

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15782

研究課題名（和文）HER2阻害薬による抗がん作用と心機能低下作用の統合数理解析

研究課題名（英文）Integrated Mathematical Analysis of Anticancer and Cardiac Hypofunction Effects of HER2 Inhibitors

研究代表者

間木 重行 (Magi, Shigeyuki)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90708546

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）：本研究は、細胞内コンテキストの異なるHER2陽性乳がん細胞および心筋細胞のHER2シグナルを再現可能な数理モデルを構築し、トラスツズマブ（TRZ）による心機能低下に寄与する分子反応を明らかにすることを目的とする。はじめに、TRZとHER2を活性化するリガンドNRG1が乳がん細胞と心筋細胞のHER2下流のリン酸化シグナル伝達や細胞生存率、心筋細胞の拍動に与える影響を評価した。続いて、HER2シグナル伝達の実験データと心筋細胞のmRNA発現量のデータを基に数理モデルを構築した。心筋細胞の数理モデルの最適化を行ったところ、乳がん細胞由来のモデルとは反応パラメータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた乳がん細胞と心筋細胞におけるHER2シグナル伝達の違いは、乳がん治療におけるトラスツズマブの使用に関連する潜在的な心筋毒性を理解し、病態に適した治療戦略を導き出すための基礎情報となる。また、心筋細胞のHER2シグナルを再現できる数理モデルは、トラスツズマブが誘導する心機能低下を軽減する薬物の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We attempted to identify the molecular responses contributing to anti-HER2 therapeutic antibody trastuzumab (TRZ)-induced cardiac dysfunction by constructing a mathematical model that can reproduce HER2 signaling in HER2-positive breast cancer cells and cardiomyocytes. First, we evaluated the effects of TRZ and the HER2-activating ligand NRG1 on phosphorylation signaling downstream of HER2, cell viability, and cardiomyocyte beating in breast cancer cells and cardiomyocytes.

We then constructed a mathematical model based on experimental data on HER2 signaling and mRNA expression levels in cardiomyocytes. Optimization of the mathematical model for cardiomyocytes resulted in reaction parameters that were different from the model derived from breast cancer cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：HER2シグナル がん細胞 心筋細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮増殖因子受容体ファミリーの一員である HER2 を過剰発現するがん (HER2 陽性がん) 細胞は、HER2 シグナルの亢進により細胞死に対する抵抗性と異常な増殖能を示す。正常細胞における HER2 は、リガンドである NRG と結合した HER3 や HER4 とヘテロ二量体を形成し、自己リン酸化を起こすことで活性化する。一方、HER2 陽性がん細胞では、NRG に依存せず HER2 活性型ホモ二量体が形成される。HER2 の下流では ERK 経路や Akt 経路等のシグナル伝達が惹起され、その活性化時間パターンにより細胞運命・機能が決定される。トラスツズマブは HER2 の細胞外領域に結合する抗体薬であり、抗体依存性細胞障害作用および HER2 シグナル阻害作用を通じて HER2 陽性がん細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導する。トラスツズマブは HER2 陽性乳がんの予後を大きく改善したが、時に心不全に至る心機能低下の副作用を引き起こすことが臨床試験の段階から指摘されており、現在でも HER2 シグナル阻害薬を利用した治療の際には心機能の嚴重なモニタリングが必要とされている。

(2) 心臓のポンプ機能を担う心筋細胞は HER2 および HER4 を発現している。遺伝子改変マウスを用いた研究から、心筋細胞の NRG 依存性 HER2/HER4 シグナルは心臓および心筋細胞の機能維持に必須の役割を果たすことがこれまで示されてきた。トラスツズマブが引き起こす心機能低下は、心筋細胞の生理的な HER2 シグナルも阻害してしまうことが原因と考えられている。しかしながら、トラスツズマブはリガンド非依存性の HER2 ホモ二量体による細胞増殖を選択的に阻害すること (Ghosh R. et al., Cancer Res 2011) から、心筋細胞におけるリガンド依存的な HER2 シグナルに与える影響は不明であり、細胞の運命・機能制御と HER2 シグナルの活性化時間パターンの関係性についてがん細胞とは異なる独自の法則が存在する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内コンテキストの異なる HER2 陽性乳がん細胞および心筋細胞のシグナル伝達・細胞増殖・細胞機能の関係性を再現可能な数理モデルを構築し、両者のトラスツズマブに対する反応を実験とモデルの両面から比較することで、トラスツズマブによる心機能低下に寄与する分子反応を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養・細胞増殖評価

ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 細胞、BT-474 細胞、SKBR-3 細胞は、10% Fetal Bovine Serum および 1% penicillin/streptomycin を添加した Dulbecco 's Modified Eagle Medium (以下 培養用培地と表記) を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の恒温培養器内で維持した。iPS 細胞由来心筋細胞 Asclestem® (ナカライテスク、現在は終売、以下心筋細胞と表記) は、メーカーのプロトコル通りに解凍し、培養用培地で維持した。

#### (2) タンパク質濃度の半定量

細胞を 12-well-plate に播種し、翌々日に HER2 のリガンド NRG1 を添加後、細胞を回収した。細胞のタンパク質を溶解し、各サンプルのタンパク質濃度を揃えた後 SDS-PAGE およびウエスタンブロット法にて HER2 シグナルに関連するタンパク質の総量およびリン酸化量を測定した。バンドの定量は、Amersham Imager 680 (Cytiva) に付属するソフトウェアにて実施した。

#### (3) 心筋細胞の収縮弛緩パラメタの評価

心筋細胞を 0.1%ゼラチンでコーティングした 96-well-plate に播種し、NRG1 やトラスツズマブ等の SI8000C(ソニー、現在は終売) を用いて心筋細胞が拍動する様子の動画を撮影した。得られた動画と付属のソフトウェアを用いて、心筋細胞の収縮速度 (Contraction Velocity, CV) および収縮弛緩総移動距離 (Contraction-Relaxation Deformation Distance, CRDD) を算出した。

#### (4) RNA-Seq

心筋細胞から RNA を抽出し、150 bp のペアエンドの RNA-Seq をレリクサ社へ外注した。得られた生データから各遺伝子の発現量を算出し、数値シミュレーションの分子濃度の初期値の設定に利用した。

#### (5) HER2 シグナルモデルの数値シミュレーション

生化学シミュレーション用ライブラリ BioMASS (Imoto, et al., 2020, Cancers) を用いて、各がん細胞および心筋細胞において NRG1 が誘導する HER2 シグナルを再現可能なモデルのパラメタフィッティングおよび感度解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) HER2 シグナルの測定

はじめに、乳がん細胞および心筋細胞におけるシグナル伝達モデル構築のためのデータ取得を行った。サブタイプの異なる乳がん細胞および心筋細胞(CM)において、トラスツズマブ (TRZ) および HER2 シグナルを活性化するリガンドであるニューレグリン 1 (NRG1) が HER2 下流のリン酸化シグナル伝達に与える影響を評価した(図1)。心筋細胞に NRG 刺激を行った際の HER2 のリン酸化パターンは、HER2 高発現の乳がん細胞株よりも HER2 低発現の乳がん細胞と類似していた。また、他のがん細胞で確認された HER3 のリン酸化は心筋細胞では確認できず、逆に心筋細胞にて確認された HER4 のリン酸化は、他の乳がん細胞株では検出されなかった。トラスツズマブは心筋細胞における NRG1 依存的リン酸化シグナルを部分的に抑制し、HER4 のリン酸化に対しての阻害効果が最も強く見られた。一方で、NRG1 処理を行っていない細胞において、トラスツズマブは HER2 のリン酸化や下流の転写因子 FOS の発現上昇を誘導するという結果が得られた。トラスツズマブが HER2 のリン酸化や FOS の発現を誘導する分子機序の解明を抗体リン酸化アレイ等の実験により試みたが、上記現象を説明できる変化を研究期間内に見出すことが出来なかった。

### (2) 抗 HER2 抗体トラスツズマブが心筋細胞の拍動に与える影響

続いて、NRG および TRZ が心筋細胞の拍動に与える影響を評価した。一週間以上の投与によって TRZ は心筋細胞の収縮力を低下させ、NRG1 は増強させた。逆に 48 時間以内では TRZ は心筋細胞の収縮力を増強する結果が得られた。

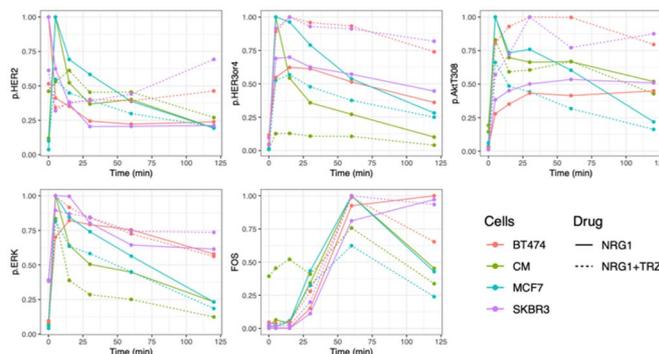


図1. 各細胞における HER2 シグナルの時間変化

### (3) 心筋細胞における HER2 シグナル数理モデル

サブタイプの異なる 3 種類の乳がん細胞の HER2 シグナル伝達の時系列データを学習したモデルおよび反応パラメタ(Imoto, et al., 2020, Cancers)と心筋細胞の mRNA 発現量のデータを元にプロトタイプの数理モデルのシミュレーションを行ったところ、乳がん細胞のデータで最適化された反応パラメタでは心筋細胞の HER2 リン酸化シグナルの挙動を部分的にしか再現することが出来なかった(図2上)。この結果から、がん細胞の HER2 シグナルを説明できる反応パラメタは、心筋細胞のモデルに直接外挿出来ない可能性が示唆された。

その原因が心筋細胞とがん細胞の発現分子の組成にあると考え、各細胞の mRNA 発現量を比較した。その結果、心筋細胞は HER4、SOS1、GAB1、MEK、ERK 等の発現量が全てのがん細胞に比べて顕しく高い一方で、AKT の発現量が低いことが確認された。以上の結果から、がん細胞モデルのファインチューニングが必要であると判断し、心筋細胞の実験データにフィットする反応パラメタの探索を行ったところ、実験データにフィットするパラメタセットを得た(図2下)。

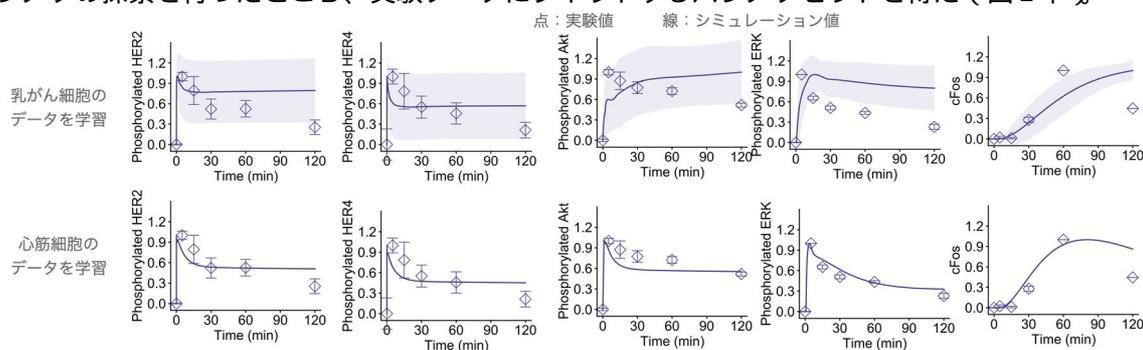


図2. 心筋細胞の HER2 シグナルのシミュレーション

得られた反応パラメタを乳がん細胞株のデータを学習したパラメタと比較したところ、HER ファミリーと GAB1 および PI3K の複合体形成を促進する反応パラメタが大きくなる一方で、DUSP の脱リン酸化や RSK の核外移行など、MAPK 経路の持続的な活性化に寄与する反応パラメタが小さくなっていった。前者の違いが生まれた理由として、乳がん細胞のデータでは HER4 や GAB1 が高発現している状態における細胞ダイナミクスの変化を学習出来ていなかった可能性が考えられた。一方、後者の違いが生まれた要因として、多量のミトコンドリアやサルコメア構造など、心筋細胞特有の複雑な細胞内環境が関係している可能性が考えられた。

現在、トラスツズマブ添加時の実験データを用いてモデルの検証を進めている。得られたモデルを用いて、トラスツズマブに対する反応の脆弱性をがん細胞株と心筋細胞で比較し、細胞の運命・機能制御と HER2 シグナルの活性化時間の関連性の違いに迫る予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Magi Shigeyuki, Ki Sewon, Ukai Masao, Dominguez-Huttinger Elisa, Naito Atsuhiko T, Suzuki Yutaka, Okada Mariko	4. 巻 11
2. 論文標題 A combination approach of pseudotime analysis and mathematical modeling for understanding drug-resistant mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97887-z	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

〔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 間木重行
2. 発表標題 がん薬物療法の耐性・心機能低下克服に挑む生命情報学研究
3. 学会等名 宮崎大学生命情報学勉強会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間木重行、内藤篤彦
2. 発表標題 がん薬物療法の耐性・心機能障害克服に挑む数理モデル研究
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeyuki Magi, Atsuhiko Naito
2. 発表標題 Systems biological approaches to understand the mechanisms of cancer drug resistance & cardiotoxicity
3. 学会等名 情報計算法学生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takashi Suzuki, Clair Poinard, Mark Chaplain, Vito Quaranta	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 308
3. 書名 Methods of Mathematical Oncology	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------