

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09084

研究課題名(和文)アロマターゼ阻害剤耐性乳がんの持つ分子標的薬抵抗性の克服

研究課題名(英文)Overcoming Molecular Targeted Drug Resistance in Aromatase Inhibitor-Resistant Breast Cancer.

研究代表者

引地 理浩(Hikichi, Masahiro)

藤田医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80794130

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)：サイクリン依存性キナーゼ4/6(CDK4/6)阻害剤であるパルボシクリブ(Palb)は、アロマターゼ阻害剤耐性乳がんに対する有効な治療選択肢として登場した。本研究では、アロマターゼ阻害剤耐性乳がんのモデルとして、30系統の長期エストロゲン遮断(LTED)乳がん細胞MCF7を確立し、乳がんにおけるアロマターゼ阻害剤耐性に関与する因子を探索した。

その結果、Rab31が高発現であるほどPalbの効果が高いことが明らかになった。本研究により、Rab31はアロマターゼ阻害剤耐性乳がんにおけるPalb耐性のバイオマーカーである上、負のレギュレーターであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって明らかになった、Rabをバイオマーカーとして利用することによりPalbの適正な利用が可能になる。また、Rab31とPalbの分子メカニズムを明らかにすることで、難治性乳がんの新たな治療法開発に発展させられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitor palbociclib (Palb) emerged as an effective treatment option for aromatase inhibitor-resistant breast cancers. However, molecular mechanisms and predictive biomarkers for Palb-resistance are not elucidated. This study established the 30 lines of long-term estrogen-deprived (LTED) MCF7 breast cancer cells as a model for aromatase inhibitor-resistant breast cancers. We explored factors involved in the aromatase inhibitor-resistance in breast cancers.

The results revealed that the higher the expression of Rab31, the more effective Palb was. This study suggests that Rab31 is a biomarker for Palb resistance in aromatase inhibitor-resistant breast cancer and a negative regulator.

研究分野：乳がん

キーワード：難治性乳がん治療 乳がん パルボシクリブ

1. 研究開始当初の背景

閉経後女性の中でエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんに対し、エストロゲン合成酵素アロマターゼの阻害剤 (AI) を用いたエストロゲン枯渇治療が頻用されており、その治療効果は非常に高い。しかし、AI 耐性乳がんが出現・再発してしまった場合、他の薬剤に対する抵抗性も獲得している可能性が高く、その治療戦略は困難となってくる。近年、AI 耐性乳がんの分子生物学的な研究がすすめられ、Akt を起点として mTOR シグナル活性化による ER の異常リン酸化や CDK4/6・Rb シグナル経路の活性化が原因で AI および多剤耐性が生じると明らかになった。ER の異常リン酸化に対する対抗策としては、Everolimus (Eve) が有効とされ、既に臨床応用されている。また、CDK4/6 の活性化に対してはその阻害薬 Palbociclib (Palb) について大規模な臨床試験も実施され、2017 年末から臨床応用が開始されている。

これらの分子標的薬剤は一定の効果を上げる一方、薬価が非常に高額である上に一部の患者に対しては効果がないばかりか、上皮間葉転換 (EMT) を促進して浸潤・転移やがん幹細胞性形質獲得を引き起こす可能性が報告されている。実際に、Eve や Palb によって不利益を得てしまう患者が居るとすれば、非常に重要な臨床的課題であるため、これらについて知見を得る必要がある。

2. 研究の目的

日本人女性のがん罹患率 1 位である乳がんの多くはエストロゲン受容体陽性であり、アロマターゼ阻害剤を用いたホルモン療法の治療効果が非常に高い。しかし、一部の患者ではこの治療に対して耐性を獲得し、再発する。そのため近年では、アロマターゼ阻害薬の効果を持続させるため、様々な分子標的薬が利用されている。サイクリン依存性キナーゼ 4/6 (CDK4/6) を阻害する Palb もアロマターゼ阻害薬抵抗性乳がんに対する分子標的薬として開発された薬剤の 1 つである。Palb は、アロマターゼ阻害薬耐性の進行・再発乳がん患者に対して優れた治療効果を示す一方で、一部の患者には効果がないという問題がある。

AI 耐性を獲得した進行性乳がんは、多剤抵抗性を獲得している場合が多く、治療困難となる。申請者はこれまでに、AI 耐性乳がんモデル細胞株 (LTED) を 30 株樹立し、AI 耐性乳がんの分子機構について研究してきた。増殖を半分に抑える Palb・Eve 濃度 (IC50) の算出から LTED30 株は、「Palb 感受性が高い・初めから Palb 耐性を持っている」に分類される細胞を樹立できた。これは、臨床で観察される「効果がある」と「治療開始時から耐性を示す」の両方に対応できる研究材料を確立したと言える。がん幹細胞形質を誘導して薬剤抵抗性の獲得にも関係すると知られており、LTED を用いた我々の検討結果は、実臨床で観察される「一部の患者に対して効果がない上、逆に EMT を促す」を反映していると示唆される。

本研究では、AI 耐性乳がんの前臨床モデルとして極めて有用な LTED を多数使い、Eve・Palb に対する耐性克服のための分子メカニズム解明を目指す。2 次以降の治療は臨床効果判定に月単位でかかるため、効果の有無にかかわらず投与期間が長くなる。この点からも、分子メカニズムを明らかにすれば、薬剤使用前に効果を予測できるバイオマーカー探索へと発展させられる可能性がある。

3. 研究の方法

薬剤の使用が EMT に及ぼす影響を精査： 薬剤が細胞の EMT に及ぼす影響に濃度依存性や負荷時間依存性があるか否かについて評価する。現在，一部の細胞において EVE・Palb によって EMT が不可逆的に誘発される可能性を示すデータを得ているため，これについてもより詳細な解析を進める。

RNAseq とプロテオミクスを用いてバイオマーカーを探索： 樹立した LTED の中から、EVE・Palb の効果が高い 3 株と低い 3 株の網羅的解析を行う。申請者が研究を行う藤田保健衛生大の共同利用研究施設には次世代シーケンサー HiSeq (illumina 製) と質量分析計 Orbitrap (Thermo Fisher 製) が導入されており，共同研究者の亀山と共に RNAseq・プロテオミクス解析を実施する。

網羅的な解析から得られて結果をもとに，目的遺伝子をステルス siRNA でノックダウンして腫瘍形成能を測定する。

4. 研究成果

EMT に対して Palb の効果や耐性は関連性が見られなかった。

LTED30 株の Palb に対する感受性を測定したところ、その感受性には多様性が認められた。この 30 株の内、Palb 感受性が高い 3 株と低い 3 株の遺伝子の発現を NGS で比較したところ Rab31 ,TBB3 など 5 遺伝子に有意な差があった。これらの遺伝子発現量と LTED30 株の Palb に対する感受性を検討した結果、Rab31 に有意な相関関係がみられた。データベース(Kaplan-Meire plotter)を用いて RAB31 と乳がん患者の予後を調査すると、エストロゲン受容体陽性乳がん患者で RAB31 高発現患者の予後が良好であることも明らかになった。

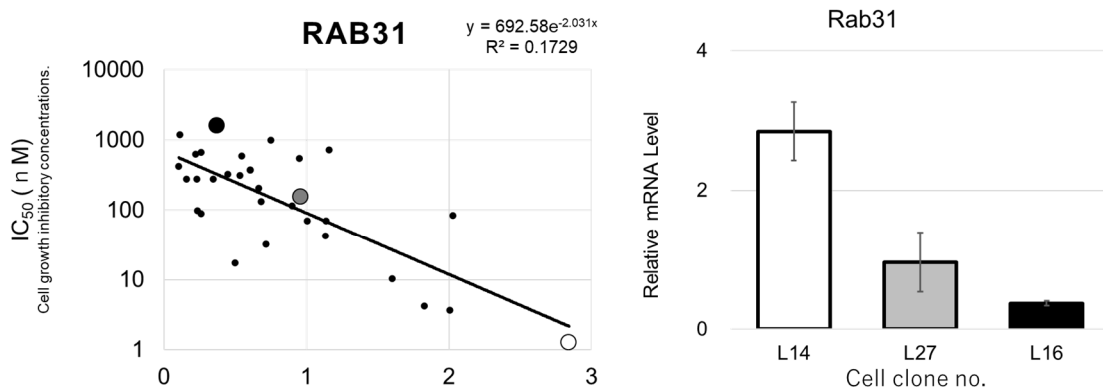


図1 Palbに対する感受性とRab31には相関関係がある。

Palb 高感受性の LTED 株の Rab31 をノックダウン (KD) して高度免疫不全マウスに移植し、Palb を経口投与 (10 mg/kg/day) した結果、Rab31KD 細胞で形成された腫瘍の成長速度はコントロールに比べてはやかった。(図 2)

これらの事から、Rab31 はアロマターゼ阻害薬耐性乳がんにおける Palb の効果を促進すると考えられた。また、Palb の効果予測マーカーとして有用である可能性が示唆された。

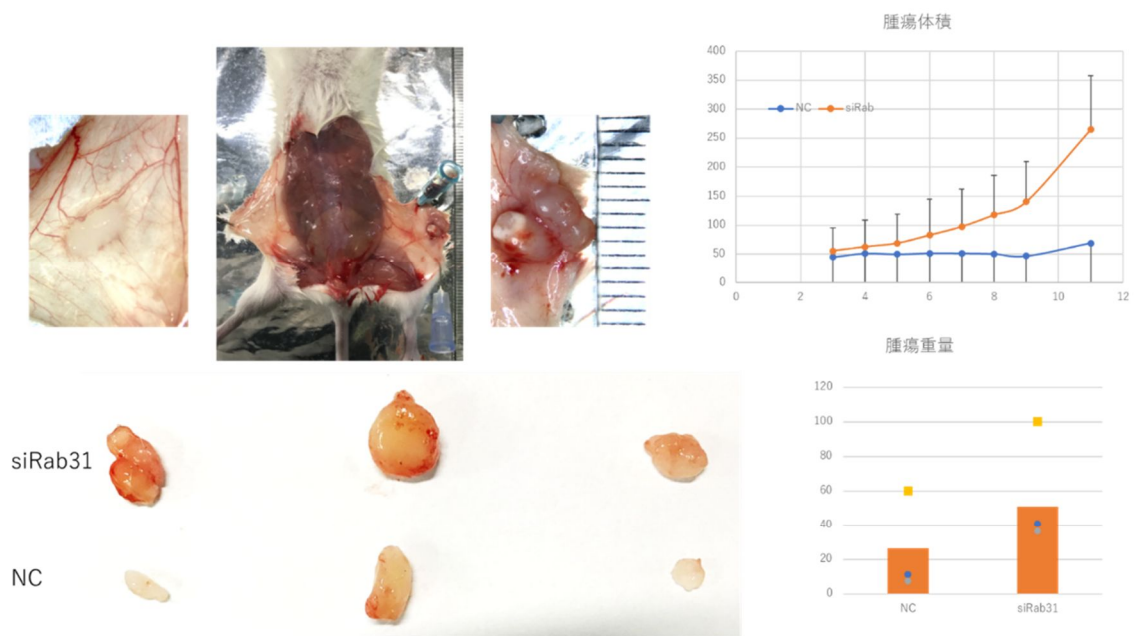


図2 アロマターゼ阻害剤レトロゾール (5mg/kg) とPalb (100mg/kg) を経口投与したマウスでは, Rab31をノックダウンした細胞株では腫瘍が大きく成長した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishio Eiji, Hayashi Takanori, Akaza Mao, Hisatomi Yukiko, Hikichi Masahiro, Fujii Takuma, Utsumi Toshiaki, Harada Nobuhiro, Shimono Yohei	4. 巻 10
2. 論文標題 Upregulation of CIP2A in estrogen depletion resistant breast cancer cells treated with low dose everolimus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2072 ~ 2080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12956	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 孝典 (Takanori Hayashi) (40724315)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	下野 洋平 (Yohei Shimono) (90594630)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	喜島 祐子 (Yuko Kijima) (60381175)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	内海 俊明 (Toshiaki Utsumi) (10176711)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------