

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10057

研究課題名(和文) 転移乳癌に対するエストロゲン付加療法のメカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis of estrogen addition therapy for metastatic breast cancer

研究代表者

村上 敬一 (Murakami, Keiichi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：20530124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：通常の内分泌療法に抵抗性となった転移乳癌にエストロゲン付加療法が効果を示すことがある。エストロゲン付加療法を行った症例の転移巣や血液検体を経時的に収集し、同療法の効果予測やメカニズムについて検討した。
エストロゲン枯渇療法後のエストロゲン受容体(ER)は転移巣で多くの場合高発現しており、その血液中の cell free DNAにERの遺伝子変異が見いだされた症例ではその後のに効果を示しにくいということが判明した。

研究成果の概要(英文)：Estrogen addition therapy may be effective for metastatic breast cancer that has become resistant to ordinary endocrine therapy. We collected metastatic lesions and blood specimens of patients treated with estrogen addition therapy over time, and examined the effect prediction and mechanism of the therapy.
The estrogen receptor (ER) after estrogen depletion therapy is highly expressed in metastatic lesion in many cases and it is difficult to show the effect afterwards in cases where ER gene mutation was found in cell free DNA in the blood It has been found.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：転移乳癌 エストロゲン療法 エストロゲン受容体 c f DNA

1. 研究開始当初の背景

乳癌の 70-80%は乳癌細胞に **estrogen receptor (ER)**を発現し、エストロゲンが ER に結合することでエストロゲン依存性に増殖する。そのため、エストロゲン枯渇を目的とした内分泌療法は乳癌の有効な治療法であるが、この治療を長期間施行された患者の多くが耐性を獲得し腫瘍増大を認める。このような内分泌療法耐性患者にエストロゲン (エチニルエストラジオール: **EE2**) を投与すると逆に腫瘍縮小を認めることがある。しかし、このエストロゲン付加療法の分子メカニズムや適応の詳細は未だ不明である。

最近では、内分泌療法に **mTOR 阻害薬**や **CDK4/6 阻害薬**を併用することで治療効果を上げている。一方、エストロゲン療法は内分泌療法から化学療法へ移行する時期に用いられると有用であると考えられるが、そのポジショニングや適応は明らかでない。また、その作用機序についてもよく理解できておらず、培養細胞を用いた研究では、アポトーシスに関連する **Fas**リガンドがエストロゲン依存性に発現するという説や、患者由来の **xenograft** を用いたモデルでは **ER** 遺伝子である **ESR1** の増幅があるとされている。しかしながら、臨床材料を用いた検討が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲン付加療法を受けた乳癌例の治療前後の腫瘍ならびに血液サンプルを対象として、ホルモン療法に関連する **ESR1**、**PIK3CA**、**Akt**などの遺伝子発現や変異を解析し、内分泌療法耐性乳癌においてエストロゲン療法の分子メカニズムの解明ならびに治療効果を予測する因子の解明を目指す。

3. 研究の方法

「内分泌療法抵抗性乳癌に対する逐次内分泌療法後の EE2 治療の臨床試験」(UMIN000002831)、「エストロゲン療法に抵抗性となった閉経後転移乳癌におけるアロマターゼ阻害薬 (AI) とフルベストラントの有用性の比較検討」(UMIN 000013890)にて臨床試験を行った。これらに登録された症例の患者情報や腫瘍の病理学的特徴ならびに治療に対する反応性の情報を収集したが、これらは患者同意をえた上で、上記試験の倫理委員会承認を得て行った。

また治療による副作用、特に子宮や血液凝固に与える影響を想定されるため、安全性については臨床試験に協力いただいた各研究者に逐一情報を届け、患者へ不利益がもたらされないような体制の上を行った。

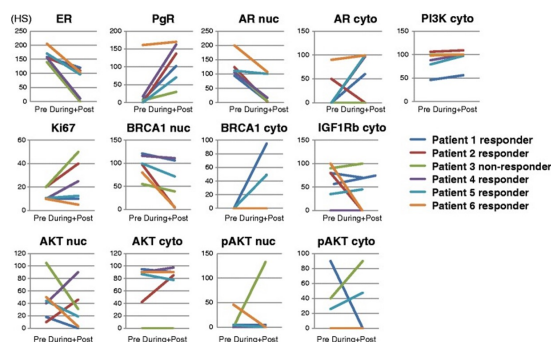
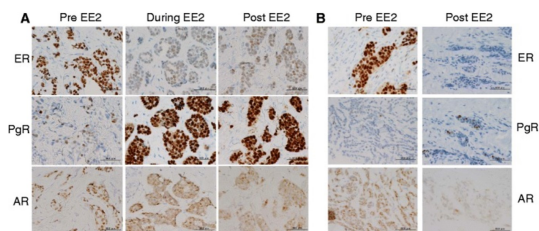
転移組織は **ESR1**、**PIK3Ca**、**Akt** の変異検索、ならびにマイクロアレイ解析を行った。血液

は **droplet digital PCR** 法により、**cell free DNA** における **ESR1** の変異を同定した。

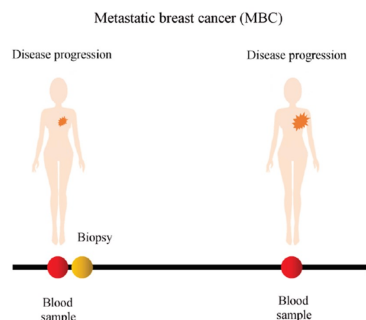
4. 研究成果

臨床試験登録症例は 40 例で、そのうち 12 例 (30%)に奏功が、24 週以上の不変が 5 例 (12%)に認められ、臨床的有用率 (CBR) は 17 例 (42%)であった。CBR 以上の例における EE2 の投与期間中央値は 8.4 か月であった。さらに、CBR が得られた 17 例中 8 例には AI を投与して再度の EE2 療法が行われ、4 例で部分効果以上が得られた。

EE2 治療前後で組織が得られた症例では、治療前乳癌細胞には mRNA、蛋白レベルで ER が過剰に発現しており、エストロゲン枯渇状態が長期間続いたためのエストロゲン高感受性の状態であったと推察できる。さらに、治療後には ER 発現は低下し、プロゲステロン受容体 (PgR) の発現が高くなった。

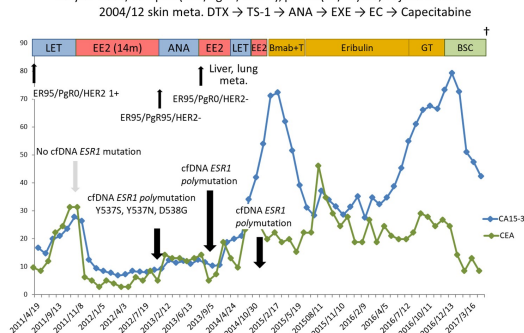


この結果から、EE2 療法が効果を示すには転移病巣がエストロゲン高感受性の状態であることが必要である。

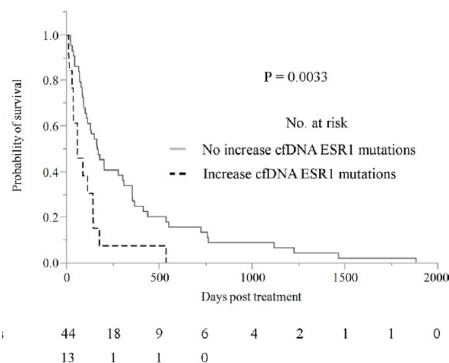


一方、転移乳癌においては治療前に組織と血液を、治療終了時には血液を採取したが、血漿中の cell free DNA における *ESR1* 遺伝子の点突然変異 (Y537S, Y537N, Y537C, D538G) は、EE2 投与前の 21 例で検索され、10 例 (47%) にいずれかの変異が認められ、多くは複数に認められた。

症例提示においても途中までエストロゲン療法に効果があった症例が、徐々にエストロゲン付加、枯渇交代療法に効果をなくした段階で、血液の cfDNA に *ESR1* 変異の発現が多数認められた。



治療前の cfDNA の *ESR1* 野生型において、EE2 の有効例が多い傾向にあったが統計学的には有意ではなかった。また、E380Q の変異は非常に頻度が少ないことが分かった。さらに、これら *ESR1* 遺伝子編を複数持っている症例では次の治療効果や生命予後が短いことが示唆された。



また、一連の研究の中で、転移組織と cfDNA での変異 *ESR1* 検出の一致率は 74.5% であり、両測定法が比較的安定していることを示した。

以上から、エストロゲン療法は ER 陽性 HER2 陰性再発乳癌の内分泌療法における最終段階での使用が進められるが、血液から得た cfDNA の *ESR1* 遺伝子変異が認められた症例ではその効果はわずかである可能性がある。今後は、治療前にこの *ESR1* 遺伝子変異を血漿の cfDNA から同定し、その情報をもって治療した群と、まったく情報を持たずに治療法を選択した群とを比較し、治療効果、生命予

後について検討を加え、治療法選択に *ESR1* 変異検索が有用であるか検討する臨床試験を予定している。

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 10 件)

1. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Iwase H.: *ESR1* and *PIK3CA* mutational status in serum and plasma from metastatic breast cancer patients: A comparative study. *Cancer Biomark.* 2018 doi: 10.3233/CBM-171161. (査読あり)
2. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Iwase H.: Clinical significance of plasma cell-free DNA mutations in *PIK3CA*, *AKT1*, and *ESR1* gene according to treatment lines in ER-positive breast cancer. *Mol Cancer.* 2018 17(1):67. doi: 10.1186/s12943-018-0808-y. (査読あり)
3. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Tomiguchi M, Murakami K, Omoto Y, Iwase H.: Prevalence of *ESR1* E380Q mutation in tumor tissue and plasma from Japanese breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2017 17(1):786. doi: 10.1186/s12885-017-3779-2. (査読あり)
4. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Omoto Y, Iwase H.: Analysis of *ESR1* and *PIK3CA* mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. *Oncotarget.* 2017 Jun 14;8(32):52142-52155. doi: 10.18632/oncotarget.18479. (査読あり)
5. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Omoto Y, Iwase H.: Comparison of *ESR1* Mutations in Tumor Tissue and Matched Plasma Samples from Metastatic Breast Cancer Patients. *Transl Oncol.* 2017 Oct;10(5):766-771. doi: 10.1016/j.tranon.2017.07.004. Epub (査読あり)
6. 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.* 2016 May 31;7(22):32504-18. doi: 10.18632/oncotarget.8839. (査読あり)
7. 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.* 2015 166(6):540-553.e2. doi:

10.1016/j.trsl.2015.09.003. (査読あり)

8. 岩瀬弘敬、竹下卓志、指宿睦子、山本 豊: ESR1 遺伝子変化とホルモン療法抵抗性癌と化学療法 43: 2499-2501,2016 (査読なし)
9. 竹下卓志、山本豊、指宿睦子、岩瀬弘敬: 乳がん領域におけるリキッドバイオプシーの現在 Mebio 特集: 乳がんの診断・治療 2016 70-76,2016 (査読なし)
10. 竹下卓志、岩瀬弘敬: 転移乳癌におけるリキッドバイオプシーの診断技術 PHARMSTAGE 1-7、2017 (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

1. Takeshita T, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H: Incidence and clinical relevance of ESR1 mutations in estrogen receptor positive breast cancer patients: 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会ワークショップ 2017/7/28 神戸
2. Takeshita T, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H: ER 陽性乳癌患者における ESR1 mutation のスポットおよび連続検索の臨床学的意義 第76回日本癌学会学術総会 2017/9/29 横浜
3. 岩瀬弘敬, 指宿睦子, 末田愛子, 竹下卓志, 富口麻衣, 山本 豊, 村上敬一: 閉経後進行乳癌におけるエストロゲン枯渇療法と付加療法との交代投与法の経験 第18回ホルモンと癌研究会 2017/06/15 福岡
4. Hiroataka Iwase: Treatment strategy for metastatic breast cancer with estrogen receptor-positive tumor.: 14th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology 29th July, 2016 Kobe, Japan.

[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 0 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
村上 敬一 (MURAKAMI, Keiichi)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 20530124

(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

(3) 連携研究者
()
研究者番号:

(4) 研究協力者
()