

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09079

研究課題名（和文）ホルモン受容体陽性乳癌におけるHER3の分解制御因子の解明と治療効果との相関性

研究課題名（英文）Regulatory factors for HER3 degradation in hormone receptor-positive breast cancer and its correlation with therapeutic efficacy

研究代表者

佐治 重衡 (Saji, Shigehira)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80446567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HER3とERの分解に関わるE3 リガーゼの1つであるNEDD4が、ホルモン受容体陽性HER2陰性早期乳癌患者群の予後予測因子になる可能性を見出した。この働きはHER3を介したのではなく、ER発現量の蓄積を介していると考えられた。NEDD4ノックダウン乳癌細胞株（MCF-7, T47D）では、エストロゲン欠乏やタモキシフェン刺激に対してより強く細胞増殖抑制が認められた。NEDD4発現は、ホルモン受容体陰性早期乳癌患者群では予後予測因子にならなかったことから、ホルモン療法の感受性亢進を介した、予後予測因子（ホルモン療法の効果予測因子）としての役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン療法は乳癌患者さんの約70%で使用される重要な治療薬です。このホルモン療法はエストロゲン受容体（ER）を介して効果を発揮しますが、本研究では乳癌細胞内のERの分解を促進するE3リガーゼのNEDD4に注目し、その役割を検討しました。結果として、NEDD4が少ない乳癌では、ERの量が高く維持されることによって、ホルモン療法の効果が良くなることがわかりました。また実際の患者さんの乳癌サンプルで検討すると、NEDD4が少ない乳癌では、再発が少なく、予後も良いことが確認できました。今後は、NEDD4の発現制御や機能制御により、ホルモン療法の効果を高めることができないかを検討していきます。

研究成果の概要（英文）：We found that NEDD4, one of the E3 ligases involved in the degradation of HER3 and ER, seems to be a prognostic factor in the hormone receptor positive HER2 negative early breast cancer patients. The NEDD4 knockdown breast cancer cell line (MCF-7, T47D) showed stronger inhibition of cell proliferation in response to estrogen deprivation and tamoxifen stimulation. NEDD4 expression was not a prognostic factor in hormone receptor-negative early-stage breast cancer patients, suggesting that NEDD4 may play a role as a prognostic factor (predictive factor of response to hormone therapy) via increased sensitivity to hormone therapy due to ER accumulation.

研究分野：腫瘍内科学（乳癌）

キーワード：乳癌 NEDD4 E3 リガーゼ ER

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌特異的に高発現している分子を標的として、その分子に作用する標的薬を用いた癌薬物治療が臨床現場に定着してきた。一方で、標的分子が発現していても、その奏効性が100%になることはない。これは、alternative pathwayの存在や標的分子の遺伝子変異にともなう構造変化などによることが多いが、あまり認識されていなかった機序として標的分子の蛋白量を制御する分解機構の変化が関わっている可能性がある。一方で、分解機構の変化が治療効果を高める事例もある。ラパチニブは乳癌細胞に高発現している細胞膜型受容体 HER2 (human epidermal growth factor2) のリン酸化を阻害することで細胞増殖シグナル伝達を阻害する分子標的薬だが、HER2の分解を抑制し HER2を細胞膜表面に蓄積する効果も有している。このため、ラパチニブに抗 HER2 分子標的薬であるトラスツズマブを併用すると、蓄積された HER2 を標的として抗腫瘍効果が高まることが知られている (M Scaltriti. *Oncogene* 2009)。このように標的分子の分解機構の変化は治療効果に影響を与え得る。

(2) 乳癌は癌細胞に高発現しているエストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ER) や HER2 を標的とした治療が成功することで、特異的分子を標的とした治療法をリードしてきた。最近では HER2 のファミリー受容体である HER3 を標的とした ADC; U3-1402 の臨床開発が進むなど、個別の分子を標的とした個別化治療の選択肢がさらに増える可能性がある。この HER3 に関して、我々はエストロゲンが ER 陽性乳癌培養細胞の HER3 の分解速度を亢進することを見いだした (Suga J. *Biochem Biophys Rep*, 2018.) (図1)。ADC は抗体に殺細胞性抗腫瘍薬をリンカーで結合した抗体薬であり、標的表面抗原に結合した ADC は細胞内にとりこまれ、分解されることで殺細胞性抗腫瘍薬が細胞内に拡散し、効果を発揮する。この機序から、HER3 の分解速度亢進やその変化は HER3 を標的とした ADC 治療に影響を与える可能性が高い。また、2量体形成のパートナーである HER2 を標的とした治療や、エストロゲン/ER との関連性からホルモン療法の効果にも影響を与える可能性がある。高発現した HER3 は HER2 と強制的に二量体化することで増殖シグナルを伝達し抗 HER2 療法に対する耐性化が生じることが知られている (Sergina NV. *Nature* 2007)。さらに、ER は膜レセプターからの細胞増殖シグナルとクロストークすることで、女性ホルモン療法への耐性化を起こすこともよく知られている (Roop RP. *Future Oncol* 2012)。

このような HER3、HER2 と ER の細胞内シグナルの繋がりから、HER3 の分解機構の解明とその制御は、他の分子標的治療薬の効果への関連性や、HER3 そのものを標的とした治療薬開発において重要な知見を与えると考えた。

2. 研究の目的

(1) 乳癌細胞における HER3 の分解制御機構を解明する。特にホルモン受容体陽性乳癌での制御因子と、ER との関係性を明らかにする

(2) HER3 及び、その分解に関与する制御因子の予後因子としての役割を検討するとともに、薬物療法に対する効果予測因子の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者サンプルにおける予後・効果予測因子としての探索

本学の医療-産業トランスレーショナルリサーチセンターで構築した、乳がん患者組織の網羅的遺伝子発現 (mRNA) 解析データセットの約 750 例 (2007-2017 年手術症例) を母集団として解析対象因子を固定するための予備実験をおこなった。その結果から、stage I/II、ホルモン受容体陽性 HER2 陰性早期乳癌を抽出し、基本データセットとした。対照群として、ホルモン受容体陰性早期乳癌についてもデータセットを作成した。これらに臨床病理学的情報を追加し、症例識別情報を削除した上で、本研究における独立した解析用データを構築した。14,400 遺伝子についての発現解析が可能なデータセットになっている。

(2) 乳癌細胞における発現抑制、分子生物学的動態解析

ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞株 MCF-7 と T47D を用いて実験をおこなった。エストロゲン添加実験においては、phenol red-free DMEM と dextran-coated charcoal 処理をした FBS を使用した。1 nM estradiol (E2), 2 micro M 4-Hydroxy(OH) tamoxifen を基本濃度としている。NEDD4 の発現抑制実験においては、pRS112-U6-sh-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro plasmid に shRNA sequence CCGGAGAATTATGGGTGTCAA (sh-NEDD4#1) と CCGTCAAGTAACTTGGATGTT (sh-NEDD4#2), そしてこれらが入っていない no shRNA (sh-control) の入った 3 つのプラスミド作成し、細胞内導入をおこなった。細胞増殖実験では Cell Counting Kit-8 を使用し、蛋白発現解析では、ウエスタンブロッティングをおこなった。使用した抗体は、NEDD4, HER3, PTEN, phospho-HER3 (pHER3[Y1289]), RAS, ERK1/2, phospho-ERK1/2 (pERK1/2[T202/Y204]), AKT, phospho-AKT (pAKT[S473]),

ER, -actin である。

(3) 統計解析

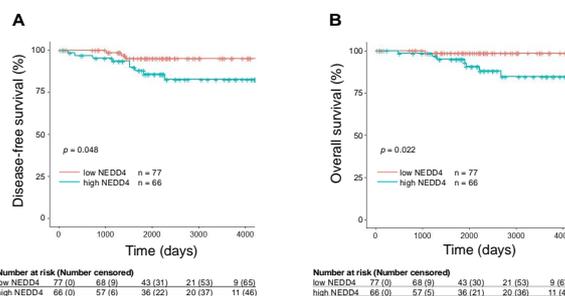
R version 4.0.3.を用いて、receiver operating characteristic (ROC) 曲線解析, Kaplan-Meier 生存曲線解析, log-rank 解析, Student's t-test をおこなった。

4. 研究成果

(1) これまでのヒト乳癌細胞株を用いた研究から、HER3 の分解に関わるいくつかのコピキチンリガーゼや分解促進因子、2量体パートナーなどがその生物学的特性に影響することを見出してきている。乳がん患者組織由来の網羅的遺伝子発現解析データセット(約 750 例)を用いて、HER3, ER, Nedd4-1 をはじめとした 7 つの因子の発現状況と、患者の予後、薬剤奏功性との相関について予備実験として検証した。このデータセットは mRNA 発現解析となるため、タンパク質の量的状況を反映しているとまではいえないが、将来的に免疫染色解析ベースでの臨床サンプル解析をするにあたり、より検証すべき患者群と優先する標的因子を決めることも目的としている。HER3 mRNA 転写量が測定されている約 750 検体のうち、398 検体(症例)で検討に必要な臨床病理学的情報が確定できた。ER と HER3 の mRNA の転写量に相関性があることは既知だが、この 398 例においても同様の傾向を認め、このデータセットが一般化可能であることが確認できた。次にホルモン陽性乳癌 209 例(Stage 0~II)に対象をしばり 7 つの候補標的因子について検討したところ、ER 発現、HER3 発現、Nedd4-1 発現の組み合わせパターンで予後と相関するサブセットがあることが確認された。また、他の候補標的因子にも組み合わせによって予後との相関が見られるものがあった。この中で、単独で予後との相関関係があるものとして、HER3 は候補とならず、NEDD4 が有望であることが確認された。このため、NEDD4 を標的因子として解析をすすめることとした。

(2) 前述のデータセットのなかから、予後・治療効果予測因子の検証として適切と思われる、

stage I/II、ホルモン受容体陽性 HER2 陰性早期乳癌 143 例を抽出し、NEDD4 発現との予後関連解析をおこなった。ROC 曲線からカットオフ値を決定し、その上下で 66 例の NEDD4 high 群と、77 例の NEDD4 low 群にわけて解析をおこなった。DFS (disease free survival) ($p = 0.048$)、OS (overall survival) ($p = 0.022$) のいずれにおいても、NEDD4 low 群の予後が良好であることが確認された。なお、ホルモン受容体陰性早期乳癌のデータセットでは、NEDD4 発現高低の 2 群間で予後の差は認められなかった。

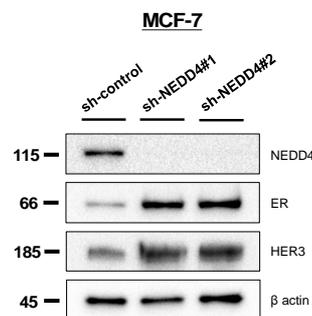


(3) NEDD4 の乳癌細胞における分子生物学的な役割を検証するための実験として、MCF-7 細胞

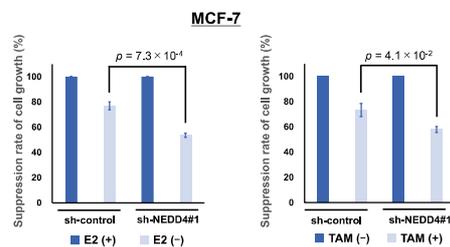
に sh-control, sh-NEDD4#1, sh-NEDD4#2 の 3 種類のノックダウン用プラスミドを導入し、3 つの導入細胞株での蛋白発現解析をおこなった。NEDD4 のノックダウンは効率的におこなわれており、それにより ER と HER3 の発現増加が確認された。ER と HER3 それぞれに対しての E3 リガーゼである NEDD4 の抑制により、分解が阻害された結果、それぞれの蛋白質が蓄積したと考えられる。

なお、この時点での RAS, AKT, PTEN については、発現変化はなく、NEDD4 のノックダウンによる ER や HER3 の蓄積そのものは、下流シグナルには影響しないことは確認している。同様の実験を T47D 細胞でも実施した結果、ER に関しては同様に発現が増加し、HER3 についてはわずかな増加であった。HER3 における細胞株での違いは、HER3 分解についての E3 リガーゼとして、T47D では NEDD4 以外にも主要なものがありこれが代償しているのではないかと考察している。

Sh-control 導入細胞に比較し、sh-NEDD4 導入細胞においては、1nM E2 刺激において、リン酸化 ERK1/2 (T202/Y404) の発現量が増加しており、ER の発現量増加は、その下流シグナルの増強に反映されていることが確認できた。



(4) アロマターゼ阻害剤内服による治療のモデルとして Estradiol (E2) のオン・オフを用い、タモキシフェン内服治療については、代謝産物である 4-OH tamoxifen の付加をすることで、細胞増殖抑制への NEDD4 の影響を検証した。Sh-control を導入した MCF-7 細胞と比較し、NEDD4 をノックダウンした MCF-7 細胞においては、E2 を欠乏させることによる増殖抑制が顕著にみられた。4-OH tamoxifen の付加についても、同様にノックダウン細胞でより強く細胞増殖抑制が認められた。T47D 細胞における同様な実験においても、同じ傾向の結果が得られた。これらのことから、NEDD4 ノックダウンにより ER が蓄積したことにより、ER の機能抑制治療の効果が強く出現するようになったと考えられる。



まとめ

HER3 の分解機構に関わる E3 リガーゼの 1 つである NEDD4 が、ホルモン受容体陽性早期乳癌患者の予後予測因子になる可能性を見出した。この働きは HER3 を介したのではなく、ER 発現量の蓄積を介していると考えられ、これにより ER の下流シグナルの亢進も確認された。NEDD4 ノックダウン乳癌細胞株では、E2 欠乏や、タモキシフェン刺激に対してより強く細胞増殖抑制が認められたことから、NEDD4 の低下により、ホルモン感受性が亢進すると考えられた。ホルモン受容体陰性早期乳癌患者群では、NEDD4 発現は予後予測因子にならなかったことから、ホルモン療法の感受性亢進を介した、予後予測因子(ホルモン療法の効果予測因子)としての役割を果たしていると考えられた。(本研究の最終成果は現在論文投稿中である)

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ohno S, Saji S, Masuda N, Tsuda H, Akiyama F, Kurosumi M, Shimomura A, Sato N, Takao S, Ohsumi S, Tokuda Y, Inaji H, Watanabe T, Ohashi Y. | 4. 巻 186 |
| 2. 論文標題 Relationships between pathological factors and long-term outcomes in patients enrolled in two prospective randomized controlled trials comparing the efficacy of oral tegafur-uracil with CMF (N-SAS-BC01 trial and CUBC trial) | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Breast Cancer Res Treat | 6. 最初と最後の頁 135-147 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-020-06018-1 | 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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 名取穰, 須賀淳子, 徳田恵美, 立花和之進, 今井順一, 本間玲子, 阿左見祐介, 野田勝, 佐々木栄作, 渡邊慎哉, 大竹徹, 佐治重衡 |
| 2. 発表標題 Ubiquitin ligase NEDD4 promotes degradation of estrogen receptor in breast cancer and affects prognosis |
| 3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会 |
| 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 |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|----|
| 研究協力者 | 名取 穰 (Natori Yutaka) | 福島県立医科大学・医学部・助教 (21601) | |

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 |
|---------|---------|