

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861163

研究課題名(和文) ラパチニブによる E2F1 抑制を介した薬剤感受性制御メカニズムと至適併用薬の検討

研究課題名(英文) Suppression of E2F1 by lapatinib induces synergistic antitumor effect of capecitabine in HER2 positive breast cancer

研究代表者

村田 健 (Murata, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50573424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラパチニブとカベシタピンの併用療法は、トラスツズマブ耐性HER2陽性乳癌に対する標準治療である。本研究では、ラパチニブによるEGFR・HER2抑制によりE2F1の制御を介して、感受性規定因子の発現を抑制し、5-FUもしくはゲムシタピンとの併用で相乗効果をもたらされることを確認した。これによりPI3K-AKT抑制によるE2F1抑制が重要な役割を果たしていることが示唆され、ラパチニブとゲムシタピンの併用がHER2陽性乳癌に対する新たな治療法となり得るための基礎的根拠が示された。

研究成果の概要(英文)：HER2-targeting agent lapatinib plus the oral fluoropyrimidine, capecitabine, is an effective treatment option for trastuzumab-refractory HER2-positive metastatic breast cancer. This study indicates that lapatinib has a synergistic antitumor effect with capecitabine from downregulation of TS which is mediated by the major transcription factor E2F1. We showed not only the molecular mechanism of lapatinib and capecitabine, but also possibility of the interaction between lapatinib and gemcitabine or anthracyclines from the result of downregulation of RRM1 and TOP2A by lapatinib. Our findings provide a rationale for clinical evaluation of combination chemotherapy with lapatinib and gemcitabine for breast cancer with HER2 amplification.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 ラパチニブ ゲムシタピン E2F1

1. 研究開始当初の背景

乳癌の約 20～30%において HER2 の過剰発現が認められ、一般的に予後不良であるとされてきた。しかし、HER2 に対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブが、治療成績を大きく改善し、現在 HER2 陽性乳癌の治療に中心的な役割を果たしている。しかし一方で、トラスツズマブ不応例や、トラスツズマブを含む化学療法中に増悪するなどの耐性獲得がしばしば経験される。

ラパチニブは EGFR と HER2 のチロシンキナーゼドメインに当たる ATP 結合部位に競合的に結合することで、チロシンキナーゼ活性を可逆的に阻害し、下流のシグナル伝達経路の活性化を抑制する経口低分子化合物である。抗体薬であるトラスツズマブとは根本的に異なる作用機序のため、トラスツズマブ耐性例に有効であることが報告され (Scaltriti M, J Natl Cancer Inst, 2007)、トラスツズマブに長期間曝露して樹立した耐性細胞株に対しても、ラパチニブの効果が実験的に証明されている。(Konecny GE, Cancer Res, 2006)

臨床的には、ラパチニブ単独療法の有用性を示すランダム化試験はないものの、トラスツズマブ既治療の HER2 陽性進行再発乳癌 400 例に対して、経口フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤(経口 5-FU 製剤)であるカペシタピン単剤群とカペシタピン+ラパチニブ併用群とを比較した無作為第 III 相試験で、奏効率および無増悪期間に有意な延長を認め、その有用性が示されている。これにより本邦ではラパチニブとカペシタピンの併用のみが認められ、HER2 陽性転移性乳癌患者に対する標準治療の一つとされている。

我々はこの経口 5-FU 製剤とラパチニブの関係性に着目し、以下に示す仮説を立て、前実験を行ってきた。Thymidylate synthetase (TS)は経口 5-FU 製剤の効果発現に重要な役割を果たし、TS 高発現腫瘍に対しては、より多量の FdUMP が必要であるため、5-FU の感受性が低いことが多くの研究によって明らかとなっている。この TS は転写因子 E2F1 による制御を受けること、また E2F1 は PI3K-AKT シグナルによって制御を受けることが別々に報告されているが、我々はこれら知見から、ラパチニブによる EGFR・HER2 の不活化が E2F1 発現抑制を誘導し、これにより TS の抑制を誘導するのではないかとの仮説を立てた。すなわち、このラパチニブによる TS の抑制が経口 5-FU 製剤の効果を高め、相乗効果を得ることで、臨床的に有用な効果が認められると考えた。

さらに E2F1 は TS のほか、TOP2A や ribonucleotide reductase(RNR)のサブユニットである RRM1 を制御することも報告されている。TOP2A は乳癌治療のキードラッグであるアンスラサイクリン系薬剤の感受性に関わり、TOP2A 高発現腫瘍では感受性

が高まることが知られている。また RRM1 は腫瘍細胞への過剰発現によりゲムシタピン耐性となることが報告されている。つまり、アンスラサイクリン系薬剤、ゲムシタピンをそれぞれラパチニブと併用した場合、E2F1 抑制によって TOP2A および RRM1 が抑制されることで、アンスラサイクリン系薬剤の効果は低下し、ゲムシタピンの効果は上昇することが予想される。

我々は前実験において、HER2 陽性乳癌細胞へラパチニブを添加することで、E2F1・TS・TOP2A・RRM1 の mRNA 発現は著明に抑制されることを確認し、これらは PI3K 阻害剤の使用においても同様の結果が得られた。また薬剤併用による *in vitro* 細胞増殖抑制実験において、ラパチニブは 5-FU・ゲムシタピンに対しては相乗効果を示す一方で、アンスラサイクリン系薬剤であるエピルピシンに対しては拮抗作用を認めた。これら知見から、本研究を進めることで、ラパチニブの E2F1 を介した遺伝子制御メカニズムが解明され、臨床における新たな適応・用法の可能性が示されると考えられた。

2. 研究の目的

過去の報告では、HER2 陽性胃癌細胞において、トラスツズマブによる TS 発現の抑制が確認され、抗 HER2 療法と 5-FU における相乗効果の可能性が示唆されている。(Mol Cancer Ther, 2010) 前述のようにラパチニブは臨床的にはカペシタピンとの併用療法においてその有効性が示されているが、併用による相乗効果や感受性変化の詳細なメカニズムについては未だ明らかとなっていない。

これらメカニズムを証明できれば、ラパチニブとカペシタピンの相乗効果の裏付けとなるばかりではなく、ゲムシタピンとの併用という新たな併用治療の根拠となり、臨床試験へと繋がると思われる。よって、本研究は基礎研究と臨床を繋ぐトランスレーショナルリサーチを最終的な目的とするが、まずその前段階としての基礎的な知見を得ることを目指した。

本研究課題において明らかにすべき詳細は以下の項目を設定した。

- 1) *in vitro* における PI3K 阻害剤およびラパチニブによる E2F1、TS、TOP2A、RRM1 抑制の検証
- 2) ラパチニブに 5-FU (カペシタピン)、アンスラサイクリン、ゲムシタピンを乳癌細胞株へ併用投与した場合の感受性変化の検討
- 3) E2F1 による TS・RRM1・TOP2A 制御のメカニズムの解析。プロモーター領域への結合の検証。

- 4) E2F1 を過剰発現またはノックダウンさせた細胞株における検討
- 5) 免疫染色による臨床検体における E2F1 発現と奏効率の解析

3. 研究の方法

1) ラパチニブ・PI3K 阻害剤による E2F1 抑制とこれに伴う TS・TOP2A・RRM1 抑制の検証

2 種の乳癌細胞株 T47D (ER 陽性/HER2 陽性) と SKBR3 (ER 陰性/HER2 陽性) に、ラパチニブおよび PI3K 阻害剤の LY294002・Wortmannin を添加した場合に、E2F1・TS・TOP2A・RRM1 の mRNA の発現が抑制されることを Real-time PCR 法によってすでに確認した。さらにこの知見を進め、タンパク質レベルでもこれら発現抑制を確認し、PI3K-AKT 経路の脱リン酸化が E2F1 発現抑制、ひいては TS・TOP2A・RRM1 の抑制を誘導するか検証した。

2) ラパチニブと 5-FU・アンスラサイクリン・ゲムシタピンの併用投与による薬剤感受性の検討

我々の仮説に従えば、ラパチニブと 5-FU またはゲムシタピンを併用した場合は TS・RRM1 の抑制により相乗効果を認め、エピルピシンを併用した場合は TOP2A の抑制により効果が抑制されると考えられる。これら仮説を *in vitro* において検証するため、T47D および SKBR3 を用いてラパチニブと 5-FU、ゲムシタピン、エピルピシンをそれぞれ併用投与し、MTT Assay により単剤投与との感受性の違いを比較検討した。2 種の薬剤の組み合わせによって生ずる相乗効果や拮抗作用は、Median Effect 法 (CalcuSyn software; Biosoft) により、CI (Combination Index) を用いて定量化を行った。

3) E2F1 による TS 制御のメカニズムの解析

E2F1 は癌抑制遺伝子である RB による制御を受け、癌細胞の細胞周期に深く関わるものが広く知られている。しかし、標的遺伝子として直接 E2F1 が制御する遺伝子群についての知見は、未だ限られている。そのため、クロマチン免疫沈降 (ChIP assay) により E2F1 が TS・TOP2A・RRM1 のプロモーター領域に直接結合することを確認する。実際に pGL3 ルシフェラーゼベクターに TS・TOP2A・RRM1 のプロモーター領域を導入し、E2F1 高発現下において、プロモーター活性の上昇が生じるか否かを検討すると同時に、ラパチニブや PI3K 阻害剤の添加により、これら活性がどのように変化していくかを評価した。

4. 研究成果

ラパチニブにより、E2F1 およびその下流二存在する各抗癌剤の感受性を規定する因子が抑制されることを示すため、乳癌細胞株 T47D (ER 陽性/HER2 陽性) に、ラパチニブおよび PI3K 阻害剤を添加した。その結果、E2F1・TS・TOP2A・RRM1 の mRNA の発現が抑制されることが確認された。SKBR3 (ER 陰性/HER2 陽性) においても同様の所見が確認されたが、T47D では 48 時間の添加時間であったが、SKBR3 では 6 時間の段階で各因子の発現抑制が認められた。(図 1)

同様の所見が蛋白レベルでも認められるかを確認するために、各内蛋白を抽出した上で、ウェスタンブロット法にて蛋白発現を確認したところ、mRNA 発現と同様に、24 時間のラパチニブの添加により、AKT のリン酸化の著明な抑制効果が認められると同時に、E2F1 の発現抑制が確認された。(図 2)

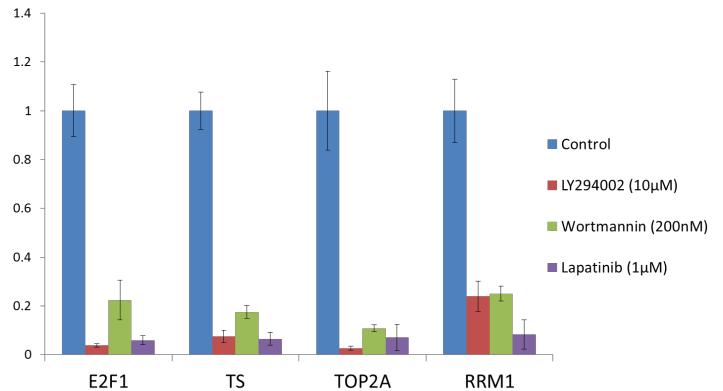


図 1. ラパチニブ・PI3K 阻害剤投与による E2F1・TS・TOP2A・RRM1 の発現抑制

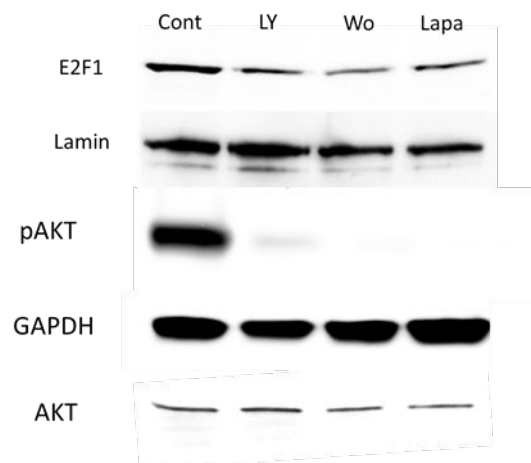


図 2. ラパチニブ・PI3K 阻害剤投与による AKT 活性化阻害と E2F1 の発現抑制

In vitroにおけるラパチニブと細胞障害性薬剤の併用効果を検討するために、前述のHER2陽性乳癌細胞株2種を用いてMTT Assayを施行した。この結果に基づき、相乗効果や拮抗作用を、CI (Combination Index)を用いて定量化を行ったところ、ラパチニブと5-FU、ラパチニブとゲムシタピンの組み合わせのCIはいずれも1を下回り、両薬剤の併用による相乗効果が確認された。一方で、ラパチニブと代表的なアンスラサイクリン系薬剤であるエピルピシンの併用において、CIは1以上となり、拮抗作用が存在することが確認された。(図3)

すなわち、ラパチニブの投与によりE2F1発現の抑制が生じ、E2F1により発現を制御されるTS・RRM1・TOP2Aの3因子の発現が抑制されたため、TS・RRM1低下は5-FUおよびゲムシタピンの感受性を亢進し、一方でTOP2Aの発現抑制はエピルピシンの感受性を低下させたと考えられた。

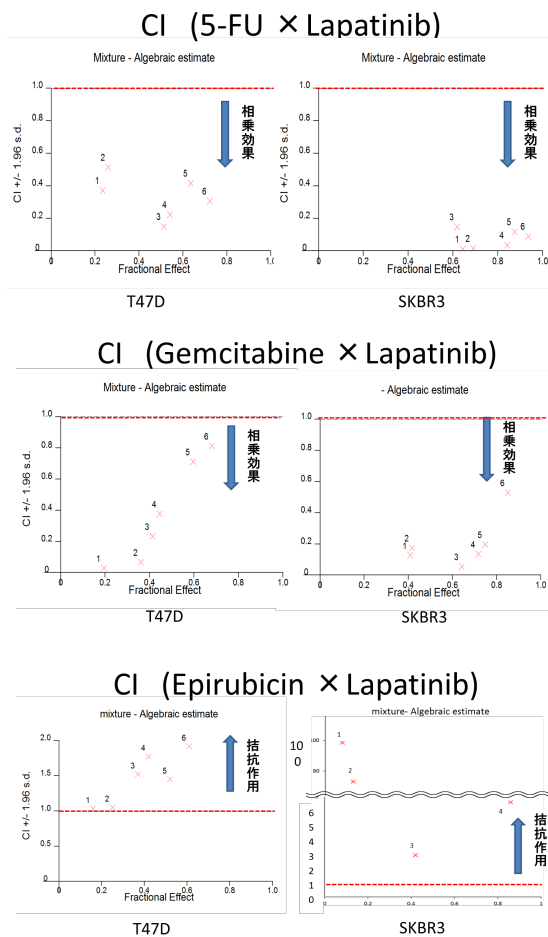


図3. ラパチニブとの各種薬剤の併用による相乗および拮抗作用

さらに、TS・RRM1・TOP2Aの3因子が、E2F1による直接の制御を受けることを確認するため、クロマチン免疫沈降(ChIP assay)によりE2F1がTS・TOP2A・RRM1のプロモーター領域に直接結合するか否かを検証した。これによれば、TS・RRM1・TOP2Aのプロモーター領域にE2F1結合部位が存在し、この部位への直接結合を通じて、各因子の発現制御を行っていることが示唆された。今後、ルシフェラーゼアッセイを行い、さらに転写の活性が制御されていることを示す予定である。(図4)

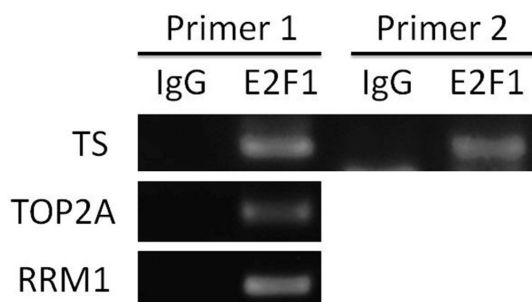


図4. CHIP assayによるE2F1の各因子プロモーター領域の結合

これらの結果から、標準治療であるラパチニブとカベシタピン併用療法では、細胞増殖抑制における相乗効果が認められ、PI3K-AKT抑制によるE2F1抑制が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに本研究により、ラパチニブとゲムシタピンの併用がHER2陽性乳癌に対する新たな治療法となり得るための基礎的根拠が示されたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 健 (Takeshi Murata)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50573424