

平成 21 年 05 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790145  
 研究課題名（和文） 乳がんにおける抗 ErbB2 モノクローナル抗体の個別化治療を目指す多角的研究  
 研究課題名（英文） Comprehensive research for individualized use of anti-ErbB2 monoclonal antibodies in breast cancer  
 研究代表者 向原 徹（MUKOHARA TORU）  
 神戸大学・医学部附属病院・特命准教授  
 研究者番号：80435718

## 研究成果の概要：

HER2 過剰発現乳がん細胞株において、PIK3CA 遺伝子変異が trastuzumab および小分子 HER2 キナーゼ阻害薬に対する耐性の原因になることが示唆された。また、trastuzumab や小分子 HER2 キナーゼ阻害薬の効果と相関するバイオマーカーとして、リン酸化型 S6K が有用であることが示唆された。さらに、これら細胞では、PIK3CA の遺伝子型に関わらず PI3K 経路に依存しており、PI3K 阻害薬に感受性を示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：癌、分子標的治療、個別化治療、乳がん、PI3K、PIK3CA

## 1. 研究開始当初の背景

抗 HER2 モノクローナル抗体である trastuzumab の耐性機構は十分明らかになっていない。近年乳がんを含む固形がんで発見された PIK3CA の活性化型変異は、理論上受容体非依存的な PI3K 経路活性化につながるため、trastuzumab の耐性機構となりうる。

## 2. 研究の目的

(1) HER2 過剰発現細胞株において、PI3K の活性化機構 (PIK3CA 遺伝子型、PTEN の発現、ErbB3 の活性化、他の RTK の活性化) を解明し trastuzumab 感受性との関係について明ら

かにする。さらに、それらの臨床的意義を、臨床検体をもちいて明らかにする。

(2) 患者血漿をプロテオミクス解析し、trastuzumab 感受性を規定する血漿タンパクプロファイルを探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 薬剤：trastuzumab (抗 HER2 モノクローナル抗体)、CL-387,785 (HER2 小分子キナーゼ阻害薬)、LY294002 (PI3K 阻害薬)

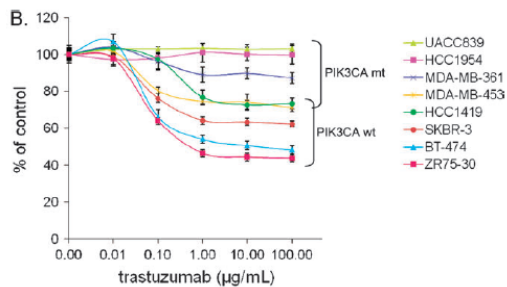
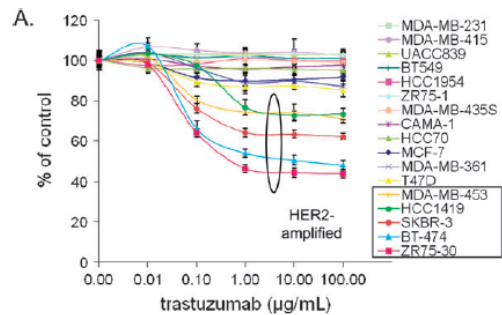
(2) 細胞:17種類の乳がん細胞株。そのうち、8種類はHER2過剰発現株。8種類のうち、3種類はPIK3CA野生型(wt)であり、その他は変異型であった。ただし、BT474で見られる、K111Nはキナーゼ活性が低く、形質変換能も低いと報告されているため、この研究では野生型グループとして扱った。

Cell line	Genotype of PIK3CA
BT474	K111N
ZR75-30	wt
SKBR-3	wt
HCC1419	wt
MDA-MB-361	E545K
MDA-MB-453	H1047R
HCC1954	H1047R
UACC893	H1047R

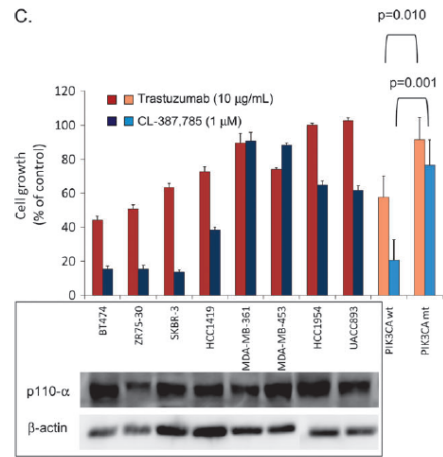
- (3) 増殖抑制試験: MTS assay
- (4) 遺伝子型検索; direct sequence
- (5) 細胞内シグナル伝達検索: Western blot
- (6) phospho-RTK array
- (7) 血漿プロテオミクス

#### 4. 研究成果

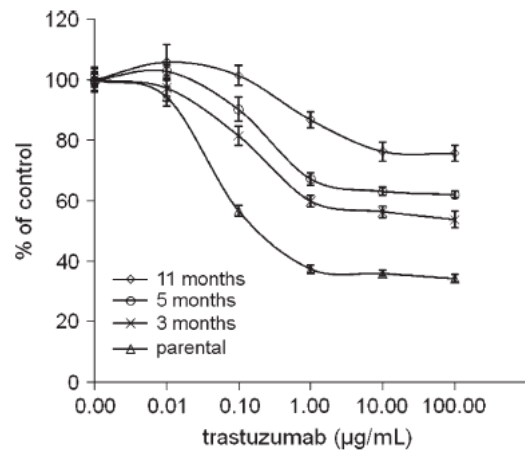
(1) 17種類の乳がん細胞株をスクリーニングしたところ、trastuzumabに感受性を示す細胞株はすべてHER2を過剰発現していることを確認した(図上)。一方、HER2過剰発現株の中にも非感受性株があり、それらはPIK3CAの活性化型変異を有する傾向にあった(図下)。



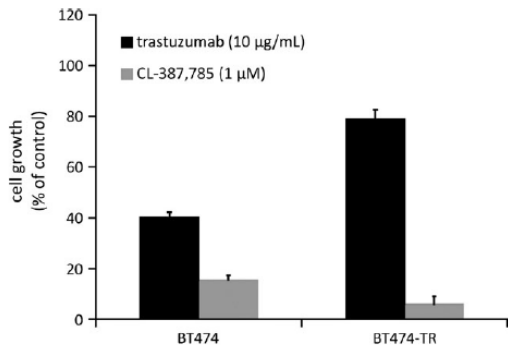
(2) 小分子 HER2 キナーゼ阻害薬 (CL-387,785) の感受性についても探索したところ、trastuzumab の場合と同様、PIK3CA 変異が耐性の原因になることが示唆された(下図)。



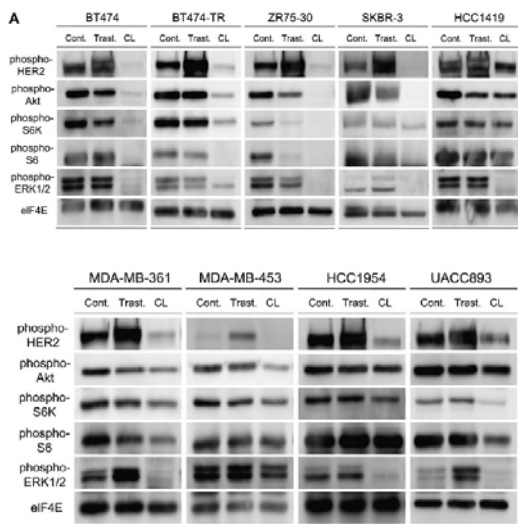
(3) 我々は、trastuzumab 感受性株であるBT474をtrastuzumabに長期間暴露した。徐々にtrastuzumabに対する耐性を獲得し、11カ月の時点で二次耐性モデル株とした(BT474-TR)。



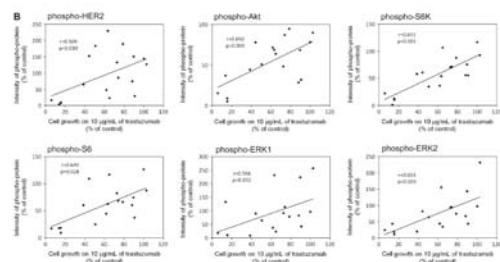
(4) PIK3CA 活性化型変異を有するtrastuzumab 一次耐性株とは対照的に、BT474-TRではCL-387,785に感受性が保たれた。



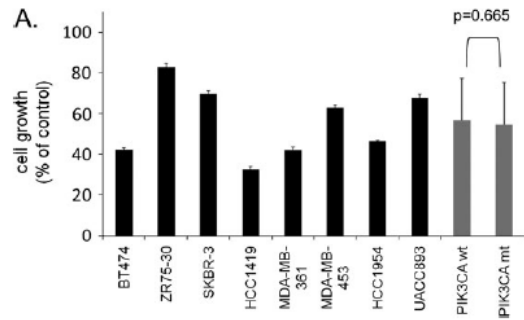
(4)次に、trastuzumab および CL-387,785 作用下の HER2 シグナルへの影響を Western blot 法で評価した。PIK3CA 野生型株 (図上) ではリン酸化型 (p-)Akt または p-S6K が trastuzumab で抑制されるのに対して、PIK3CA 変異株 (図下) では抑制はみられなかった。CL-387,785 に対しても、p-Akt や p-S6K の抑制は PIK3CA 野生型株でより顕著であった。



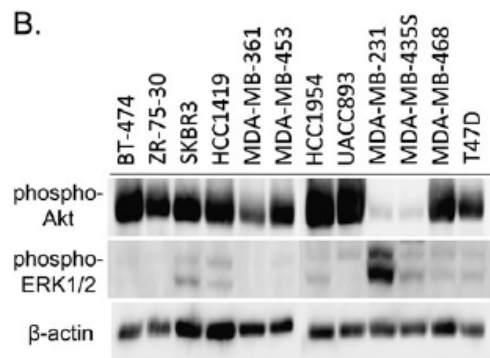
(5) trastuzumab および CL-387,785 作用下での、p-HER2、p-Akt、p-S6K、p-ERK1/2 の抑制と細胞増殖抑制の相関をみると、p-S6K が最も密接に相関していることがわかった (図、相関係数 0.811)。p-HER2 や p-ERK1/2 との相関は高くなかった。



(6)HER2 過剰発現乳がん細胞株における、PI3K 経路の重要性が示唆されたため、PI3K 阻害薬である、LY294002 に対する感受性を探索した。その結果、PIK3CA 遺伝子にかかわらず、ZR75-30 を例外として、LY294002 10 µM に対して、30%以上の細胞増殖抑制がみられた (下図)。



(7)次に我々は、24 時間血清フリーにした状態で、p-Akt と p-ERK1/2 の発現を検索した。その結果、HER2 感受性株では、PIK3CA の遺伝子型に関わらず p-Akt の明らかな発現がみられた (下図)。そのレベルは HER2 の過剰発現を有さず PTEN を欠失する MDA-MB-468 や、同じく HER2 過剰発現を有さず PIK3CA 活性型変異をもつ T47D と同等であった。一方、HER2 の過剰発現、PTEN 欠失、PIK3CA 活性型変異のいずれも有さない MDA-MB-231 と MDA-MB-435S では p-Akt は非常に低い発現量であった。一方、この血清フリーの環境下では、p-ERK1/2 は全ての HER2 過剰発現株において非常に低い発現量のみをみるのみであった。



(8) 結論

① HER2 過剰発現乳がん細胞株において、PIK3CA の活性化型変異が trastuzumab のみならず小分子 HER2 キナーゼ阻害薬耐性の原因となることが示唆された。

② trastuzumab の 2 次耐性では HER2 に対する依存性が保持され、小分子 HER2 キナーゼ阻害薬が有効である可能性が示唆された。これらは、HER2 キナーゼ阻害薬、Lapatinib が臨床応用された今日の臨床において、非常に有用な情報である。

③ 抗 HER2 療法の効果を予測する pharmacodynamic marker として、p-S6K が有用である可能性が示唆された。

④ HER2 過剰発現のある乳がん細胞株では、PIK3CA 遺伝子型に関わらず、PI3K 経路に依存性があり、PI3K 阻害薬が有効である可能性が示唆された。

(9) 今後

① PIK3CA が野生型でありながら、trastuzumab に比較的抵抗性を示す細胞株 (HCC1419, BT474-TR) については、その耐性機構が不明であり、今後明らかにするための研究を継続する。

② 当初計画していた臨床検体を用いた研究と、血漿プロテオミクスには着手できなかった。今後これらに着手する予定である。

③ 今後乳がんで得られたこれらノウハウをアジアに多い癌腫である胃がんに応用し、PI3K 活性化機構と分子標的薬の感受性に関する研究を行う予定である。

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 1 件)

Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, and Minami H. Gain of function mutations of PIK3CA is associated with resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. Ann Oncol 2009; In press 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

Mukohara T. Individualized RTK-targeted therapy in breast cancer. An invited speaker, 24<sup>th</sup> Nagoya International Cancer Treatment Symposium 2009, in Nagoya, Japan 2009.6.28-7-3(予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向原 徹 (MUKOHARA TORU)

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：80435718

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者