

機関番号 : 35303

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20591561

研究課題名 (和文) トリプルネガティブ乳癌の治療法開発のための基礎的研究

研究課題名 (英文) Fundamental research on the development of treatment for triple negative breast cancer

## 研究代表者

紅林 淳一 (KUREBAYASHI JUNICHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10248255

研究成果の概要 (和文) : 乳癌患者のホルモン療法、抗HER2療法に対する治療効果を予測するため、乳癌組織におけるエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2の発現が臨床の場でルーチンに検査されている。これら3因子すべてが陰性の乳癌がトリプルネガティブ (以下TN) 乳癌と呼ばれている。TN乳癌は、ホルモン療法や抗HER2療法が無効であり、生物学的悪性度が高く、早期に遠隔転移を起こしやすく、予後が悪い。そのためTN乳癌の新たな治療法の開発が急務となっている。我々は、まず intrinsic subtype分類の4種類のサブタイプを網羅するヒト乳癌細胞株のパネルを用い、TN乳癌に特徴的な各種遺伝子の発現レベルを検討した。次に、これまでにTN乳癌に有効性が示唆されているDNA傷害性薬剤、各種分子標的薬剤の各々単独処理時の細胞増殖、細胞周期・アポトーシス、癌幹細胞 (ALDH1発現・酵素活性やマンモスフェア形成能を指標) に与える影響を検討した。その結果、epithelial-mesenchymal transitionを示すTN乳癌細胞株 (basal Bサブタイプ) は、Srcシグナル伝達阻害薬 dasatinib (G1-S移行阻害とアポトーシス誘導) やDNA障害性薬剤 エトポシド (G2/M移行阻害とアポトーシス誘導) に対して感受性が高く、両者の併用が相加的に働くことが判明した。さらに、dasatinibがbasal Bサブタイプ乳癌細胞に対し、癌幹細胞の構成比率を低下させることが世界で初めて示された。また、乳癌の臨床標本を用いSrcシグナル伝達の検討も行い、Srcシグナル伝達活性化が乳癌の遠隔転移を促進することが示された。

研究成果の概要 (英文) : Expression levels of estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 in breast cancer tissues have been routinely measured in clinics to predict responses to endocrine therapy and anti-HER2 therapy. Breast tumors expressing none of these three receptors are named as triple negative breast cancer (TNBC). TNBC responds to neither endocrine therapy nor anti-HER2 therapy, is biologically aggressive, tends to recur earlier, and renders a poor prognosis. These findings prompt us to develop new treatment strategies against TNBC. First, we investigated a protein expression profile of various genes related to TNBC characteristics in a panel of human breast cancer cell lines. Next, we studied antitumor activity, effects on cell cycle progression, apoptosis and cancer stem cell population induced by DNA-damaging cytotoxic agents and molecular targeting agents in the panel of breast cancer cell lines. These experimental results have revealed that a Src signal inhibitor, dasatinib and a DNA-damaging agent, etoposide show potent antitumor effect on breast cancer cells of basal B subtype associated with G1-S blockade and induction of apoptosis for dasatinib or G2/M retardation and induction of apoptosis for etoposide, respectively. It is indicated for the first time that dasatinib reduces a proportion of putative cancer stem cells. We also investigated clinical significance of activation of Src signaling using immunohistochemistry in patients with breast cancer. The results of this study have indicated that activation of Src signaling may increase metastatic potential of breast cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、トリプルネガティブサブタイプ、Src、エトポシド、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌患者の予後やホルモン療法、トラスツズマブ（抗 HER2 モノクローナル抗体）療法に対する治療効果を予測するため、乳癌細胞における estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2 の発現が臨床の場でルーチンに検査されている。これら3つの因子すべてが陰性の乳癌がトリプルネガティブ（以下 TN）乳癌と呼ばれている。TN 乳癌は、ホルモン療法やトラスツズマブ療法が無効であり、今のところ非特異的な抗癌化学療法のみが治療に用いられている。TN 乳癌は、生物学的悪性度が高く、早期に遠隔転移を起こしやすく、きわめて予後が悪い。そのため TN 乳癌の新たな治療法の開発が急務となっている。

(2) 最近の基礎的研究により、多くの TN 乳癌は、遺伝子発現プロファイルにより分類される basal-like サブタイプの形質を発現していることが示されている。また、家族性乳癌の原因遺伝子 BRCA1 の保因者に発生する乳癌の多くは、TN 乳癌に分類される。すなわち BRCA1 の機能異常と TN 乳癌の発生に関連性があることが推測されている。また、多くの TN 乳癌では、HER1 や c-KIT の過剰発現などが認められている。

(3) 研究代表者らは、2005 年度日本乳癌学会

国際プロジェクト班研究において「乳癌の臨床病理学的特徴の国際比較」の一環として、多施設コホート研究を行い、1) 日本人の乳癌は、欧米の乳癌に比べ basal-like サブタイプの頻度が少ないこと、2) TN 乳癌には、複数のサブタイプが存在することを見出している。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは、過去 10 年余り各種ヒト乳癌細胞株を用いた *in vitro*, *in vivo* 実験を行ってきた。今回の研究では、遺伝子発現プロファイルにより分類され 4 種類（luminal A, luminal B, basal-like, HER2+/ER-）のサブタイプの形質をもつ 7 種類のヒト乳癌細胞株（KPL-1, KPL-3C, BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-157, HCC1937, KPL-4）のパネルを用いる。

(2) TN 乳癌に特徴的とされる各種遺伝（HER1, cytokeratin 5/6, BRCA1, p53, c-KIT, など）の発現量を検討する。次に、BRCA1 の機能低下例を標的とした DNA 傷害性薬剤（cisplatin, etoposide）、Src シグナル伝達の亢進例を標的とした分子標的薬（dasatinib）を各々単独処理時の細胞増殖、細胞周期、アポトーシスに与える影響を検討する。この時、他のサブタイプに分類される乳癌細胞株に対する

効果と比較し、basal-like サブタイプ (ほぼ TN 乳癌と一致) に分類される乳癌細胞株により選択的に効果のある薬剤を選別する。さらに、DNA 傷害性薬剤と各種分子標的薬との相加・相乗効果の有無を検討する。

(3) 乳癌組織における Src シグナル伝達活性化の臨床的な役割を検討するため、臨床乳癌標本を用い免疫組織化学的検討も加える。

### 3. 研究の方法

(1) intrinsic subtype 分類の 4 種類のサブタイプを網羅する 7 種類の細胞株のパネルを用い、TN 乳癌に特徴的な各種遺伝子 (HER1, cytokeratin 5/6, BRCA1, p53, c-KIT, Src, CD24, CD44) や ER, PgR, HER2 の遺伝子発現を蛋白レベル (免疫細胞化学的方法) で検討する。同時に、これまでに TN 乳癌に有効性が示唆されている DNA 傷害性薬剤、各種分子標的薬剤の各々単独処理時の細胞増殖抑制効果を検討する。さらに、細胞増殖抑制効果の強い薬剤に関しては、細胞周期、アポトーシスに与える影響を PI 染色、Cell Death ELISA キットを用い解析し、細胞増殖抑制効果の作用機序を検討する。以上により、他のサブタイプに分類される乳癌に比べ、TN 乳癌においてより選択的に抗癌効果を示す薬剤とその分子生物学的特徴が明確となる。さらに、臨床における治療を念頭に置き、DNA 傷害性薬剤と分子標的薬剤との同時併用効果も検討する。

(2) 乳癌細胞株パネルにおける各種遺伝子の発現パターン、抗癌化学療法剤や分子標的薬剤の単剤における細胞増殖抑制効果、それらの同時併用効果が判明した段階で、TN 乳癌に最も有効性が期待できる薬剤を選択する。同時に、選択された薬剤の感受性を予測可能な遺伝子が明らかとなる。その後、選別された薬剤の感受性予測因子 (例えば Src シグナル伝達活性化) を免疫組織化学的手法により

臨床検体を用い検討する。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌細胞株パネルの生物学的特徴の解析: KPL-1, KPL-3C 細胞株は luminal A サブタイプ、BT474 細胞株は luminal B サブタイプ、KPL-4 細胞株は ER-HER2+サブタイプ、HCC1937 細胞株は basal A サブタイプ、MDA-MB-231, MDA-MB-157 細胞株は basal B サブタイプに分類された。さらに、BRCA1, c-Kit, c-Src, p-Src についても発現のプロファイルが確認された。

(2) Src シグナル阻害薬 dasatinib 及び抗癌化学療法剤の細胞増殖抑制作用: dasatinib は、すべての乳癌細胞株の c-Src シグナル伝達の活性化を  $0.1 \mu\text{M}$  程度の濃度で阻害した。他のサブタイプの乳癌細胞株に比べて epithelial-mesenchymal transition を示す basal B サブタイプ乳癌細胞株では、Src シグナル伝達阻害薬 dasatinib (G1-S 移行阻害とアポトーシス誘導) や DNA 障害性薬剤 etoposide (G2/M 移行阻害とアポトーシス誘導) に対して極めて感受性が高く、両者の併用が相加的に働くことが判明した。

(3) dasatinib が basal B サブタイプ乳癌細胞に対し、癌幹細胞の構成比率を低下させることが世界で初めて示された。

(4) 臨床乳癌標本を用い c-Src や p-Src (Y416, Y527) の腫瘍細胞における発現を検討し、Src シグナル伝達の亢進が多くの乳癌で認められ、遠隔転移の発生と相関することを見出した。

### 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 12 件)

- ① Kurebayashi J, Moriya T, et al.: The cell cycle profile (C2P) test is a prognostic indicator for breast cancer patients treated with

- postoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy. Jpn J Clin Oncol. 2011 Apr 27. [Epub ahead of print] (査読あり)
- ② Kanomata N, Kurebayashi J, et al.: Clinicopathological significance of Y416Src and Y527Src expression in breast cancer. J Clin Pathol. 2011 Apr 13. [Epub ahead of print] (査読あり)
- ③ Kurebayashi J, Moriya T, et al.: Preferential antitumor effect of the Src inhibitor dasatinib associated with a decreased proportion of aldehyde dehydrogenase 1- positive cells in breast cancer cells of the basal B subtype. BMC Cancer 10: 568, 2010(査読あり)
- ④ Vogel C, Kurebayashi J, et al.: Management of ErbB2-positive breast cancer - insights from preclinical and clinical studies with lapatinib. Jpn J Clin Oncol 40: 999-1013, 2010 (査読あり)
- ⑤ 紅林淳一: 乳癌培養細胞を用いた前臨床研究. 最新医学 65: 1400-1410, 2010 (査読なし)
- ⑥ Moriya T, Kurebayashi J, et al.: Molecular-morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. Medical Molecular Morphology 43: 67-73, 2010 (査読あり)
- ⑦ Kurebayashi J, et al.: Preclinical rationale for combined treatments of endocrine therapy with 5-fluorouracil but with neither doxorubicin nor paclitaxel in the treatment of endocrine responsive breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 65: 219-225, 2010 (査読あり)
- ⑧ Iwase H, Kurebayashi J, et al.: Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. Breast Cancer 17(2):118-24, 2010 (査読あり)
- ⑨ Kurebayashi J: Possible Treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. Breast Cancer 16: 275-280, 2009 (査読あり)
- ⑩ Miyoshi Y, Kurebayashi J, et al.: Low nuclear grade but not cell proliferation predictive of pathological complete response to docetaxel in human breast cancers. J Cancer Res Clin Oncol 134: 561-567, 2008 (査読あり)
- ⑪ Miyoshi Y, Kurebayashi J, et al.: Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: Association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. Cancer Lett 264: 44-53, 2008 (査読あり)
- ⑫ 紅林淳一: 遺伝子発現プロファイルによる日本人乳癌の特徴. 臨床外科 63: 1055-1059, 2008 (査読なし)
- [学会発表] (計7件)
- ① 紅林淳一他: 術後補助化学療法を受けた乳癌患者における C2P 検査の予後予測因子としての有用性. 第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月29日、京都
- ② 紅林淳一: Triple negative乳癌を対象とした分子標的薬. 第18回乳癌学会学術総会、2010年6月25日、札幌
- ③ Kurebayashi J, et al.: The cell cycle profile (C2P) test is a prognostic indicator for breast cancer patients treated with postoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy. The 7th European Breast Cancer Conference, 2010年3月24日、バルセロナ
- ④ 紅林淳一: トリプルネガティブ乳癌: 臨床の立場から. 第14回日本外科病理学会学術集会、2009年10月9日、福島
- ⑤ 紅林淳一: 乳癌サブタイプ別の治療法の選択. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜
- ⑥ 紅林淳一: トリプルネガティブ乳癌に対する新規薬物療法の開発. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009年4月2日、福岡
- ⑦ 紅林淳一他: トリプルネガティブ乳癌の薬物療法に関する基礎的検討. 第16回日本乳癌学会学術総会シンポジウム、2008年9月26日、大阪
- [図書] (計3件)
- ① 紅林淳一 (分担執筆)、篠原出版新社、非浸潤性乳管癌 (ductal carcinoma in situ: DCIS) のすべて、2010、7 (分担)
- ② 紅林淳一 (分担執筆)、医薬ジャーナル社、みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床、2009、

167-173

- ③ 紅林淳一 (分担執筆)、金原出版社、乳癌  
テーラーメイド治療の理論と実践、2009、  
93-100

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紅林 淳一 (KUREBAYASHI JUNICHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10248255

(2) 研究分担者

森谷 卓也 (MORIYA TAKUYA)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230160

(3) 連携研究者

なし