスウェイについて解析を行うため、遅延していた臨床試験の促進(各医療機関とのミーティングやレターの送付)を行い、登録と登録患者の治療が完了した。臨床的結果についてサンアントニオブレストカンサーシンポジウム2022において発表した。組織検体と血液検体の回収を行った。今回の臨床試験結果は、術前ホルモン療法の治療効果において、CDK4/6阻害薬による上乗せは認められないという結果となったが、ホルモン療法+CDK4/6阻害薬の治療効果や治療抵抗性に関与する分子やパスウェイについて解析を行うため、治療前後の病理組織を集積した。腫瘍組織は免疫多重染色を用いた間質応答の解析や乳癌の分子細胞学的解析を行う。両面培養で得られた結果と腫瘍組織を用いて得られた結果を統合解析し、ホルモン療法にCDK4/6阻害薬を追加することにより、治療効果が改善される症例群を抽出するためのシステムを作成する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueno T	4. 巻 9
2. 論文標題 Biomarkers of neoadjuvant/adjuvant endocrine therapy for ER-positive /HER2-negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chin Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/cco-20-165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shibayama T, Low SK, Ono M, Kobayashi T, Kobayashi K, Fukada I, Ito Y, Ueno T, Ohno S, Nakamura Y, Takahashi S.	4. 巻 180
2. 論文標題 Clinical significance of gene mutation in ctDNA analysis for hormone receptor-positive metastatic breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Res Treat.	6. 最初と最後の頁 331-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-019-05512-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yeo Winnie, Ueno Takayuki, Lin Ching-Hung, Liu Qiang, Lee Kyung-Hun, Leung Roland, Naito Yoichi, Park Yeon Hee, Im Seock-Ah, Li Huiping, Yap Yoon Sim, Lu Yen-Shen	4. 巻 177
2. 論文標題 Treating HR+/HER2- breast cancer in premenopausal Asian women: Asian Breast Cancer Cooperative Group 2019 Consensus and position on ovarian suppression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 549 ~ 559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-019-05318-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lin Ching-Hung, Yap Yoon Sim, Lee Kyung-Hun, Im Seock-Ah, Naito Yoichi, Yeo Winnie, Ueno Takayuki, Kwong Ava, Li Huiping, Huang Shu-Min, Leung Roland, Han Wonshik, Tan Benita, Hu Fu-Chang, Huang Chiun-Sheng, Cheng Ann-Lii, Lu Yen-Shen, The Asian Breast Cancer Cooperative Group	4. 巻 111
2. 論文標題 Contrasting Epidemiology and Clinicopathology of Female Breast Cancer in Asians vs the US Population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JNCI: Journal of the National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 1298 ~ 1306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnci/djz090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ueno, T., Imoto, S., Futamura, M., Toi, M., Fujiwara, Y., Im, Y. H., Im, S. A., Ahn, S. G., Lee, J. E., Park, Y. H., Wang, K., Bi, X., Liu, G., Sim, S. H., Takao, S., Saito-Oba, M., Kitagawa, Y., Nishimura, M.
2. 発表標題 International retrospective cohort study of locoregional and systemic therapy in oligometastatic breast cancer (OLIGO-BC1)
3. 学会等名 2020 ASCO Virtual Scientific Program (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueno, T.
2. 発表標題 Role of multigene assays to guide decisions for neoadjuvant therapy
3. 学会等名 Global Breast Cancer Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野貴之
2. 発表標題 新たな時代に期待する”ホルモンと癌”
3. 学会等名 第20回関東ホルモンと癌研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueno T, Chow L.W.C., Han W, Chiun Huang S, Mann G.B., Morita S, Haga H, Fakhrejahani E, Kobayashi T, Bando H, Inoue K, Tokiwa M, Suwa H, Aruga T, Minamiguchi S, Yamada Y, Tanabe Y, Takada M, Yamashita T, Iwata H, Chung C-F, Takahara S, Tokunaga E, Imoto S, Lee E.S., Sagara Y, Kim J.H., DeBoer R.H.,Toi M.
2. 発表標題 Neoadjuvant hormonal therapy plus palbociclib versus hormonal therapy plus placebo in women with operable, hormone sensitive and HER2-negative primary breast cancer
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸井 雅和 (TOI Masakazu) (10207516)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	清谷 一馬 (KIYOTANI Kazuma) (30433642)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 免疫ゲノム医療開発プロジェクト・主任研究員 (72602)	
研究分担者	杉本 昌弘 (SUGIMOTO Masahiro) (30458963)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	LOW SIEWKEE (LOW Siew-Kee) (40634720)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター リキッドバイオプシーシステム開発グループ・研究員 (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------