

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 6月 12日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791485

研究課題名（和文） チミジル酸合成酵素抑制を標的としたHER2陽性乳癌薬物療法の開発

研究課題名（英文） thymidylate synthase targeting therapy in HER2 positive breast cancer

研究代表者 重松 英朗
(Shigematsu Hideo)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：40543707

研究成果の概要（和文）：

チミジル酸合成酵素 (TS) の過剰発現は 5-FU 耐性機序として考えられている。研究者らは HER2 標的療法による TS 抑制および 5-FU 療法の抗腫瘍効果増強について検討を行った。HER2 陽性乳がん細胞株 SkBr3 において HER2 標的療法薬である trastuzumab により TS 発現および TS mRNA が抑制され、相加的な 5-FU 抗腫瘍効果の増強を認めたが、trastuzumab 耐性細胞株において TS 抑制効果は認められなかった。一方、研究者らは耐性の検討において、HER2 を含む二量体発現が trastuzumab 感受性に深く関与することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Fluoropyrimidine (5-FU) is key drug in treatment of breast cancer. Overexpression of thymidylate synthase (TS) confers resistant to 5-FU. The researchers have reported that TS expression is regulated by PI3K/Akt/mTOR pathway and have investigated TS targeting therapy to enhance antitumor effect of 5-FU therapy. In vitro, trastuzumab and lapatinib inhibited TS expression and transcription, and enhanced anti-tumor effect of 5-FU in SkBr3. However, in de-novo and acquired trastuzumab-resistant breast cancer cell lines showed no suppression of TS by HER2-targeting therapy, which was conferred by upregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling and of HER2-internalization. The researchers concluded that TS-inhibition therapy is effective in trastuzumab-sensitive HER2 positive breast cancer. Besides above findings, we found HER2-containing dimer as a novel predictive factor of HER2-targeting therapy and reported in breast cancer committees.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医薬歯学

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：乳腺外科学

1. 研究開始当初の背景

近年 TS 発現の制御に、増殖因子受容体である HER2 および serine/threonine kinase である mammalian target of rapamycin (mTOR) が深く関与していることが報告されている (図 1)。応募者は mTOR 特異的阻害剤である rapamycin により TS 発現が抑制され、5-FU の抗腫瘍効果が増強されることを報告した (Int J Cancer 2010, H Shigematsu) (図 2)。また HER2 は核内移動した後に TS 翻訳の promoter として働き、TS 発現を促進する機序も報告されている (Plos One 2009, Hwang-Phill Kim)。これらの報告から HER2 および mTOR を標的とした治療において、TS 発現抑制に基づいた 5-FU 療法における抗腫瘍効果の増強が期待される。

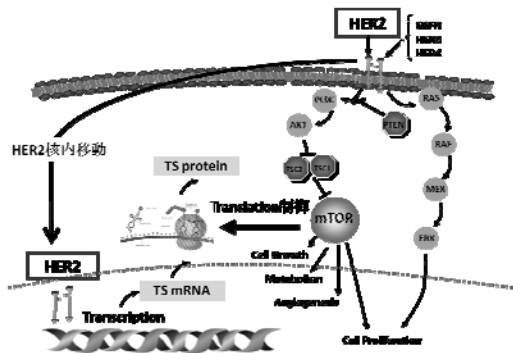


図1 HER2核内移動およびmTORによるTS発現の制御

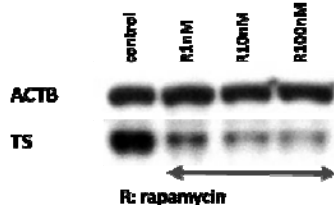


図2. Rapamycin投与によるTS発現抑制効果

2. 研究の目的

本研究では、HER2 陽性乳癌において HER2 標的治療薬および mTOR 阻害剤による TS 発現制御に着目し、それに伴う 5-FU 抗腫瘍効果の増強機序を明らかにすることを目的とする。また trastuzumab, lapatinib による TS 発現への影響の相違に注目し、両者薬剤による 5-FU 抗腫瘍効果増強の相違を証明する。

TS 抑制に関する研究において HER2 標的療法耐性乳がん細胞株においては TS 抑制効果が認められないことが明らかとなったため、当初の研究に並行して HER2 標的療法薬に対する耐性機序を明らかにする研究を施行することとし、HER family 受容体活性化

に必須である HER2 を含む二量体発現と HER2 標的療法感受性の相関を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

Cell line and agents

Trastuzumab 感受性 HER2 陽性細胞株 : SkBr3, BT474, ZR75-30

Trastuzumab 耐性 HER2 陽性細胞株 : KPL-4, MDA-MB 453, HCC1569

Agents: trastuzumab, lapatinib, everolimus

Cell proliferation assay

HER2 標的治療薬および 5-FU による細胞増殖抑制効果を Cell Titer 96 にて評価

PCR

TS mRNA については real-time PCR にて評価

Flowcytometry and Phosflow

TS および HER2 発現について PCR により定量化、また蛍光顕微鏡にて可視化

Alexa Fluor® 488 anti-human HER2, APC anti-human HER3, fluorescent labeled-trastuzumab and -TS, Phosflow® (Becton, Dickinson and Company) FACS Aria II™, FlowJo™ software

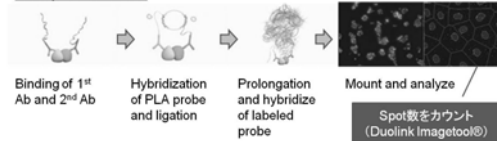
PLA method

HER2 を含む二量体発現について PLA 法

(proximately ligation assay) にて評価、定量化としては Duoimage にて、蛍光顕微鏡にて可視化

Duolink in situ™ kit (OLINK, Uppsala, Sweden), HER2-probemarker for HER2-2 dimer, HER2-Ab and HER3-Ab for HER2-3 dimer

Principle and method

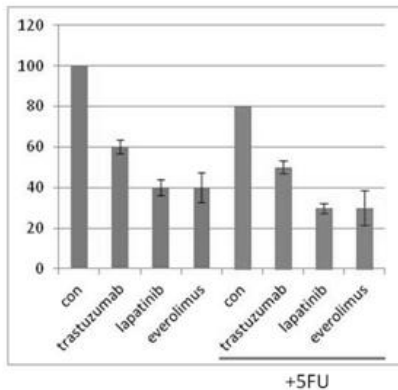


In vivo assay

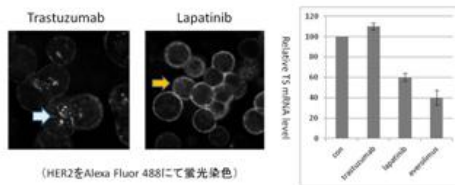
術前化学療法として FEC 療法および trastuzumab, taxane 併用化学療法が施行された HER2 陽性手術可能乳がんにおいて、原発巣における TS 発現と病理学的完全奏功 (pCR) の相関について検討した。TS については原発巣における発現を IHC により評価し、0, 1+を陰性、2+, 3+を陽性とした。

4. 研究成果

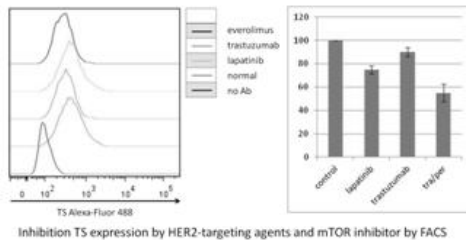
① HER2 標的治療薬による HER2 internalization 相違と TS 抑制効果



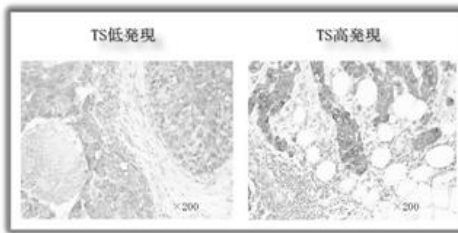
Inhibition of cell proliferation under HER2-targeting agent and mTOR inhibitor under presence of 5-FU



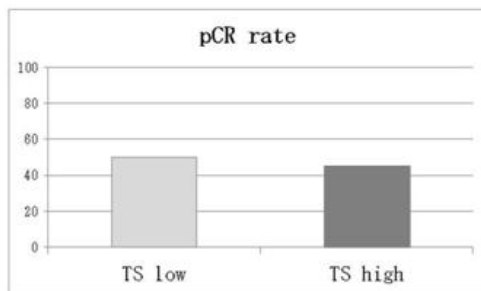
HER2 internalization and change in TS-mRNA under HER2-targeting agents



Inhibition TS expression by HER2-targeting agents and mTOR inhibitor by FACS



Typical case of TS expression in HER2-positive breast cancer by IHC



pCR rate in breast cancer patients who underwent trastuzumab and FEC based neoadjuvant chemotherapy according to TS expression

1) 抗腫瘍効果

Trastuzumab感受性HER2陽性乳がん細胞株である SkBr3 を対象に、trastuzumab, lapatinib, everolimus による抗腫瘍効果および 5-FU 併用効果について検証した。各々薬剤において 5-FU 併用により 5-FU 抗腫瘍効果の増強効果を認めた。これらの所見は他 trastuzumab 感受性 HER2 陽性乳がん細胞株でも認められた。一方で、trastuzumab 耐性細胞株においては 5-FU 抗腫瘍効果の増強作用は確認されなかった。

2) TS 抑制効果

Trastuzumab と lapatinib の比較において、HER2 internalization の相違を認めた。Trastuzumab では internalization の促進、lapatinib においては internalization の抑制を認めた。それに相応して TS mRNA 抑制効果の相違を認めた。TS 蛋白発現については everolimus>lapatinib>trastuzumab の順において抑制効果が認められた。一方で、trastuzumab 耐性細胞株においては trastuzumab, lapatinib による TS 抑制作用は確認されなかった。しかしながら everolimus は抗腫瘍効果および TS 抑制効果の維持が認められた。

3) TS 発現と病理学的完全奏功の相関

術前化学療法として F(5-FU)EC 療法および trastuzumab, taxane 併用化学療法が施行された HER2 陽性手術可能乳がんにおける、原発巣における TS 発現と病理学的完全奏功 (pCR) の相関について検討した。TS については原発巣における発現を IHC により評価し、0, 1+を陰性、2+, 3+を陽性とした。pCR 率は TS 陰性症例において 50% (6/12)、TS 陽性症例において 45% (5/11) であり、TS 発現と pCR に明らかな相関を認めなかった。

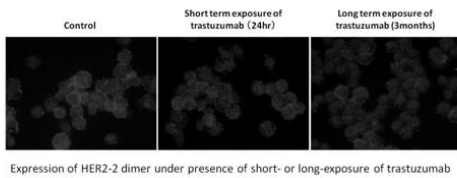
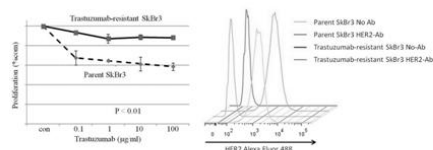
② Trastuzumab 耐性 HER2 陽性乳がん細胞株における TS 発現および 5-FU 感受性

1) Trastuzumab 耐性株における HER2 発現

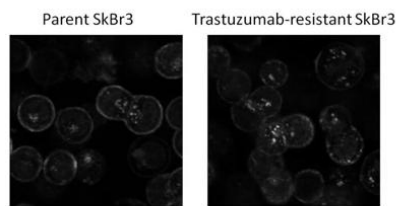
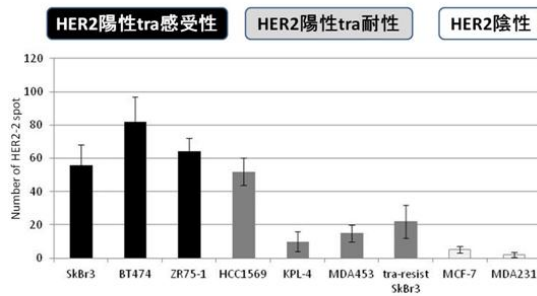
Trastuzumab 感受性細胞株である SkBr3 を trastuzumab 長期曝露により獲得耐性株を樹立した。これらの耐性株においては HER2 発現の維持を認めたものの、HER2-2 dimer 発現の低下を認めた。他の de novo 耐性株の検討においても trastuzumab 耐性細胞株では HER2-2 dimer 発現低下を認めており、HER2-2 dimer 発現が trastuzumab 効果予測因子と成りうることを発見した。

2) Trastuzumab 耐性株においては HER2 internalization の亢進を認めた。それに伴い、TS 発現量の増加を、および 5-FU の感受性低下を認めた。以上から trastuzumab 耐性

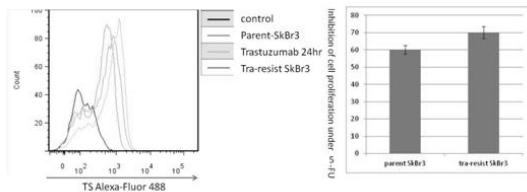
獲得に伴う TS 発現の亢進、および 5-FU 耐性の獲得の可能性が示唆された。



Expression of HER2 dimer under presence of short- or long-exposure of trastuzumab



HER2 internalization in parent and trastuzumab-resistant SkBr3



TS expression and 5-FU sensitivity in parent and trastuzumab-resistant SkBr3

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)

[学会発表] (計 3 件)

1. 発表者名: 重松英朗、角舎学行、片岡健、尾田三世、有廣光司、岡田守人
 発表標題: PLA 法を用いたホルマリン固定標本における HER2 を含む二量体発現の解析方法の確立
 学会名: 第 20 回日本乳がん学会
 発表年月日: 2012 年 6 月 29 日
 発表場所: 熊本

2. 発表者名: 重松英朗、秋本悦志、恵美純

子、舛本法生、角舎学行、春田るみ、片岡健、尾田三世、有廣光司、岡田守人
 発表標題: PLA 法を用いた HER2 を含む二量体発現解析に基づく HER2 標的療法の効果予測
 学会名: 第 50 回癌治療学会
 発表年月日: 2012 年 10 月 26 日
 発表場所: 横浜

3. 発表者名: 重松英朗、網岡愛、梶谷桂子、恵美純子、舛本法生、角舎学行、春田るみ、片岡健、尾田三世、有廣光司、岡田守人
 発表標題: PLA 法を用いた HER2 を含む二量体発現解析による HER2 標的療法の効果予測～基礎から臨床への応用～
 学会名: 第 113 回日本外科学会
 発表年月日: 2013 年 4 月 11 日
 発表場所: 福岡

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 重松 英朗
 (Shigematsu Hideo)
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号: 40543707

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし