

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09070

研究課題名(和文) HER2標的薬に対する乳癌細胞の獲得耐性克服を目指した治療戦略の開発

研究課題名(英文) Treatment strategy overcoming HER2 targeted drug resistance

研究代表者

枝園 忠彦 (Shien, Tadahiko)

岡山大学・大学病院・研究准教授

研究者番号：30509451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TrastuzumabおよびT-DM1のそれぞれ両者に対する複数の耐性細胞株を樹立し、検討を行った結果、HER2標的薬耐性細胞株においてSrc familyのYes1 (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase)が増幅・活性化していることが明らかとなった。そして、Src阻害剤であるDasatinibをTrastuzumabと併用投与することでHer2/Aktといった細胞内シグナルの抑制が認められ、Trastuzumab/Lapatinibに対する耐性が解除されることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集学的治療を行う乳癌治療においては効果予測に基づく薬物選択が最も重要である。がん遺伝子HER2が増幅している乳癌と診断される新規患者は年間約2万人にのぼり、治療としてHER2標的薬が使用されている。転移乳癌ではこれらの薬剤を効果的に長期間使用することが予後の改善をもたらす。しかし治療経過においてほぼ全例にHER2標的薬に対する耐性が獲得され、より悪性度が高い腫瘍となり治療に難渋することが知られている。そのため、耐性の克服はHER2陽性乳癌の治療成績の向上における大きな課題である。本研究結果からHER2陽性乳癌においてHER2標的薬に対する耐性機序に基づいた治療戦略の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：We newly established a trastuzumab/T-DM1-dual-resistant cell line and analyzed the resistance mechanisms in this cell line. At first, the T-DM1 effectively inhibited the YES1-amplified trastuzumab-resistant cell line, but resistance to T-DM1 gradually developed. YES1 amplification was further enhanced after acquired resistance to T-DM1 became apparent, and the knockdown of the YES1 or the administration of the Src inhibitor dasatinib restored sensitivity to T-DM1. Our results indicate that YES1 is also strongly associated with T-DM1 resistance after the development of acquired resistance to trastuzumab, and the continuous inhibition of YES1 is important for overcoming resistance to T-DM1.

研究分野：乳癌外科

キーワード：転移乳がん HER2陽性 薬剤耐性 分子標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来悪性度が高く予後の悪いサブタイプとされていた HER2 陽性乳癌に対する治療は、HER2 標的薬の開発により飛躍的に改善されてきた。HER2 陽性転移乳癌治療における薬物療法は一次治療として Pertuzumab + Trastuzumab + Docetaxel 併用療法が使用され奏効率 (80%)、無増悪生存期間 (PFS) の中央値が 30 か月、全生存期間 (OS) の中央値が 56.5 か月と非常に良好な結果が報告されている。その後、2 次治療では Trastuzumab に微小管重合体阻害薬誘導体の Emtansine を結合させた抗体薬物複合体 (T-DM1) の奏効率 (43.6%)、PFS (中央値 9.6 か月)、Capecitabine + Lapatinib の併用療法では奏効率 (43.6%)、PFS (中央値 9.6 か月) であった。3 次治療以降の HER2 標的薬の効果については Trastuzumab や Pertuzumab と他の抗がん剤や新規薬剤 DS-8201 の効果を検証する試験が現在進行中である。また Neratinib は、術後療法として Trastuzumab 終了後に追加投与することで予後改善が報告され、今後転移乳癌に対しても効果が期待される。しかしここで問題となるのは、一次治療で 20%、二次治療で半数以上、最終的にはほぼ全ての症例において認められる HER2 標的薬に対する耐性である。多数ある HER2 標的薬を長期間・効果的に選択投与し、究極的には治癒を可能とするためには、HER2 陽性乳がん細胞内シグナルの多様性を考慮した治療法の確立、HER2 標的薬治療に対する獲得耐性の克服、が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、HER2 標的薬に対する獲得耐性を克服するため、耐性機序に着目した HER2 陽性乳癌に対する新たな治療戦略の開発を目指す。我々はこれまで HER2、EGFR など分子標的薬に対する獲得耐性の機構の解明に、細胞培養時の薬剤曝露濃度を調節した独自の方法で薬剤耐性細胞株を作成し成功している。HER2 阻害薬に対する耐性機序としての Yes1 遺伝子の増幅、活性化の発見もその一つであり、同様の方法で HER2 陽性乳癌におけるさまざまな HER2 標的薬の耐性機序を検討する。

3. 研究の方法

#1. HER2 標的薬耐性細胞株の樹立と耐性機序の解明

HER2 陽性乳癌細胞株に対し、我々が確立した薬剤曝露法である Step-wise 法、High-dose 法により HER2 標的薬 (T-DM1, DS-8201) を曝露し耐性細胞株を作成する。次に、これらの細胞株における耐性機序を検討する。はじめに従来の我々の知見から予測される耐性機序として HER2 および Yes1 を中心とした関連遺伝子の変異・コピー数・発現変化、細胞内シグナル蛋白および EMT marker, Stem cell marker, p-glycoprotein 等の発現を検討する。さらに上記以外の新しい耐性機序を見つけるため、耐性細胞の発現アレイ、融合遺伝子検索にも有効な RNA-seq を行う。

#2. 獲得耐性例の治療法および耐性化の抑制法の開発

各薬剤の耐性に関与するシグナルの強制発現・抑制による薬剤感受性の獲得・復活を、遺伝子導入技術やノックダウン、および阻害剤を用いて in vitro で検討する。

4. 研究成果

HER2 標的薬耐性細胞株の樹立と耐性機序の解明

HER2 陽性乳癌細胞株に対し、我々が確立した薬剤曝露法である Step-wise 法、High-dose 法により HER2 標的薬 (T-DM1) を曝露し耐性細胞株を作成した。

HER2 標的薬に対する獲得耐性のメカニズムを明らかにするため Trastuzumab および Lapatinib そして Trastuzumab および T-DM1 のそれぞれ両者に対する複数の耐性細胞株を樹立し、検討を行った (Takeda T, et al. PLoS One 2017, Fujihara M, et al. 2021)。その結果、HER2 標的薬耐性細胞株において Src family の Yes1 (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) が増幅・活性化していることが明らかとなった。そして、Src 阻害剤である Dasatinib を Trastuzumab と併用投与することで Her2/Akt といった細胞内シグナルの抑制が認められ、Trastuzumab/Lapatinib に対する耐性が解除されることを突き止めた (図 1, 2)。

そして同様に、Trastuzumab/T-DM1 に対する耐性細胞株においてもさらに Yes1 の発現が高値となっており、Trastuzumab/Lapatinib 耐性同様に Trastuzumab/T-DM1 耐性においても Dasatinib がこれを解除することを解明した (図 1, 2)。これらより、複数の HER2 標的薬の耐性機序において Yes1 が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

これらの結果から耐性機序の解明が HER2 陽性乳癌の治療成績を改善させうると考えた。

図1 HER2標的薬剤耐性細胞株におけるYes1の発現とDasatinibの効果

BT-474-R: Trastuzumab耐性, BT-474-R-TDMR:Trastuzumab/T-DM1耐性

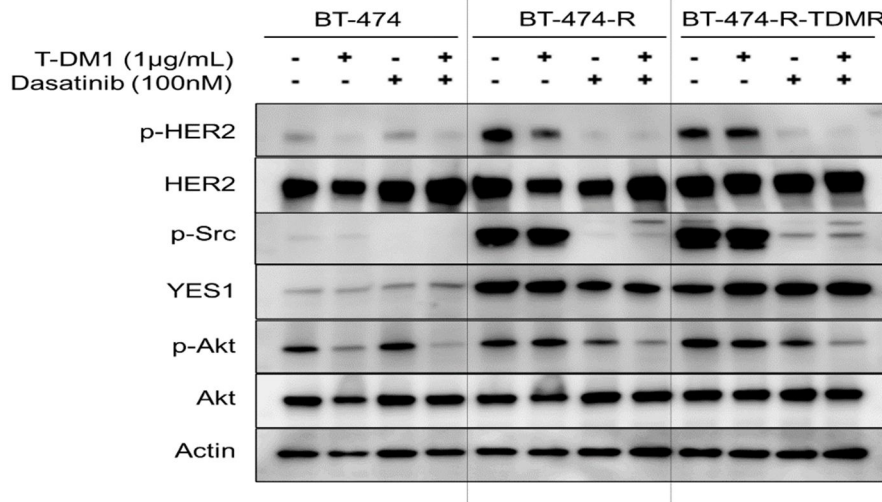


図2 HER2標的薬剤耐性細胞株に対するDasatinibの耐性解除効果

Cell viability assay

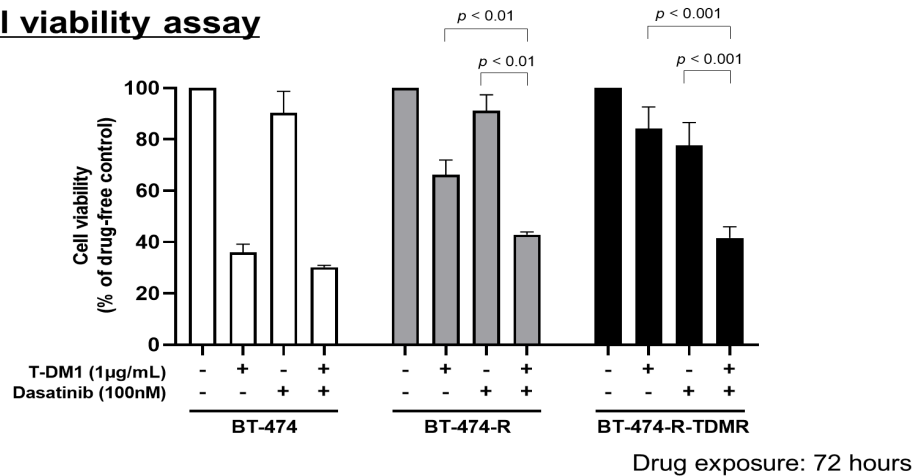
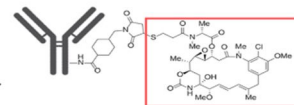
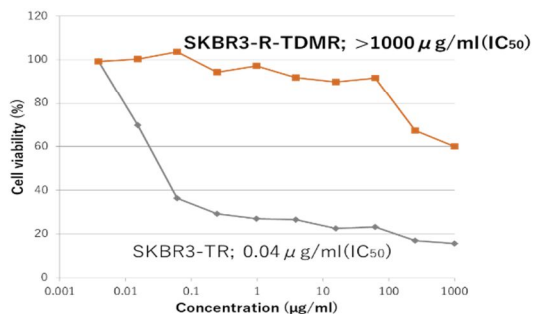


図3 HER2標的薬剤耐性乳癌細胞株 SKBR3-R (Trastuzumab耐性) SKBR3-R-TDMR (Trastuzumab/T-DM1耐性)

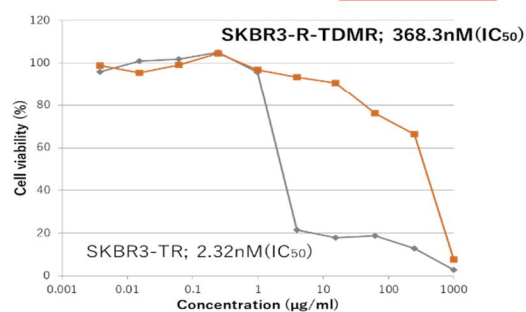
T-DM1 = Trastuzumab + S-Me-DM1



<T-DM1>



<S-Me-DM1>



<引用文献>

Fujihara M, Shien T, Shien K, et al. YES1 as a Therapeutic Target for HER2-Positive Breast Cancer after Trastuzumab and Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) Resistance Development. Int J Mol Sci. 2021 Nov 26;22(23):12809. doi: 10.3390/ijms222312809.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Tatsuaki, Yamamoto Hiromasa, Suzawa Ken, Tomida Shuta, Miyauchi Shunsaku, Araki Kota, Nakata Kentaro, Miura Akihiro, Namba Kei, Shien Kazuhiko, Soh Junichi, Shien Tadahiko, Kitamura Yoshihisa, Sendo Toshiaki, Toyooka Shinichi	4. 巻 111
2. 論文標題 YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in amplified breast and lung cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 849 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14289	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 -

1. 著者名 Fujihara Miwa, Shien Tadahiko, Shien Kazuhiko, Suzawa Ken, Takeda Tatsuaki, Zhu Yidan, Mamori Tomoka, Otani Yusuke, Yoshioka Ryo, Uno Maya, Suzuki Yoko, Abe Yuko, Hatono Minami, Tsukioki Takahiro, Takahashi Yuko, Kochi Mariko, Iwamoto Takayuki, Taira Naruto, Doihara Hiroyoshi, Toyooka Shinichi	4. 巻 22
2. 論文標題 YES1 as a Therapeutic Target for HER2-Positive Breast Cancer after Trastuzumab and Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) Resistance Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12809 ~ 12809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312809	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	豊岡 伸一 (Toyooka Shinichi) (30397880)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	山本 寛斉 (Yamamoto Hiromasa) (40467733)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	諏澤 憲 (Suzawa Ken) (90839713)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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