

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430174

研究課題名(和文) HER2陽性乳癌、胃癌におけるheregulinによる抗HER2薬の効果予測

研究課題名(英文) A biomarker study of heregulin to predict efficacy of anti-HER2 drugs in HER2-positive breast and gastric cancer

研究代表者

鶴谷 純司 (TSURUTANI, Junji)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：30319686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HER2遺伝子増幅を有する乳癌細胞株、胃癌細胞株にヘレギュリンを接触するとラパチニブ、トラスツズマブに対する薬剤感受性が低下したが、T-DM1では低下しなかった。SKBR3、N87にヘレギュリン遺伝子を導入し、ラパチニブとトラスツズマブに感受性が低下したが、T-DM1では低下しなかった。N87ヘレギュリン導入株をマウスに移植し、ラパチニブ、トラスツズマブでは感受性低下が認められたが、T-DM1では変化が認められなかった。トラスツズマブに耐性となったHER2陽性乳癌、胃癌患者の治療後癌組織のヘレギュリン発現が増加していた。

研究成果の概要(英文)：Recombinant heregulin desensitized HER2 positive breast or gastric cancer cell lines to trastuzumab, lapatinib, but not to T-DM1. The SKBR3 and N87 cells were transfected with heregulin gene and sensitivities of those cell to each drug were evaluated. The transfectants were desensitized to trastuzumab and lapatinib, but not T-DM1. The results were likewise in the xenograft model inoculated with the heregulin-transfected N87 cells. In clinical specimens obtained from patients with breast or gastric cancer who became resistant to trastuzumab, the expression levels of heregulin protein were upregulated compared to the pre-treatment samples, suggesting that heregulin is involved in the acquired resistance to anti-HER2 therapy, other than T-DM1.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：HER2 乳癌 胃癌 化学療法 分子標的薬 薬剤耐性 ヘレギュリン

1. 研究開始当初の背景

近年の固形癌における薬物療法の進歩は分子標的薬の出現と、その効果を予測するバイオマーカーの発見によるところが大きい。ヒト化抗 HER2 抗体である trastuzumab の登場により HER2 陽性の乳癌、胃癌患者の予後は改善した (Slamon DJ. N Engl J Med 2001, Bang YM. Lancet 2010)。

また、手術不能の HER2 陽性乳癌患者において trastuzumab とドセタキセルに pertuzumab を上乗せした治療の臨床的有用性が大規模比較試験で証明された (Swain SM. Lancet Oncol 2013)。

さらに、HER2 陽性の進行胃癌においても pertuzumab を trastuzumab に上乗せした大規模臨床試験が進行中である。これら HER2 陽性癌の中で pertuzumab や trastuzumab の効果を予測する臨床病理学的因子は見つかっていない。

HER2 のホモダイマーと比較して、HER2,3 のヘテロダイマーはより強力な下流シグナルを伝達することでポトーススを抑制し、細胞増殖を促進すると考えられている。また、trastuzumab への耐性機序としてもこのヘテロダイマーの存在が注目されている。heregulin は HER3 のリガンドであり、HER3 へ結合することで HER2,3 のヘテロダイマーが形成され、trastuzumab に対する癌細胞の耐性を誘導すると考えられている (Lipton A. Breast Cancer Res Treat 2013)。pertuzumab は HER2 のサブドメイン 2 に結合し、HER3 との結合を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。

新たな抗 HER2 薬が開発されており、治療成績をさらに向上させるためにはこれらの薬剤に対する耐性メカニズムの解明が重要である。Trastuzumab にメイテンシンと呼ばれる微小管阻害剤を結合させた、Antibody-drug conjugate (ADC) が開発されており、trastuzumab を含む化学療法のレジメンに治療歴を有する乳癌患者において lapatinib と capecitabine の併用と比較して優越性が証明されている (Sunil Verma, N Engl J Med. 2012 Nov 8;367(19):1783-91.)。

我々は 2011 年に EGFR を標的とした抗体治療薬である cetuximab の耐性機序として HER2 と HER3 のヘテロダイマーが重要であり、このヘテロダイマーを阻害することで cetuximab 耐性を克服できることを報告した (Yonesaka K. SciTransl Med 2011)。

ここで、大腸癌患者の血漿中の heregulin を測定することで cetuximab の抗腫瘍効果を予測するシステムを確立した (Yonesaka K. SciTransl Med 2011, 図)。

この測定系を用いて HER2 遺伝子増幅を有する乳癌、胃癌患者の治療前血漿中の heregulin を測定し、trastuzumab、pertuzumab など抗 HER2 薬の効果や予後を予測できるか検討する。

2. 研究の目的

癌治療のテーラーメイド化を推進するために、治療効果を予測するバイオマーカーの同定は重要である。HER2 陽性乳癌、胃癌患者の血漿や組織における heregulin のバイオマーカーとしての意義を検討する。具体的には抗 HER2 薬 (trastuzumab, lapatinib, T-DM1) の効果を予測するバイオマーカーとしての意義を検討する。

HER2 陽性の乳癌、胃癌細胞における heregulin 高発現の機能解析。

heregulin による抗 HER2 薬 (trastuzumab, lapatinib, T-DM1) 耐性の機序を解明する。

HER2 陽性乳癌、胃癌患者の血漿や癌組織の heregulin 発現量と予後、ならびに trastuzumab や pertuzumab などの抗 HER2 薬の効果との関連を調べる。heregulin 発現の臨床的意義を検討する。

3. 研究の方法

HER2 陽性の乳癌、胃癌細胞における heregulin 高発現の機能解析：

HER2 陽性乳癌 (SKBR-3)、胃癌細胞 (N87) に HER3 遺伝子を導入し、強制発現させる。同様に Moch 遺伝子を導入した細胞株と比較し、細胞増殖能、抗 HER2 薬による細胞増殖能抑制やアポトースス誘導における感受性の違いを *in vitro* で検討する。また、レコンビナント heregulin で刺激することで細胞増殖能や細胞死誘導に影響があるかを調べる。heregulin トランスフェクタント、Moch トランスフェクタントをマウスに移植し、細胞増殖能や抗 HER2 薬による細胞増殖抑制への影響を調査する。

HER2 陽性の乳癌、胃癌細胞における heregulin による抗 HER2 薬耐性機序を解明：

HER2 陽性乳癌 (SKBR-3)、胃癌細胞 (N87) における heregulin が増殖能、浸潤能、アポトースス作用への影響を検討し、heregulin の機能解析を行う。最終的には *in vivo* におけるマウスでの腫瘍増殖能に与える影響についても検討する。

HER2 陽性乳癌、胃癌細胞で heregulin の高発現により下流のシグナルトランスダクション (Akt, Erk) に影響があるかを検討する。heregulin が誘導する抗 HER2 薬耐性が、Akt などの下流シグナル分子の活性化により生じているかどうかを検討する。

また、Moch 株と heregulin 株で、抗 HER2 薬と培養後に、アポトースス関連蛋白質の発現に差が認められるかを検討する。

HER2 陽性乳癌、胃癌患者の血漿や癌組織の heregulin 発現量と、その予後、ならびに trastuzumab や pertuzumab などの抗腫瘍効果との関連を調べる。

臨床検体において各 50 例の HER2 陽性乳癌と胃癌を対象に癌細胞 mRNA を資料として heregulin の発現レベルを検討する。Heregulin の発現量は real time RT-PCR によって mRNA レベルで発現量を定量化する。また、治療前に採取された血漿を用いて、heregulin の発現を測定する。heregulin の発現量とこれらの間に相関があるかを調べる。また、血漿 heregulin 値と生存期間や、抗 HER2 薬 (trastuzumab や pertuzumab) に対する治療効果との関連を調べる。

4. 研究成果

HER2 陽性の乳癌、胃癌細胞における heregulin 高発現の機能解析。

heregulin による抗 HER2 薬耐性の機序を解明する。

HER2 陽性乳癌、胃癌患者の血漿や癌組織の heregulin 発現量と予後、ならびに trastuzumab や pertuzumab などの抗 HER2 薬の効果との関連を調べる。

上記の項目について検証を行うことで、HER2 陽性乳癌、胃癌患者の血漿や組織における heregulin の発現の、抗 HER2 薬 (trastuzumab, lapatinib, T-DM1) の効果予測因子としての意義を検討した。

in vitro の実験で HER2 遺伝子増幅を有する乳癌細胞株、および HER2 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株にレコンビナントの heregulin を接触させると、HER2 シグナルの下流分子である Akt リン酸化の上昇が認められ、lapatinib、trastuzumab に対する抗腫瘍効果に関する薬剤感受性が低下した。trastuzumab と微小管障害剤 DM-1 のコンジュゲート (T-DM1) では感受性に低下は認められなかった。

各々、複数の細胞株 (BT-474, MDA-MB-453, HCC1954, SNU216, 4-1ST) で検討しており、再現性に問題はないと考えられた。この細胞の中から SKBR3、N87 に heregulin 遺伝子を導入し強制発現株を作成した。

MOCH 遺伝子導入株と比較し、lapatinib と trastuzumab に対する感受性が低下したが、T-DM1 の効果に変化は認めなかった。

さらに N87 の heregulin 導入株、MOCH 導入株をマウスに移植し、lapatinib、trastuzumab へ、および T-DM1 の感受性に変化がみられるか検討した。

in vitro の結果と同様に lapatinib、trastuzumab では heregulin 導入株で抗腫瘍効果に関する感受性低下が認められたが、

T-DM1 では変化が認められなかった。

以上より、抗 HER2 薬の種類によって、heregulin による耐性化の程度に差が認められた。

trastuzumab を含む抗腫瘍薬で治療をなされた HER2 陽性乳癌および胃癌患者の治療前後における癌組織では heregulin の発現が増加しており、耐性機序への関与が示唆された。同患者群において血漿中の heregulin 濃度を ELISA を用いて測定したが、組織での発現とに相関は認めなかった。また、抗 HER2 薬への耐性獲得後の発現レベル上昇も認めなかった。

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. Nonagase Y, Yonesaka K, Kawakami H, Watanabe S, Haratani K, Takahama T, Takegawa N, Ueda H, Tanizaki J, Hayashi H, Yoshida T, Takeda M, Chiba Y, Tamura T, Nakagawa K, Tsurutani J. Heregulin-expressing HER2-positive breast and gastric cancer exhibited heterogeneous susceptibility to the anti-HER2 agents lapatinib, trastuzumab and T-DM1. *Oncotarget*. 査読有.7(51):84860-84871.2016. DOI:10.18632/oncotarget.12743.

[学会発表](計 2 件)

1. Nonagase Y, Yonesaka K, Watanabe S, Haratani K, Takahama T, Takegawa N, Ueda H, Kawakami H, Hayashi H, Takeda M, Sakamoto H, Tamura T, Nakagawa K, Tsurutani J. Heregulin-induced resistance against HER2-targeted therapies in HER2 positive breast and gastric cancer in vitro and in vivo. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016, 2016 年 4 月 19 日, Ernest N. Morial Convention Center, ニューオリンズ(米国).
2. Nonagase Y, Yonesaka K, Watanabe S, Haratani K, Takahama T, Takegawa N, Ueda H, Kawakami H, Hayashi H, Takeda M, Sakamoto H, Tamura T, Nakagawa K, Tsurutani J. Heregulin-induced resistance against HER2-targeted therapies in HER2 positive breast and gastric cancer in vitro

and in vivo. The 6th Meeting of Society of Basic and Translational Research in Oncology and Respiriology. 2016年8月6日、福岡県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴谷 純司 (TSURUTANI, Junji)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：30319686

(2) 研究分担者

中川 和彦 (NAKAGAWA, Kazuhiko)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：40298964

米阪 仁雄 (YONESAKA, Kimio)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：30330260