

平成23年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591546

研究課題名(和文) 乳がんに対する補助化学療法の個別化因子の選定に関する検討

研究課題名(英文) Identification of predictive factors of adjuvant chemotherapy for breast cancer

研究代表者

平 成人 (TAIRA NARUTO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：50467734

研究成果の概要(和文)：【目的】 乳癌に対する化学療法剤，タキサン系薬剤の効果予測因子を確立し，効率的ながん個別化治療を推し進める．特に Microtubule-associated proteins-tau (MAPT) とタキサン系薬剤の感受性の相関について検討を行う．【方法】 乳癌細胞株 12 株を用いて，MAPT の発現解析 (mRNA, タンパク) を行い，タキサン系化学療法剤およびその他の化学療法剤の感受性との関連を検討．また，ER シグナルの modification (siRNA による ER 発現の強制抑制性，各種ホルモン療法剤による ER シグナルの阻害) を行い，MAPT 発現の変化，タキサン系薬剤の感受性変化を検討．【結果】 乳癌細胞株において，MAPT の mRNA の発現とタンパク発現には乖離が見られた．mRNA の発現とタキサン系薬剤の感受性には，有意な相関関係はない．しかしウェスタンブロットにより同定した，MAPT の 70KDa 以下の isoform の発現は，タキサン系薬剤の感受性を規定する有意な因子であった．siRNA による ER knock down により，MAPT isoform 発現は低下し，同時にタキサン系薬剤の感受性の増加した．ホルモン療法剤の影響に関し tamoxifen はその ER 刺激作用により，MAPT タンパクの発現上昇作用を認め，タキサン系薬剤とは拮抗作用を示した．一方，pure-anti estrogen agent である ICI182780 は MAPT isoform の発現を低下させ，タキサン系薬剤との併用により相乗効果を示した．【結論】 乳癌細胞株において，タキサン系薬剤の感受性には 70KDa 以下の MAPT isoform が強い影響を及ぼす．ER 陽性乳癌において MAPT の発現は ER シグナルの影響を受け，ICI182780 は ER シグナルの遮断により，タキサン系薬剤の感受性を増加させる．

研究成果の概要(英文)： **Background:** Taxanes are important drugs in treatment of breast cancer. These drugs bind to tubulin and suppress spindle microtubule dynamics, which leads to cell cycle arrest in the G2/M phase followed by apoptosis. However, resistance to taxane therapy prevents some patients from benefiting from these drugs. Several mechanisms of taxane resistance have been described, including the involvement of microtubule-associated protein-tau (MAPT). MAPT binds to the same pocket as taxanes in microtubules and obstructs the function of the drug. Estrogen receptors (ER) are transcriptional factors that play an important role in the development and progression of breast cancer. However, the relationship between ER and MAPT in breast cancer is not entirely clear. In this study we examined the correlation between MAPT expression and the sensitivity of human breast cancer cells to taxanes, and the relationship between ER and MAPT at the protein level in these cells. We also examined combination therapy with hormone drugs and taxanes. **Methods:** The correlation between MAPT expression and sensitivity to taxanes was examined in 12 human breast cancer cell lines using real time PCR, western blotting analysis and an MTS assay. Following small interfering RNA (siRNA) knockdown of MAPT expression, the alteration of cellular sensitivity to taxanes was examined by MTS assay, flow cytometry and immunofluorescence. To examine the relationship

between ER and MAPT, ER expression was knocked down with siRNA or stimulated with 17- β -estradiol in MAPT- and ER-positive cell lines (MCF-7 and ZR75.1, respectively). The cells were also treated with hormone drugs (tamoxifen and ICI182,780) and changes in MAPT protein expression were examined. **Results:** Six cell lines showed high MAPT mRNA expression and four showed high MAPT protein expression; that is, expression at the mRNA level did not always correlate with that at the protein level. MAPT mRNA expression did not correlate with taxane resistance, but expression of MAPT protein isoforms under 70 kDa correlated with taxane resistance. Downregulation of MAPT increased sensitivity to taxanes. MAPT protein expression was decreased by ER knockdown and increased by 17- β -estradiol stimulation. The MAPT protein level was also increased by tamoxifen, but decreased by ICI182,780. Combination treatment of taxanes with ICI182,780 showed a strong synergistic effect, but similar treatment with tamoxifen had an antagonistic effect in both cell lines. **Conclusions:** Expression of MAPT protein isoforms under 70 kDa correlates with taxane resistance in breast cancer cells. MAPT expression is influenced by ER in breast cancer and ICI182,780, a selective ER inhibitor, can reverse the resistance to taxanes in both MAPT- and ER-positive breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：乳癌

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般・乳腺外科学

キーワード：乳癌，タキサン，エストロゲン受容体，効果予測因子，MAP-tau，タモキシフェン，フルベストラント

1. 研究開始当初の背景

(1)乳癌術後補助化学療法 of 歴史

乳癌は比較的早期より微小転移を形成することが知られている。この現象は乳房に局限した早期乳癌の切除例においても、ある一定の確立で遠隔再発を生じる臨床データから示されている。乳癌の補助薬物療法は、乳癌の手術前後に薬物療法（抗癌剤，ホルモン剤）を行うものであり、微小転移の消失を目的とし乳癌再発率の低下さらには乳癌死亡率の

低下を目的とする。乳癌術後補助療法の最初の臨床試験は、1960年代に行われ、術後thiotepaの静脈内投与はplacebo群と比較し、リンパ節転移を有する閉経前女性において、有意な無再発期間と生存期間の延長が認められた。

(2)標準的薬物療法

1970年代, cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil からなる多剤併用CMFの有効性が報告され、歴史的に本邦においても術後補助化学療法が標準化した。その後のアンス

ラサイクリンを含む数種類の多剤レジメン (AC, doxorubicin and cyclophosphamide; CEF, cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil; CAF, cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil) と CMF との比較試験の結果, アンストラサイクリンを含む多剤レジメンは CMF と同等, あるいは CMF より優れるとの報告がなされた. Oxford overview はアンストラサイクリンレジメンと CMF レジメンの比較試験を総括し, 乳癌術後の補助化学療法として, アンストラサイクリンを含む多剤レジメンが今日の標準治療として普及するに至った. タキサン系薬剤 (Docetaxel, Paclitaxel) は乳癌臨床においてアンストラサイクリン系薬剤と並び重要な薬剤である. 術後補助療法としては, アンストラサイクリンレジメンへのタキサン系薬剤の追加による予後改善が報告されている. しかしながら, タキサン系薬剤の追加は治療期間の延長, 副作用 (血球減少, 浮腫, しびれ) の増加等の問題を有しており, その適応決定は大きな臨床的関心事項である.

(3) 個別化治療の重要性

これまでの臨床試験の主眼は効果の高い薬剤の選定や組み合わせであり, 治療に伴う患者の肉体的, 経済的負担は膨らむ一方である. 現在, タキサンの追加投与は乳癌術後で比較的再発のリスクが高い症例 (リンパ節転移陽性, 腫瘍径が大きいもの, ホルモン受容体陰性等) に対し, その効果に関わらず投与されているが, どの様な症例に対しタキサン系薬剤を追加するべきかの世界的なコンセンサスは現在のところ存在しない. がんの個別化治療により, 効率的で副作用の少ない治療を実践するには効果予測因子としての molecular marker の確立が必須である.

2. 研究の目的

(1) 現在までの効果予測因子

本研究の目的は乳癌に対する化学療法剤, タキサン系薬剤の効果予測因子を確立し, 効率的ながん個別化治療を推し進めることにある. これまでの乳癌における一般的な抗癌剤感受性予測因子としては, ホルモン受容体の発現, 組織グレード等がある. しかし, これらは特定の薬剤を選定する予測因子とはならない. タキサンは細胞分裂期のチューブリンに作用することで効果を示す. タキサン系薬剤に特異的な感受性予測因子としてはチューブリンの構造形態の相違が報告されているが, 感度や効率の点から臨床応用されるに至っていない.

(2) MAP-tau

MAP-tauは元来アルツハイマー病で過剰発現が認められたタンパク質である. 2005年, 乳癌に対し術前化学療法を行った約300例の検体検査 (DNA-microarray, Tissue microarray) の結果, MAP-tauが感受性予測因子として有用であることが示された. また, in vitro, in vivoの検討結果より, MAP-tauはチューブリンのタキサン結合作用部位において, タキサン系薬剤を競合阻害することが示された. MAP-tauの発現解析はタキサン系薬物の効果予測因子として現在のところ最も有望な個別化因子である. 本研究では, 乳癌臨床検体を用いて, タキサン投与の効果と特にMAP-tau発現との相関を, 後ろ向き, 前向きに検討し, MAP-tauのmolecular markerとしての妥当性を検証する.

3. 研究の方法

(1) in vitroでの検討

乳癌細胞株 12 株を用いて, MAPT の発現解析 (mRNA, タンパク) を行い, タキサン系化学療法剤およびその他の化学療法剤の感受性との関連を検討. また, ER シグナルの modification (siRNA による ER 発現の強制抑

性, 各種ホルモン療法剤による ER シグナルの阻害)を行い, MAPT 発現の変化, タキサン系薬剤の感受性変化を検討.

(2) 先行研究の妥当性検証のための, in vitro での多剤併用実験, ならびに in vivo 研究

ER 陽性株 (MCF7, ZR75-1)を用いホルモン剤 (fulvestrant, TAM, 4-hydroxyTAM) と化学療法剤 (ADM, PTX, DTX, VNR, 5-FU) の併用効果を MTS assay, Combination Index により網羅的に評価. ノードマウス皮下移植モデルで fulvestrant と DTX, ADM の併用効果を in vivo で検討.

4. 研究成果

(1) MAPT の発現のタキサン感受性

乳癌細胞株において, MAPT の mRNA の発現とタンパク発現には乖離が見られた. mRNA の発現とタキサン系薬剤の感受性には, 有意な相関関係はない. しかしウェスタンブロットにより同定した, MAPT の 70KDa 以下の isoform の発現は, タキサン系薬剤の感受性を規定する有意な因子であった.

(2) ER シグナルによる MAPT の発現制御

siRNA による ER knock down により, MAPT isoform 発現は低下し, 同時にタキサン系薬剤の感受性の増加した. ホルモン療法剤の影響に関し tamoxifen はその ER 刺激作用により, MAPT タンパクの発現上昇作用を認め, タキサン系薬剤とは拮抗作用を示した. 一方, pure-anti estrogen agent である ICI182780 は MAPT isoform の発現を低下させ, タキサン系薬剤との併用により相乗効果を示した.

(3) ホルモン療法剤によるタキサンの感受性増感効果

In vitro では fulvestrant は全ての化学療法剤と相乗効果, タモキシフェンは全ての薬剤

と拮抗. 4-hydroxyTAM はタキサン・ナベルピンと相乗, アドリアマイシン・5-FU と拮抗作用を示した. In vivo ではタキソテールと fulvestrant の併用で強い相乗効果を認めた. アドリアマイシン と fulvestrant の併用に相乗性を認めなかった.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ikeda H, Taira N, Hara F, Fujita T, Yamamoto H, Soh J, Toyooka S, Nogami T, Shien T, Doihara H, Miyoshi S. The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2010;12(3):R43. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

①池田宏国, 平 成人 他. Combination Treatment with Fulvestrant and Various Cytotoxic Agents Has a Synergistic Effect in ER-Positive Breast Cancer Cell Lines In Vitro and In Vivo. 33rd Annual CTRD-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium.

2010/12/11 アメリカ, サンアントニオ

②池田宏国, 平 成人 他. ER シグナル遮断により化学療法剤の感受性は増加するの- in vivo and vitro study -. 第 18 回日本乳癌学会学術総会. 2010/6/24 札幌 (ロイトン札幌)

③池田宏国, 平 成人 他. Microtubule associated protein-tau (MAPT) is

influenced by ER: ICI182,780, a selective ER inhibitor, down-regulates MAPT expression and reverses resistance to taxanes in MAPT- and ER-positive breast cancer cells. 32nd Annual CTRD-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium.

2009/12/11 アメリカ, サンアントニオ

④池田宏国, 平 成人 他. 乳癌細胞株における microrotubule associated protein-tau (MAPT) についての検討. 第17回日本乳癌学会学術総会. 2009/7/3 東京 (ホテル日航東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 成人 (TAIRA NARUTO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 50467734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

池田 宏国 (IKEDA HIROKUNI)
岡山大学・大学院医歯薬学研究科・大学院
生