

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461952

研究課題名(和文) 内分泌療法耐性乳癌におけるエストロゲン付加および枯渇療法の治療効果予測因子の検索

研究課題名(英文) Detection for predictive factors of estrogen addition and depletion therapy in endocrine therapy-resistant breast cancer

研究代表者

大本 陽子 (Omoto, Yoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80642561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は、乳癌の内分泌療法感受性を予測する因子の抽出である。長期のアロマターゼインヒビター(AI)治療中AI耐性となり、エストロゲン治療が著効したエストロゲンレセプター(ER)陽性再発乳癌患者の検体を用い、ノンゲノミックパスウェイを経由した経路がAIの反応性の違いに関与している可能性を示唆した。また、早期のERの遺伝子変化が内分泌療法への感受性の変化に関与していることを指摘する事に成功し、さらにこの早期の遺伝子変異の検出が血液サンプルでも可能であり、血液にて内分泌療法の効果予測が出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to detect predictive factors of endocrine therapy sensitivity of breast cancer. A specimen from estrogen receptor (ER)-positive recurrent breast cancer patient who became aromatase inhibitor (AI) resistant during long-term AI treatment was applied for this study. It was suggested that the non-genomic pathway was involved in the difference in response of AI treatment. Furthermore, we succeeded in pointing out that early ER genetic change is involved in a change in susceptibility to hormonal therapy and we also demonstrated that the blood sample is also possible to use for monitoring of this early gene mutation. Our finding has a possibility to provide a great benefit to breast cancer patients to predict endocrine therapy responsiveness.

研究分野：エストロゲンレセプターの分子生物学的機能解析

キーワード：エストロゲンレセプター 乳癌 内分泌療法 ホルモン療法 ホルモン依存性

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌の治療はそのバイオロジーに基づき決定され、ERが陽性であることが、内分泌療法(抗エストロゲン療法)の適応条件となる。しかしエストロゲンレセプター(ER)陽性乳癌の内、約30%は治療に反応せず、また治療中にERが陰転化し治療に抵抗性になるものも他、ERが陽性のまま治療抵抗性になるものも存在する。このように治療の指標と実際の治療反応性が異なることは大きな問題である。このような治療抵抗性の癌では、別の内分泌療法が著効したり、さらにはエストロゲンそのものを投与することで腫瘍縮小効果を示したりすることがある。さらにはエストロゲン療法が無効になった際に、以前抵抗性になった抗エストロゲン剤が再び著効するなどの現象が観察される。

(2) 乳癌再発患者に対する抗エストロゲン療法とエストロゲン療法の交代療法は、比較的温和な内分泌療法を長期にQOLを維持しながら使用できるという大変大きなメリットがあるが、エストロゲン依存性癌にエストロゲンを投与するという全く相反する治療であるため、これが有効であるか否かを予測する指標が求められる。

(3) 現状では内分泌療法に対し抵抗性となるメカニズムや反応性の違いを予測する因子は明らかになっておらず、これらの詳細な分析が急務とされる。

2. 研究の目的

研究の背景で述べた通り、内分泌療法に対する抵抗性の獲得メカニズムおよび反応性を予測する因子を抽出することが本研究の目的である。

(1) ER陽性乳癌が、ER高発現のままで内分泌療法抵抗性になるメカニズムの解明

(2) 内分泌療法の治療効果を予測する因子の抽出

3. 研究の方法

(1) AIによる治療を行っているER陽性再発乳癌患者の内、AI抵抗性となった例に対しエチニルエストラジオール(EE2)によるエストロゲン治療をおこない、その反応性を確かめた。治療の経過中に再発組織および血液サンプルの採取、保存を行い、これらの検体を用い、今回の検討を行った。

1. 治療前、治療中および治療抵抗性となった後に採取された再発乳癌組織を用い、免疫染色法にて既知の内分泌療法に関する因子の発現パターンを解析した。

2. 治療前、治療中および治療抵抗性となった後に採取された再発乳癌組織の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析し、治療に対する反応性と関係がありそうな因子の抽出を行った。

(2) ER遺伝子変異が内分泌療法の感受性に影響するとの報告があるため、この点についてEE2治療を行った再発乳癌症例および原発性乳癌症例の組織検体において解析を行ない、遺伝子変異の種類、頻度と内分泌療法に対する抵抗性と検討を行った。

(3) 長期にわたる乳癌治療の過程において、何度も乳癌組織を採取し治療効果を確認する事は実際の臨床現場においては不可能に近い。より現実的な治療効果予測を可能とするために、患者の血液サンプルを用い、血漿内のセルフリーDNA(cfDNA)の解析によりこれまで得られた結果と同様に、内分泌療法の反応性の違いと関連があるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 長期のAI治療中AI耐性となり、EE2治療を行った6人の患者からの治療前、治療中、治療抵抗性になり治療を終了した際の再発組織サンプルを採取した。6人の患者のうち5人はEE2に著効したが、1人は著効しなかった。免疫組織化学により13種類のホルモン依存性および癌の増殖、進展に關与するよく知られた乳癌關連因子の発現を検討した。

1. その結果、EE2投与前では、ERおよびアンドロゲン受容体(AR)の両方の染色が核内で強く、プロゲステロン受容体(PgR)はほとんど染色されなかった。EE2投与はER発現を有意に低下させ、PgR発現を増加させたが、ARはEE2にて核内ARの低下および細胞質内ARを増加させた。BRCA1の細胞質内の染色は、EE2によって有意に増加したが、核染色は減少する傾向があった。個々サンプルの比較では、EE2処理後にPgRの増加が少なく、AKTは減少し、治療が著効しなかった例ではpAKTの増加を認めた。

使用したER陽性でAI耐性サンプルでは、EE2がER下流遺伝子を活性化したにも関わらず、細胞増殖を刺激しなかった。これは、ホルモン耐性細胞がノンゲノミックパスウェイからの増殖シグナルを受け取り、これがAIの反応性やEE2処理に対する感受性に反映され得ることを示唆した。

2. 治療前、治療中、治療に抵抗性となった後の遺伝子発現の状況を、マイクロアレイを用い網羅的に解析し、薬剤反応性の違いに關係すると思われる遺伝子の抽出を試みた。多くの関与が疑われる遺伝子を認めたが、その中でも癌細胞の遊走や転移に關与するSEPTIN9や、細胞の周期や分化に關与が認められているS100Pを候補遺伝子として抽出し、原発性乳癌にてこれらの遺伝子発現とER発現や内

分泌療法への反応性の違いとの検討を行った。その結果予後に関係したのはER陰性の症例であり、ER陽性乳癌ではこれらの発現が予後に大きく関わっているという関連性は認められなかった。つまり原発性乳癌のサンプル採取段階ではERの発現の有無がこれらの遺伝子発現に關与しており、治療の経過途中でのどのように発現が変化しているかを見るのはサンプル数が少ないため困難であると考えられた。

(2) 近年AI治療中にエストロゲンレセプター(ER)に生じる遺伝子変異がエストロゲンへの感受性を変化させるという報告がある。低頻度の希少変異をかなり早期の段階で検出できるドロップレットデジタルポリメラーゼ連鎖反応(ddPCR)という検出方法を用い治療感受性との影響を検討した。

最近の検証によれば、AI治療への抵抗性獲得の主な潜在的なメカニズムは、ER遺伝子の活性化に影響を及ぼすリガンド結合ドメインの突然変異にあるとの報告がある。したがって、ER遺伝子変異の検出は、治療の効果を予測するバイオマーカーとして有用である可能性がある。我々は、原発性乳癌270例とER陽性の転移性乳癌検体55例のあわせて325症例を用い、ddPCRによりESR1変異を高感度に検出することを試みた。我々のddPCRアッセイでは、0.25コピー/mLの低濃度のESR1変異分子を検出することができた。選択されたカットオフによると、ESR1突然変異は、270の原発性乳癌検体の内7例(2.5%)および55例の転移性乳癌検体の内11例(20%)に認められた。その11例の転移性乳癌のうち5例(45.5%)が最も一般的なER突然変異であるY537Sを有し、他の4例(36.3%)がそれぞれD538G、Y537N、およびY537Cを有していた。興味深いことに、2人の患者が2つのER突然変異、Y537N/D538GおよびY537S/Y537Cを有し、2人

の患者が 3 つの ESR1 突然変異、Y537S / Y537N / D538G を有していた。さらに生検を行った 8 名の患者は 2 回以上生検を行い、4 人が原発性乳癌と再発乳癌の標本を有し、4 人は治療抵抗性となった時の 2 標本を有していた。これらの 8 人のうち 4 人が最初の生検では ESR1 突然変異は同定されなかったが、治療抵抗性になった時には ER 突然変異を認めた。ddPCR 法は、内分泌療法耐性症例においてシーケンスなしで ER 変異を検出する次世代精密検出の有望なツールであり、治療戦略の決定を支援する可能性がある。早期の ER の遺伝子変化がホルモン療法への感受性の変化に関与していることを指摘する事に成功した。

(3) ここまで我々は、原発性乳癌および転移性乳癌患者におけるER遺伝子変異の逐次測定が内分泌療法の効果予測因子になりうる可能性について検討重ねて来た。遺伝子変異の検索はこれまで腫瘍組織そのものをい行われて来たが、実際の臨床現場において治療の変更を迫られる度に再発組織のサンプルを採取する事は困難である。そこで、血液中に存在し、体を循環するcfDNAにより、同様の治療効果予測が可能となるか否かの検討を行った。

乳癌患者119人より得られた253例の血漿サンプルがこの研究に登録された。症例は、保存血漿試料が原発性乳癌の治療前および治療後に採取され、転移が見つかった後の治療の過程で2回以上採取されている場合に限った。cfDNAは、77人の原発性乳癌患者からの154例の血漿サンプルおよび42人の転移性乳癌患者から得られた99例の血漿サンプルから単離された。治療前後の各cfDNA ER変異の変化を調べるために、我々は、ddPCRを用いて最初の血液試料中のcfDNA ER突然変異率との差異を分析した。

原発性乳癌群におけるER突然変異率を、cfDNA ER突然変異率の増加を決定するための最小カットオフとして用いた。cfDNA ER突然変異は、42人の再発乳癌患者のうち12人(28.6%)からのcfDNA、13サンプルで見出された。12人の転移性乳癌患者のうちcfDNA ER突然変異が増加している合計10人(83.3%)は、治療に対する応答が不良であった。生存解析では、cfDNA ER突然変異の増加は、内分泌療法後の有効期間の短縮を予測する可能性が認められた(P = 0.0033)。

我々は、再発乳癌患者のcfDNAにおけるER突然変異のddPCRモニタリングが、関連する予測情報を提供する実現可能かつ有用な方法であることを示した。

(4) 以上の研究結果より、内分泌療法治療中に起こる応答性の変化は早期の ER 遺伝子変異が関わっている可能性が示唆された。この遺伝子変異の解析には乳癌組織以外にも血液中の cfDNA 解析が有用であり、血液が使用可能であれば、経過観察途中に治療不応になった際の次の治療の選択が容易になり、乳癌患者に大きなメリットとなる。遺伝子変異の詳細についてはこの先も解析を続ける。

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 3 件)

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of monitoring ESR1 mutations in circulating cell-free DNA in estrogen receptor positive breast cancer patients. Oncotarget. 査読有 2016 May 31;7(22):32504-18. doi: 10.18632/oncotarget.8839.

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Omoto Y, Iwase H. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens. Transl Res. 査読有 2015 Dec;166(6):540-553.e2. doi: 10.1016/j.trsl.2015.09.003. Epub 2015 Sep 14.

Omoto Y, Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Hayashi M, Sueta A, Fujiwara S, Taguchi T, Iwase H. Immunohistochemical analysis in ethinylestradiol-treated breast cancers after prior long-term estrogen-deprivation therapy. Springerplus. 査読有 2015 Mar 5;4:108. doi: 10.1186/s40064-015-0851-8. eCollection 2015.

〔学会発表〕(計 5 件)

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Tomiguchi M and Iwase H. Clinical significance of sequential measurements of ESR1 mutations in plasma cell-free DNA in estrogen receptor positive recurrent metastatic breast cancer patients. The 39th San Antonio Breast Cancer Symposium 2016/12/07 San Antonio, TX, USA

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Iwase H. Clinical significance of ESR1 mutations using droplet digital polymerase chain reaction assay in 325 breast cancer samples. The 38th San Antonio Breast Cancer Symposium 2015/12/12 San Antonio, TX, USA

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Iwase H. Advances in Breast Research 2015/10/10 Bellevue, Washington, USA

Iwase H, Takeshita T, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Yamamoto Y. ESR1 gene alterations in the metastatic breast cancer with resistance to aromatase inhibitor. Advances in Breast Research 2015/10/10 Bellevue, Washington, USA

大本陽子、竹下卓志、指宿睦子、藤原沙織、末田愛子、林 光博、山本聡子、稲尾瞳子、奥村恭博、村上敬一、山本 豊、岩瀬弘敬 長期にアロマターゼ阻害剤を投与した ER 陽性再発乳癌患者における EE2 治療前後の遺伝子発現の免染での検討 第 22 回日本乳癌学会学術集会 2014/7/10 大阪(大阪国際会議場)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大本 陽子(OMOTO, Yoko) 京都府立医科大学 医学研究科 客員講師 研究者番号 : 80642561

(2)研究分担者

岩瀬 弘敬(IWASE, Hiroataka) 熊本大学・大学院生命科学研究部 教授 研究者番号 : 40211065

山本 豊(YAMAMOTO, Yutaka) 熊本大学・大学院生命科学研究部 准教授 研究者番号 : 20398217

田口 哲也(TAGUCHI, Tetsuya) 京都府立医科大学 医学研究科 教授 研究者番号 : 80243260