

平成30年 5月28日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10059

研究課題名(和文) 乳癌ホルモン療法の効果・耐性化に関連する血中微量ステロイドホルモンの探索的研究

研究課題名(英文) Role of the alternation of steroid hormone level in the response and resistance to endocrine therapy for breast cancer

研究代表者

佐治 重衡 (Saji, Shigehira)

福島県立医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：80446567

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)：日本人乳癌の75%は女性ホルモン(エストロゲン)依存性乳癌であり、ホルモン療法は最も重要な治療薬である。本研究ではホルモン療法の効果と耐性化に関わる要因について、ステロイドホルモンの変化という視点で研究をおこなった。様々な実験から、エストロゲンの濃度変化により、治療耐性化に関わる膜受容体の一つHER3の分解効率が変化することを見いだした。この分解はプロテオソーム経路によっており、エストロゲンの受容体(ER)を分解するユビキチンリガーゼNedd4-1がHER3の分解にも関与していることを同定した。Nedd4-1は増殖にも影響しており、これら3つの相互関係を解明していくことが重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Endocrine therapy to estrogen receptor (ER) positive breast cancer is the most important modality, since about 75% of newly diagnosed breast cancer is ER-positive. We explore the response and resistance related factors in terms of the alternation of steroid hormone level. From our several background experiments using cell study, we found that alternation of estradiol (one of estrogens) level affects the degradation speed of HER3. HER3 is one of membrane receptors which contributes to aggressiveness of breast cancer and resistance to endocrine therapy. We showed that enhanced degradation of HER3 depends on ubiquitin-proteasome pathway and specific E3-ligase, Nedd4-1, which also regulates degradation of ER. From these findings, we speculate that estradiol, ER and HER3 have crosstalk through regulation of each degradation process, and Nedd4-1 could play important role in breast cancer biology.

研究分野：腫瘍内科(乳癌)、エストロゲン受容体

キーワード：乳癌 エストロゲン エストロゲン受容体 HER3

1. 研究開始当初の背景

本研究は、乳癌ホルモン療法の効果やその後の耐性化に関わる、血液中微量ステロイドホルモンの同定とその変化を検証することを目的に研究を開始した。その研究過程で、エストロゲン濃度の変化がHERファミリー膜受容体の1つであるHER3の分解に影響を及ぼすことを見いだした。HERファミリーはホルモン療法耐性化に関連する因子としてよく知られているが、HER3に関しての知見は乏しく、特にエストロゲンやEstrogen Receptor (ER)との相互関係はあまり検討されていない。このため、これらの相互作用を明らかにすることを目的に研究を展開した。

2. 研究の目的

ER陽性乳癌におけるHER3分解機構の検証するために、ER陽性ヒト乳癌細胞株MCF-7を用いて分子生物学的解析を行う。invitro解析から得られた結果をもとに臨床検体における発現および予後解析することを目標とする。

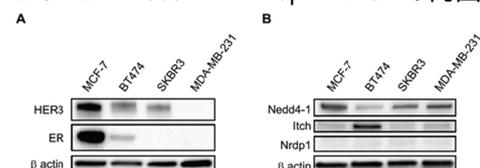
3. 研究の方法

まず、各サブタイプの代表的乳癌細胞株におけるHER3・ER、そしてHER3のリガンドであるHRG-1刺激した時にHER3を分解すると報告のあるユビキチンリガーゼNedd4-1・Nrdp1・Itchの内因性発現を確認し、実験に適切な細胞株の選択をおこなった。次にHER3の分解とその分解経路の検討を行い、最後にユビキチンリガーゼあるいはERをノックダウンさせた時のHER3分解への影響と細胞増殖への影響を検討した。それぞれの研究の方法、結果を次に示す。

4. 研究成果

(1). 各サブタイプのヒト乳癌細胞株MCF-7、BT474、SKBR3、MDA-MB231にけるHER3・ERおよびユビキチンリガーゼNedd4-1・Nrdp1・Itchの内因性発現の検討。
セルライセートをウエスタンブロットにて確認した。結果は、ER陽性乳癌細胞であるMCF-7においてHER3の高発現が認められた。このMCF-7にはNedd4-1のみのユビキチンリガーゼが内因性に発現していた(図1)。

図1: 各サブタイプ乳癌細胞株におけるHER3・ER・Nedd4-1・Nrdp1・Itchの内因性発現

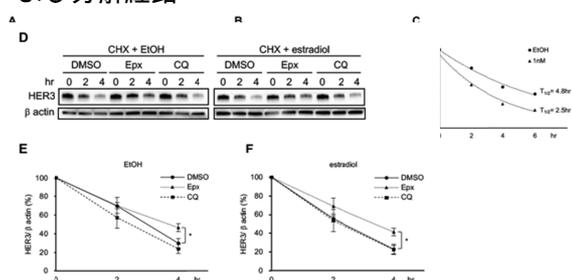


現

(2). エストロゲン存在・非存在下におけるHER3の分解とその分解経路の検討。

本申請では、HER3を強発現していたER陽性乳癌細胞株MCF-7を用いて実験を行った。まずER陽性乳癌において最も重要な増殖因子であるエストロゲン刺激(0.1nM, 1nM, 10nM)下でサイクロヘキシミド(CHX)による分解実験を行ったところ、1nMのエストロゲン濃度でHER3の分解効率が最も亢進し、半減期はコントロール(EtOH)の4.8時間から2.5時間へ短縮した。また、酵素阻害実験(プロテアソーム分解阻害剤: epoxomicin、リソソーム分解阻害剤: chloroquine)からエストロゲン刺激時のHER3の分解経路はプロテアソーム系であると同定した(図2)。

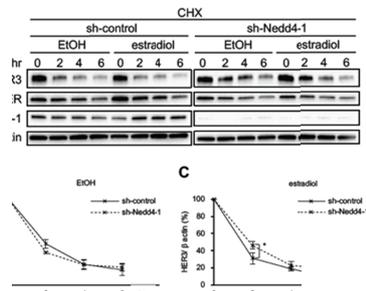
図2: エストロゲン刺激によるHER3の分解および分解経路

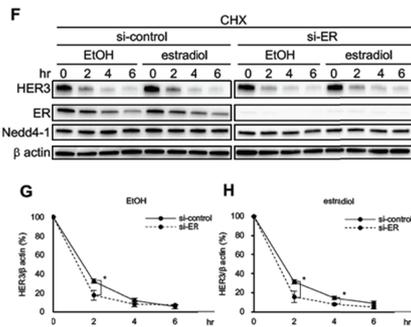


(3). sh-Nedd4-1およびsi-ERを用いたHER3分解への影響を検討。

エストロゲンによるHER3分解の亢進には、既知のユビキチンリガーゼNedd4-1、Itch、Nrdp1のいずれかが関わっていると考え、(1)の内因性発現を検討ではMCF-7にはNedd4-1のみの発現を認めた。そこでsh-RNAによりNedd4-1をノックダウンしたところ、エストロゲン刺激時のHER3分解効率亢進が消失することから、Nedd4-1を制御因子と同定した。またエストロゲン刺激によるERの分解もNedd4-1によって制御されることを確認した。次にERをsi-RNAによりノックダウンしたところ、コントロール、エストロゲン刺激下の双方でHER3の分解が亢進した。

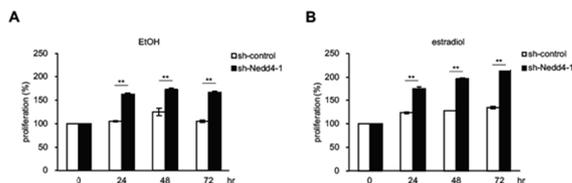
図3: sh-Nedd4-1、si-ERにおけるHER3分解





(4). sh-Nedd4-1/MCF-7 細胞における細胞増殖の検討。
Nedd4-1 がエストロゲン刺激の有無で細胞増殖に与える影響を sh-Nedd4-1/MCF-7 細胞を用いて cell counting kit-8(CCK-8) にて評価した。
結果は、コントロール (EtOH) およびエストロゲン刺激ともに sh-control/MCF-7 に比較し、sh-Nedd4-1/MCF-7 で有意に増殖活性が亢進していた (図 4)。

図 4 : sh-Nedd4-1 における細胞増殖アッセイ



これらの結果から、ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 では ER が HER3 の分解を抑制しており、エストロゲン刺激下では ER が急速に分解されることにより、HER3 の分解効率も亢進すると考えられた。また、この両者の分解効率をユビキチンリガーゼの Nedd4-1 が制御しており、これら分解機構への影響を通じて癌細胞の悪性度に関与していることが示唆された。さらに、この分解機構に関わる Nedd4-1 の臨床的意義や治療標的としての可能性を今後検証する必要がある。

(5). その他

連携研究者との関連研究として、VEGF とがん微小環境との関係を検証する基礎的研究、術前ホルモン療法臨床試験である JFMC 34-0601 試験の追加解析研究なども実施し、その成果を論文発表した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ueno T, Saji S, Masuda N, Kuroi K, Sato N, Takei H, Yamamoto Y, Ohno S, Yamashita H, Hisamatsu K, Aogi K, Iwata H, Yamanaka T, Sasano H, Toi M. Impact of clinical response to neoadjuvant endocrine therapy on patient outcomes: a follow-up study of JFMC34-0601 multicenter prospective

neoadjuvant endocrine trial. ESMO Open. 査読あり、3 (2) e000314, 2018. DOI:10.1136/esmoopen-2017-000314

Kiso M, Tanaka S, Saji S, Toi M, Sato F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. Int Journal of Cancer. 査読あり、in press, 2018.

Saji S, Kimura-Tsuchiya R, Sasaki E. Molecular diagnostics for precision medicine in breast cancer treatment: what does the future hold?. Breast Cancer. 査読なし、23(1):1-3, 2016.

阿部宣子、大竹徹、佐治重衡
乳癌発症リスクとその対策 女性ホルモンと乳癌。乳癌の臨床、査読なし、31(3): 187-192, 2016.

Saji S, Kimura-Tsuchiya R. Combination of molecular-targeted drugs with endocrine therapy for hormone-resistant breast cancer. Int J Clin Oncol. 査読あり、20(2):268-72. 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

須賀淳子、佐治重衡、ホルモン受容体陽性乳癌細胞における HER3 分解機構の解明、第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018 年 5 月 17 日、都市センタービル (東京都)

須賀淳子、田中伸幸、佐治重衡、Regulation of HER3 protein degradation in ER-positive breast cancer cell. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

須賀淳子、佐治重衡、ホルモン陽性乳がん細胞におけるエストロゲン刺激は HER3 分解に関与する、第 25 回日本乳癌学会学術総会、2017 年 7 月 14 日、マリンメッセ福岡・福岡国際会議場 (福岡県)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐治 重衡 (SAJI, Shigehira)
福島県立医科大学・医学部・腫瘍内科学講座・主任教授
研究者番号: 80446567

(2) 連携研究者

大竹 徹 (OHTAKE, Toru)

福島県立医科大学・医学部・乳腺外科学講座・主任教授
研究者番号： 50363750

佐藤 史顕 (SATO, Fumiaki)
京都大学・医学研究科・乳腺外科学・准教授
研究者番号： 20467426

(3)研究協力者

須賀淳子 (SUGA, Junko)
福島県立医科大学・医学部・腫瘍内科学講座・研究生

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)
宮城県立がんセンター研究所
がん先進医療開発研究部・部長