

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15097

研究課題名(和文) HER2シグナルの乳癌病理組織標本上における可視化の試み

研究課題名(英文) In situ visualization of HER2 signal in archival breast cancer specimens.

研究代表者

笹野 公伸 (Sasano, Hironobu)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50187142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌に対するHER2阻害剤の奏功性に関与する要因として、CEACAM6とHER2のタンパク質間相互作用(PPI)に着目した。BT-474乳癌細胞において、共免疫沈降反応によって、HER2とCEACAM6の結合を認め、さらに近接ライゲーションアッセイ(PLA)および超解像顕微鏡にて両タンパクのPPIを可視化した。病理組織標本においても、両タンパクのPPIをPLAにて証明した。また、CEACAM6ノックダウンにより、BT-474のHER2阻害剤の感受性が有意に低下した。以上、CEACAM6はHER2とのPPIによってHER2阻害剤の効果を修飾することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：It has become important to identify the surrogate markers regarding HER2 inhibitor sensitivity for HER2-positive breast cancer patients. In this study, we focused on protein-protein interaction (PPI) between HER2 and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) in breast cancer cells. In breast cancer RT-474 cells, HER2/CEACAM6 PPI was detected by using co-immunoprecipitation assay and visualized by using both proximity ligation assay (PLA) and high resolution microscopy. We then visualized HER2/CEACAM6 PPI by using PLA in human breast carcinoma tissues. Knockdown of CEACAM6 gene significantly decreased the anti-cell proliferative effect of HER2 inhibitor in RT-474. These findings suggest that CEACAM6 has an effect by PPI with HER2 on HER2 sensitivity in breast cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HER2 CEACAM6 タンパク質間相互作用 乳癌

1. 研究開始当初の背景

ヒト上皮細胞増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) ファミリーである HER2 は細胞膜に存在し、下流のシグナル伝達経路を介して細胞の増殖に関与している。HER2 陽性乳癌に対してはその阻害剤が治療として用いられるが、その奏功性を見極める因子の探索が急務とされている (Ghosh et al. 32nd Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium. 2009.)。我々は肺癌での検討にて、EGFR と Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule ファミリー (CEACAMs) との相互作用が、その阻害剤の効果と関係することを明らかにした (Kobayashi et al. Br J Cancer. 2012.)。EGFR ファミリーは増殖シグナルの活性化とともに、そのもの自身はエンドサイトーシスによって分解される。これまで HER2 陽性乳癌症例の病理組織診断を行ってきた経験から、CEACAM と HER2 の細胞膜上での発現動態が類似している事を認識し、“CEACAMs は HER2 と結合することによって HER2 を細胞膜に留め、エンドサイトーシスからエスケープすることで恒常的に増殖シグナルを発揮するのではないか?”という仮説をたてるに至った。

癌組織における HER2 検査は、基本的には病理組織標本を用いて行われる。その方法としてはタンパクレベルで評価する免疫組織化学と、DNA 増幅を評価する *in situ* ハイブリダイゼーション法があげられる。分子治療標的因子におけるタンパク相互作用は、薬剤の奏功性や耐性に深く関わることが明らかにされつつあり、病理組織標本でのタンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI) の評価技術の構築は臨床側からの強い要請でもあった。前述の免疫組織化学や *in situ* ハイブリダイゼーションは HER2 を単体で見する方法であり、HER2 に結合するタンパクを病理組織標本で可視化する技術はこれまで存在しなかった。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究では HER2 の腫瘍生物学特性から新規診断法の構築までについて、下記4点を明らかにすることを目的とした。

- (1) CEACAMs と HER2 の結合を証明
- (2) CEACAMs と HER2 結合の可視化
- (3) CEACAMs と HER2 の病理組織検体での結合の証明
- (4) CEACAM 結合 HER2 と HER2 阻害剤の効果との関係

本課題はこれまで長い間その実現が期待されていた組織標本上での可視化を初めて可能にするものである。本研究結果から、HER2 阻害剤の効果が的確に得られる症例を選別でき、そのための新規診断技術が開発されるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) CEACAMs と HER2 の結合を証明
HER2 陽性の乳癌培養細胞株である BT-474 (HER2 阻害剤 trastuzumab 高感受性) と MDA-MB-361 (trastuzumab 低感受性) を用いて、CEACAM6 の発現をウエスタンブロットイングおよび免疫細胞化学にて検討した。細胞はいずれも ATCC より購入した。両細胞における CEACAM6 と HER2 の結合性については、磁気ビーズ法による共免疫沈降にて評価した。

(2) CEACAMs と HER2 結合の可視化

BT-474 および MDA-MB-361 に対し、CEACAM6 及び HER2 の近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay: PLA) を行った。さらに、BT-474 に対し、CEACAM6 及び HER2 の二重免疫細胞化学を行い、超解像顕微鏡での観察を行った。PLA および超解像顕微鏡の詳細については下記のとおりである。

PLA : 近接する二つのタンパク質間を検出する目的で Olink Bioscience 社 (スウェーデン) により開発された技法 (Duolink in situ PLA) は *in situ* PLA であり、40 nm 以内に近接するタンパクを標識させる事が出来る。オリゴヌクレオチドを連結した PLA Probe (+鎖、-鎖) が 40 nm 以内に近接した場合にのみ、それらの核酸のライゲーション反応が生じ、環状構造が形成される。さらにポリマーラーゼ反応によって増幅を行い、特定の塩基配列に結合する蛍光プローブをハイブリダイズさせて、蛍光顕微鏡にて観察する (Soderberg, et al. Nat Methods. 2006) 。この PLA 技術を用いることで、病理組織標本上での HER2/CEACAMs 結合を可視化することが可能となる。

超解像顕微鏡 : 100 nm 以上の近接した二点を識別することができる高解像度を有する顕微鏡である。従って、100 nm 以上離れた2つの因子について、それぞれ緑と赤で標識すると独立した二つのドット (緑と赤) で認識される。2つの因子が 100 nm 以内に近接する場合、二点と認識することができず、黄色 (緑+赤) のドットとして認識される。この方法を用いることで PPI を評価することが出来ると報告されている (Winckler, et al. Sci Rep. 2003) 。本研究では構造化照明顕微鏡法 (Structured Illumination Microscopy : SIM) を採用し、株式会社ニコンの N-SIM (東北大学医学系研究科共通機器管理室) を用いた。

(3) CEACAMs と HER2 の病理組織検体での結合の証明

ホルマリン固定・パラフィン包埋された乳癌組織 36 症例について、CEACAM6 及び HER2 の PLA を行った。なお、乳癌症例はいずれも HercepTest (DAKO / アジレント社) により、HER2 陽性と評価された症例を使用した。

(4) CEACAM 結合 HER2 と HER2 阻害剤の効果との関係

BT-474 および MDA-MB-361 に対し、CEACAM6 を siRNA にてノックダウンし、trastuzumab 感受性の変化を検討した。Trastuzumab (ハーセプチン®) は中外製薬株式会社より購入した。

4. 研究成果

(1) CEACAMs と HER2 の結合を証明

ウエスタンブロッティングにて BT-474 と MDA-MB-361 のいずれにおいても、CEACAM6 タンパクの同等の発現が認められた。また、両細胞の HER2 タンパクの発現量についても同等だった。HER2 抗体を用いた共免疫沈降反応では、BT-474 に CEACAM6 の発現が認められ、MDA-MB-361 では認められなかった。

(2) CEACAMs と HER2 結合の可視化

BT-474 および MDA-MB-361 を用いた PLA では、BT-474 において CEACAM6 と HER2 のタンパク結合を示す PLA のドットが検出された。なお、BT-474 に対して、CEACAM6 を siRNA にてノックダウンすることによって CEACAM6/HER2 結合を示す PLA ドットは認められなくなった。

BT-474 に対し、CEACAM6 (緑) と HER2 (赤) の二重染色を行い、N-SIM で観察したところ、CEACAM6/HER2 結合を示す黄色のドットを検出した。

(3) CEACAMs と HER2 の病理組織検体での結合の証明

ホルマリン固定・パラフィン包埋を行ったサンプルでも PLA ドットを検出することができた。CEACAM6 および HER2 陽性乳癌症例において、PLA による HER2/CEACAM6 結合が検出された。なお、CEACAM6 の発現を発現強度にて 3 群に分けて解析を行ったところ、HER2/CEACAM6 結合 PLA ドットの数に有意な差は認められなかった。

(4) CEACAM 結合 HER2 と HER2 阻害剤の効果との関係

Trastuzumab 高感受性細胞 BT-474 は CEACAM6 ノックダウンにより、その感受性が有意に低下した。低感受性である MDA-MB-361 では、CEACAM6 ノックダウンによって trastuzumab の効果に影響は認められなかった。

CEACAM6 は乳癌において、Basal-like type と比較して Luminal type および HER2 type での発現が高く、さらに癌の増殖と逆相関することが報告されている (Balk-Møller, et al. Am J Pathol. 2014)。また、エストロゲン受容体陽性乳癌では、術後タモキシフェン療法を行った症例の再発に関連することが報告されている (Maraqa, et al. Clin Cancer Res. 2008)。HER2 は細胞質内にエンドサイトーシスによって取り込まれ (インターナリゼーション)

その一部はリサイクルされていると考えられており (Hendriks, et al. J Biol Chem. 2003)、一方でインターナリゼーションによって細胞膜に表在する HER2 の量が減少することが、trastuzumab の感受性の低下につながるとも考えられている (zum Büschenfelde, et al. Cancer Res. 2003)。我々の結果では、BT-474 および MDA-MB-361 はいずれも HER2 と CEACAM6 を同等に発現しているにもかかわらず、trastuzumab に感受性が大きく異なっており、その効果は HER2 の発現量に依存している訳ではないことが考えられた。両細胞の大きな違いは両タンパクの PPI の違いにあり、trastuzumab 高感受性である BT-474 は、共免疫沈降、PLA、および N-SIM のいずれの方法においても HER2/CEACAM6 の PPI を確認することができた。従って、CEACAM6 は HER2 と結合することによって HER2 阻害剤の効果が高めることが考えられた。その機序として、CEACAM6 は細胞膜上で HER2 と結合することによって、HER2 の細胞内へのインターナリゼーションを抑制し、HER2 を細胞膜に安定的に発現させているのではと想定される。現在、CEACAM6 を siRNA にてノックダウンし、HER2 のインターナリゼーションへの影響について検討している。

HER2 抗体薬 (阻害剤) として、trastuzumab の他に、pertuzumab があり、pertuzumab は HER2 の二量体形成を阻害する。また、trastuzumab emtansine は HER2 に結合した後、内在化することで抗癌剤である emtansine の作用を発揮させるものである。これらの機序が異なる薬剤の効果と CEACAM6 との関連を明らかにすることで、HER2 阻害剤選択の新たな指針を提唱することができると期待される。さらに trastuzumab の癌抑制機序として、抗体依存性細胞傷害 (antibody dependent cellular cytotoxicity) 作用の活性が上げられるが、CEACAM6 が HER2 を細胞膜に留めることによって、より効果的に ADCC 作用を活性化させることができのではと考えられる。現在、ADCC 活性への影響についても検討を行っている。一方で、CEACAM6 は CEACAM8 とも結合することが報告されており (Bonsor, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015)、我々もこの CEACAM6/8 結合が乳癌細胞でも観察されることを、PLA にて明らかにしている (データ未公表)。従って CEACAMs が HER2 阻害剤の効果におよぼす影響については、さらに他の CEACAM ファミリーと CEACAM6、もしくは HER2 との結合性を評価する必要がある。

分子標的治療薬の効果予測において、PPI を評価することでより詳細に効果が得られる患者を選定することができると考えられ、本研究では病理組織標本を用いた PPI の可視化技術として臨床応用に通ずる成果を得ることができた。

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2件)

(1) E. Iwabuchi, Y. Miki, K. Ono, Y. Onodera, H. Sasano. In Situ Evaluation of Estrogen Receptor Dimers in Breast Carcinoma Cells: Visualization of Protein-Protein Interactions. Acta Histochem. Cytochem. 査読あり. Vol. 50, No. 2, 2017, pp. 85-93.
DOI: <http://doi.org/10.1267/ahc.17011>

(2) E. Iwabuchi, Y. Miki, K. Ono, Y. Onodera, T. Suzuki, H. Hirakawa, T. Ishida, N. Ohuchi, H. Sasano. In situ detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells in archival materials using proximity ligation assay (PLA). J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 査読あり. Vol. 165, Pt. B, 2017, pp. 159-169.
DOI: [10.1016/j.jsbmb.2016.05.022](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.022). Epub 2016 Jun 2.

〔学会発表〕(計4件)

(1) E. Iwabuchi, Y. Miki, K. Takagi, Y. Onodera, T. Suzuki, H. Sasano. The effect of an interaction between carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6 and 8 in breast carcinoma. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月7日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

(2) 岩淵英里奈、三木康宏、小野克彦、小野寺好明、笹野公伸. 超解像顕微鏡を用いたエストロゲン受容体発現局在の解析. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月13日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).

(3) E. Iwabuchi, Y. Miki, M. Sakurai, K. Ono, H. Sasano. The effects of interaction of HER2 and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion 6 molecule in breast carcinoma. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月9日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

(4) 岩淵英里奈、三木康宏、小野克彦、笹野公伸. HER2 陽性乳癌における carcinoembryonic antigen-related cell adhesion 6 の発現意義の検討. 第104回日本病理学会総会. 2015年5月1日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50187142

(2)連携研究者

三木 康宏 (MIKI, Yasuhiro)
東北大学・災害科学国際研究所・講師
研究者番号: 50451521

小野 克彦 (ONO, Katsuhiko)
東北大学・大学院医学系研究科・技術専門職員
研究者番号: 80466531

小野寺 好明 (ONODERA, Yoshiaki)
東北大学・大学病院・技術専門職員
研究者番号: 40466561

(3)研究協力者

岩淵 英里奈 (IWABUCHI, Erina)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員