

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591442

研究課題名（和文） 乳癌における内分泌治療耐性機序の解明とその臨床応用

研究課題名（英文） Novel biomarker for the prediction of tamoxifen treatment in ER positive breast cancer

研究代表者

神野 浩光 (JINNO HIROMITSU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20216261

研究成果の概要（和文）：現在までの BTG2 と ER の関連を踏まえ、我々は ER 陽性 BTG2 高発現乳癌に対しタモキシフェン(TAM)の感受性を検討した。In vitro, in vivo 両者の実験より、BTG2 発現下でのみ認められる ER・HER2 間のクロストークが、この TAM 感受性亢進に関わっていることが示唆され、BTG2 高発現乳癌では TAM 感受性が著しく亢進していることが示され、今後 TAM に対する感受性予測因子としての臨床応用が期待されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Based on previous results, we analyzed if BTG2 expression affects the sensitivity against tamoxifen. Tetracycline-inducible BTG2 expression model in MCF7 was developed to assess the cytotoxicity by tamoxifen treatment in vitro and in vivo. Tumor growth ratio was significantly suppressed in the concomitant administration of tetracyclin and tamoxifen in comparison with single treatment of tamoxifen or of tetracyclin both in vitro and in vivo. Despite further validation studies need to be conducted, BTG2 expression may be useful biomarker to identify patients appropriate for tamoxifen treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：BTG2, 乳癌, 内分泌療法, 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

B-cell translocation gene 2 (BTG2) は BTG/TOB 遺伝子群に属す細胞周期制御因子であり、肺胞上皮・前立腺・乳腺上皮などの組織でその発現が認められる。(Melamed et al., Tissue Cell, 2002) BTG2 は癌抑制遺伝子である pRB 依存的に(Guardavaccaro et al., Mol Cell Biol, 2000)、もしくは非依存的に(Lim et al., Mol Carcinog, 1998) 細胞周期を抑制的に制御し、また in vitro の系において BTG2 の強発現と細胞増殖には強い負

の相関が認められることが知られている。(Iacopetti et al., PNAS, 1999)

我々は乳癌検体 148 例の検討から、エストロゲンレセプター (ER) 陽性乳癌の 46% に BTG2 の発現が欠損すること。また、癌細胞増殖を促進する因子であり、乳癌症例の約 50% で発現亢進が認められる CyclinD1 の発現と BTG2 の発現が逆相関にあることを証明し、in vitro の検討を加えて報告した。

(Kawakubo et al., Cancer Res, 2006) また、妊娠期間中に乳腺上皮細胞が増殖・遊走し成

熟乳腺を形成する過程で、BTG2 発現がエストロゲン・プロゲステロンにより抑制されることを示し、BTG2 が乳腺上皮細胞の増殖・分化・遊走を制御していることを報告した。(Kawakubo et al., *Oncogene*, 2004) さらに我々は研究を進め、①乳腺上皮細胞において活性が亢進する MMTV promoter の下流に、マウス BTG2 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウス (BTG2(+))マウス) の作成、及び②テトラサイクリン誘導システムを利用した乳癌細胞における BTG2 発現系を作成し、総合的に BTG2 と乳腺上皮・乳癌及び女性ホルモンの関係について解析を行い、以下に示す研究成果を得ている。

BTG2(+))マウスにおける表現形の大きな特徴は、授乳期における仔マウスの成長不良であった。我々はこの成長不良が母体乳腺の発育不良に起因する乳汁分泌量低下によると仮定し、乳腺の発育を評価するため、妊娠時の乳腺を経時的に採取し、乳管の染色を行った。その結果 8 週齢未妊娠の BTG2(+))マウス乳腺では野生型では認められた乳管の budding や分岐がほとんど認められず、妊娠後 7・20 日目において野生型に比して乳腺組織は非常に未成熟であることが確認された。この結果より、乳管上皮細胞の増殖・分化には、妊娠時のエストロゲンの上昇に伴う BTG2 の発現調節が重要な因子であることが示唆される。

これら女性ホルモンと BTG2 及び細胞増殖に関する結果を踏まえ、公開されたデータベース上のマイクロアレイデータ (<http://www.oncomine.org/>) の検討を行ったところ、BTG2 陽性乳癌患者において、エストロゲン拮抗剤であるタモキシフェン (TAM) に対する感受性の亢進が認められた。

この現象を *in vitro* 及び *in vivo* において検証するため、テトラサイクリン誘導システム (Tet 誘導) による BTG2 発現系を ER(+) 細胞株 MCF7 において作成し、BTG2 と TAM 感受性についての検討を行った。Tet 誘導による著明な BTG2 の発現亢進を、mRNA 及び蛋白質レベルにて確認後に、MTT assay を施行したところ、BTG2 の発現により細胞増殖能は抑制され、さらに BTG2 発現下では TAM による細胞増殖抑制の増強効果が認められた。

この細胞をマウス乳腺へ異種移植を行うと、腫瘍の生着が認められ、飲水をテトラサイクリン含有水とすることで、腫瘍部における BTG2 の著明な高発現が mRNA 及び蛋白質レベルで確認された。この際、腫瘍の増大率は *in vitro* と異なり、BTG2 の発現による差異は認めなかった。このモデルを用いて、腫瘍体積が 150mm³ を超えた時点を Day1 とし、飲水をテトラサイクリン含有水とし、TAM ペレット (徐放: 21 日間) をマウス皮下

へ投与したところ、BTG2 発現下において TAM による著明な抗腫瘍効果、及び腫瘍細胞における Ki67 発現の低下、アポトーシスの指標である cleaved-caspase3 の亢進が確認された。これらの結果から BTG2 陽性腫瘍においては TAM に対する感受性が著しく亢進していることが示唆された。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、細胞周期制御因子 BTG2 が乳癌悪性化に関わると同時に、遺伝子改変動物モデルを用いることで、*in vivo* における乳管上皮細胞の増殖・分化に重要な役割を持つことが示され、さらに BTG2 の発現が内分泌療法の奏効を規定している証拠を得つつある。これらの知見を基に、タモキシフェンによる抗腫瘍効果と BTG2 発現の相関関係、及びそのメカニズムを *in vitro*, *in vivo* 更に、臨床検体を用いて示し、内分泌療法の個別化治療を目的とする BTG2 を用いた薬剤感受性予測法の確立を目指し、臨床への適用を試みることを本研究の目的とした。具体的には、

- (1) 上記の *in vivo* における BTG2 発現と TAM 感受性につき、施行匹数を増やしての確認・検証
- (2) (1) で得られる異種移植された腫瘍を用いた、Ki67 やアポトーシスマーカー、さらに ER-coactivator, -corepressor の発現検討
- (3) BTG2 は TAM 感受性にどのようなメカニズムで作用するのか、*in vitro* における機能解析
- (4) よりヒト乳癌の環境に近づけた、BTG2 コンディショナルノックアウトマウスモデルを用いた、BTG2 欠損乳癌における TAM 感受性の検討
- (5) TAM を用いた術前内分泌療法施行患者の凍結切片より、Laser Capture Micro-dissection 法により癌部・非癌部を分離し、抽出した RNA ライブラリーにおける、BTG2 発現の検討と TAM の効果との相関の検討
- (6) 術後補助療法として TAM を使用した臨床症例における BTG2 発現と予後の検討

これらを明らかにすることで、アロマターゼ阻害剤を含む、乳癌における内分泌療法の機能解析を通じた個別化療法への道を開くと考えられる。さらに臨床検体による、術前 TAM 投与による腫瘍縮小効果と BTG2 発現の検討は、基礎データに臨床面からの大きな裏付けを与えるものと期待される。これら基礎的・臨床的検討を同時に行うことで、BTG2 を用いた内分泌療法の個別化を目的とした薬剤感受性予測法の確立を目指し、最終的に臨床への運用を目指すことにより、乳癌の術前・術後補助療法への指針を与えることは、

非常に意義深いと考えられた。

3. 研究の方法

(1) Tet 誘導発現細胞を用いた in vivo における BTG2 発現と TAM 感受性の検討

我々は ER(+) 乳癌細胞 MCF7 において、レンチウイルスベースで BTG2 の Tet 誘導発現モデルを構築済みであり、本細胞をマウス乳腺へ異種移植を行い、形成された腫瘍に BTG2 発現を誘導し、TAM 感受性を検討する。既にこの系を用いて腫瘍の生着、及びテトラサイクリン含有水を飲水としたマウスの腫瘍細胞における BTG2 の高発現を、定量 PCR 及び免疫染色にて確認済みであり、TAM 感受性が BTG2 高発現下で亢進することが、前実験で確認されている。

(2) 異種移植モデルにおける腫瘍を用いた各種因子の検討

(1) の異種移植モデルで形成された腫瘍組織は分割し、凍結検体及びパラフィン包埋として保存され、各種用途に使用可能である。増殖マーカーである Ki67 は BTG2(+) TAM(+) 腫瘍において著明な発現低下を認め、一方でアポトーシスマーカーである cleaved caspase3 は発現の亢進を認め、①の腫瘍増大の検討と同様に、BTG2 発現下において TAM の効果が増強されることが予想される。よって、(1) において行う確認実験からの検体を用いてこれら所見が得られるかを追加で検討する。また、BTG2 により発現が抑制され、細胞増殖に重要な働きをもつ CyclinD1 の発現検討や、後述する (3) において検討する TAM 感受性に重要な働きを持つと考えられる AIB1, PIN1 等の発現も検討する。

(3) BTG2 発現が TAM 感受性にどのようなメカニズムで影響を与えるかの機能解析

ER co-activator である AIB1, PIN1 の高発現は ER(+) 乳癌細胞において著明な増殖促進を誘導する。よって、免疫沈降法により BTG2 は AIB1, PIN1 と直接結合すること、さらに colony formation assay により、BTG2 存在下では AIB1, PIN1 による増殖促進が完全に抑制されることを示す。また、Hurtado らにより AIB1 は PAX2 非存在下で HER2 intron 上の ER binding site へ結合して HER2 の発現促進を誘導し、TAM 感受性を抑制することが報告された。(Hurtado et al., Nature, 2008) この報告と我々の成果を総合し、BTG2 は AIB1 と結合することにより、この ER binding site への結合を阻害し、HER2 とのクロストークを遮断することにより TAM 感受性亢進を得ているのではないかと仮説を立てた。ChIP 法及び免疫沈降法等を駆使してこの仮説を証明し、BTG2 による TAM 感受性亢進のメカニズムを明らかにすることを旨とする。

4. 研究成果

(1) TAM 投与された術後乳癌患者における BTG2 発現と予後

臨床データとして、術後 TAM のみを投与された患者群 60 人のマイクロアレイデータ解析を行った。乳癌組織中の BTG2 高発現症例において有意に無再発生存率が高く、多変量解析では BTG2 発現のみが有意な予後因子であった。(図 1)

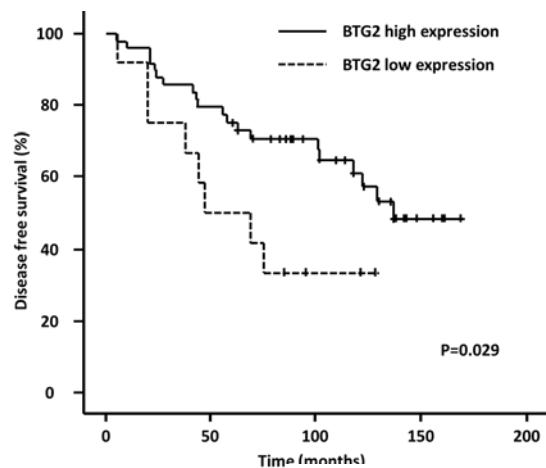


図 1

(2) Limiting dilution による MCF7 サブクロンの検討

Single cell limiting dilution 法により抽出された MCF7 の各サブクローンについて、TAM に対する感受性 (IC50) と BTG2 発現を検討したところ、BTG2 高発現株では TAM に対する感受性が高く、低発現株では、耐性となった。(図 2) これら 20 種のサブクローンに対して、IC50 を縦軸に、BTG2 発現を横軸にして散布図を作成すると、両者に有意な相関が認められた。これら結果より、BTG2 発現により TAM 感受性が変化することが示唆された。(図 3)

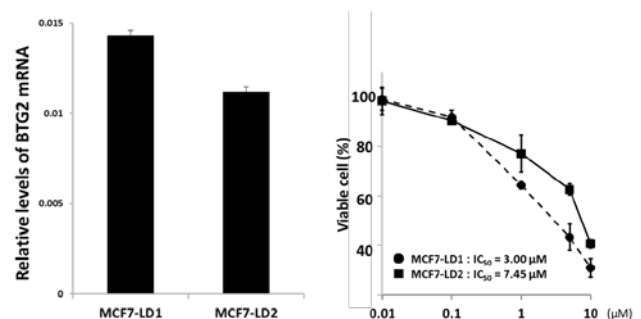


図 2

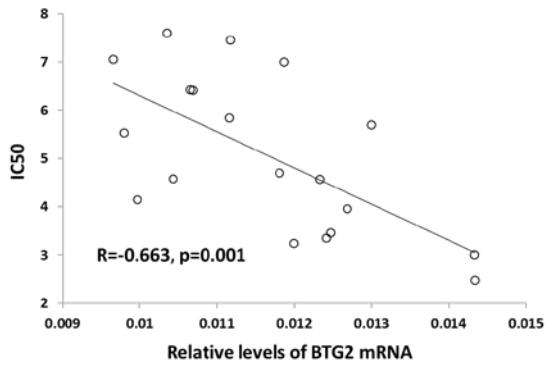


図 3

(3) マウス異種移植モデルにおける BTG2 発現による TAM 感受性の変化

MCF7 を用いて、テトラサイクリン誘導による、BTG2 高発現腫瘍モデルを作成後、免疫不全マウスの mammary fat pad へ注入した。この担癌マウスへの TAM 投与では、BTG2 発現下においてのみ腫瘍増大抑制と腫瘍径 (図 4)・重量 (図 5)・Ki67 発現 (図 6・7) が低下しており、TAM 感受性が著しく亢進していることが示された。これら結果から、in vivo においても BTG2 発現による感受性の変化が生じる事が示唆された。

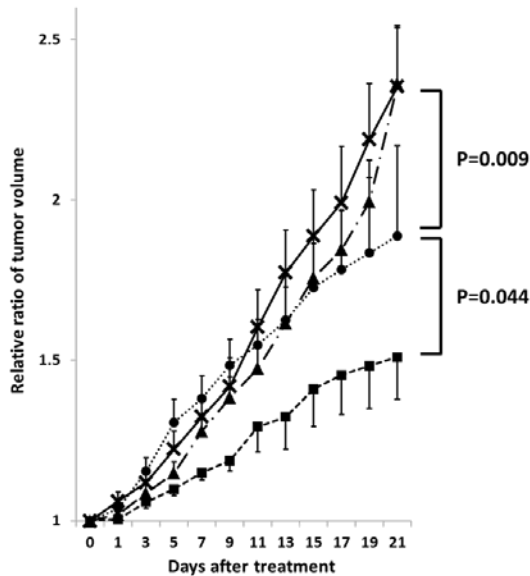


図 4

これらの結果から、BTG2 高発現乳癌では TAM 感受性が著しく亢進していることが示された。今後のさらなる検討が必要であるが、TAM に対する感受性予測因子としての臨床応用が期待されると考えられた。

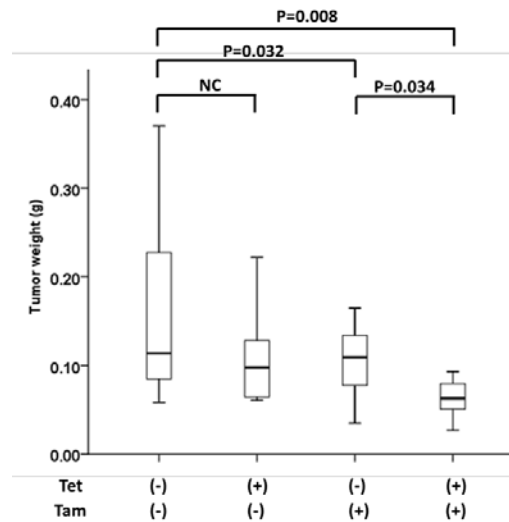
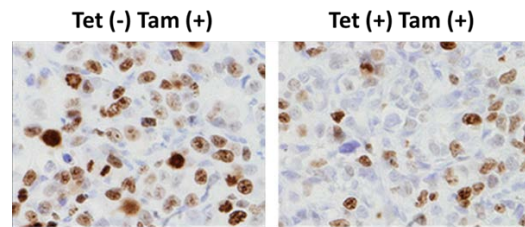


図 5



Ki67 expression

図 6

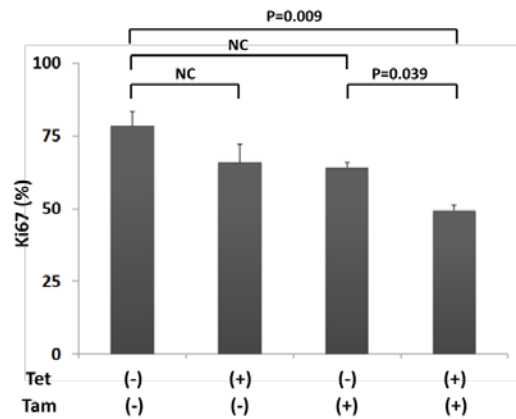


図 7

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 林田 哲, Loss of B-cell translocation gene 2 in estrogen receptor-positive breast cancer and tamoxifen resistance, ASCO Breast cancer symposium, 2011.9.9, 米国サンフランシスコ

② 高橋 麻衣子, Loss of BTG2 expression in breast cancer predicts tamoxifen resistance, 日本癌学会学術総会, 2011.10.5, 名古屋

③ 高橋 麻衣子, Loss of BTG2 expression in breast cancer predicts tamoxifen resistance, San Antonio Breast Cancer Symposium, 2010. 12. 10, 米国 サンアントニオ

④ 林田 哲, 臨床応用を目指す新しい内分泌療法の奏効を規定する因子の検討, 日本乳癌学会総会, 2010. 6. 25, 札幌

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 浩光 (JINNO HIROMITSU)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20216261

(2) 研究分担者

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80327543

高橋 麻衣子 (TAKAHASHI MAIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 50348661

坂田 道生 (SAKATA MICHIO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 60235158

(平成 22 年度のみ研究分担者として参画)

(3) 連携研究者
なし