

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16780

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌におけるEGFRを標的とした抗体薬物複合体の可能性

研究課題名（英文）Possibility of antibody drug conjugate targeting EGFR in triple negative breast cancer

研究代表者

中井 克也 (nakai, katsuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10384108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Triple Negative (TN) 乳癌患者におけるEGFRの細胞外ドメインのメチル化の状況を解析することで、次世代抗体治療薬として注目されている抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate：ADC）に対する効果とその治療予測因子を同定することを目的とした。TN乳癌細胞株におけるEGFRの発現とそのメチル化状態の解析を行った。EGFRが過剰発現していたTNBC細胞株については、EGFRのメチル化を行うPRMT1遺伝子改変細胞株を作成し、細胞内のシグナルの変化を確認した。TN乳癌患者における、EGFRのメチル化の状態を確認し、ADCの効果が期待できる患者群を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADCの登場により、TNBCに対する抗EGFR治療に新たな可能性が出てきている。ADC治療薬に関する治療予測因子についての検討はいまだ明白なものはない。ADCの治療効果予測因子としてEGFRのメチル化に注目し機能変化と薬剤耐性に関する報告はなく新規性および将来性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to analyze the methylation status of the extracellular domain of EGFR in triple negative breast cancer (TNBC) to identify the effect of antibody drug conjugate (ADC) and its predictive factors for the treatment of TNBC. We analyzed the expression of EGFR and its methylation status in TNBC cell lines, and generated PRMT1-engineered cell lines (overexpression and knockdown models) to confirm the intracellular signaling changes. We used ADCs targeting EGFR in TNBC cell lines and confirmed the effect of the ADC. In addition, we confirmed the methylation status of EGFR in human TNBC samples, and confirmed the rate at which ADCs targeting EGFR are expected to be effective.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 Triple Negative乳癌 上皮増殖因子受容体 抗体薬物複合体 効果予測因子 アルギニン・メチルトランスフェラーゼ メチル化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

個別化治療が進む中での TN 乳癌の現状

乳癌の 15～20%を占める Triple negative 乳癌（TNBC）は、エストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2 が陰性で、このため内分泌治療や抗 HER2 治療が期待できず治療選択肢が限られている。TNBC は、生物学的悪性度が高く、早期に再発し、従来の化学療法に抵抗性を示すことから治療に難渋することが多く、新しい治療戦略が切望されている。

上皮増殖因子受容体（Epidermal growth factor receptor, 以下 EGFR）は受容体型のチロシンリン酸化酵素であり、その異常活性化は、乳癌、特に TNBC において病因と癌の進行に関係している。TNBC では 50%以上に EGFR の過剰発現が認められており、EGFR の過剰発現の認められる TNBC 患者は無病生存率および全生存率において不良であることが報告されている（Masuda H, et al. Breast cancer research and treatment. 2012）。さまざまな臨床前研究において TNBC に対する抗 EGFR 療法は非常に高い効果が報告され、転移 TNBC を対象としたヒト型抗 EGFR 抗体を用いた第Ⅲ相臨床試験がいくつか行われ、一定の効果は認められたが乳癌治療薬として承認を得るにはいたらなかった（Carey et al. J Clin Oncol 2012, Baseiga et al. J Clin Oncol 2013）。大腸癌や肺癌では抗 EGFR 療法は確立された治療として存在しており、TNBC 領域においても抗 EGFR 療法の応用は非常に重要なクリニカルテーマである。

次世代抗体治療薬の開発

ADC は癌細胞に発現する抗原に対するモノクローナル抗体に抗癌剤を結合させた新世代の抗体療法である。ADC はモノクローナル抗体に標的結合性によって癌細胞内に選択的に抗癌剤を配達することができるため、従来のモノクローナル抗体単独治療には抵抗を示した癌腫に対しても有効性を発揮することが期待できる。事実、乳癌治療において抗 HER2 治療は劇的な進化をとげ、ADC 製剤である TDM-1, Trastuzumab deruxtecan がすでに臨床導入され、乳癌再発治療における重要なポジションを得ている。さらに Trastuzumab deruxtecan においては、HER2 が強発現していない患者についても、治療効果が期待され臨床試験が進んでいる。TNBC において抗 EGFR モノクローナル抗体のみでは細胞内増殖シグナルを遮断できない可能性があるが、ADC では EGFR を介して選択的に TNBC に抗癌剤を細胞内に送達することで、抗癌剤の副作用が少なく高い治療効果が得られると考えられる。

抗体治療薬における治療効果予測因子の必要性

アルギニン・メチルトランスフェラーゼ（PRMT1）によるアルギニン（Arg）基のメチル化が EGFR とモノクローナル抗体の親和性に深くかかわっていることが報告されている（Liao HW, et al. J Clin Invest. 2015）。アルギニンのメチル化は抗 EGFR モノクローナル抗体と EGFR の親和性に重要な意味を持つことより、ADC の効果予測因子として期待できると考えられる。さらに PRMT 阻害剤は癌治療におけるエピジェネティック治療の応用として非常に注目されており、EGFR メチル化を制御することで、抗 EGFR 療法の EGFR に対する親和性を高めることにより、PRMT1 阻害剤が魅力的な治療的戦略になる可能性を秘めている。

免疫チェックポイントの阻害剤と ADC の併用

高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI) 検査は、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) のコンパニオン診断として利用されており、TN 乳癌においてもその頻度は低いが高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) の報告されている。TN 乳癌においては、アテゾリズマブ及びペンブロリズマブは抗がん剤との併用により臨床応用がされ、抗体薬物複合体 (ADC) と免疫チェックポイント阻害剤の併用が注目されている。ペンブロリズマブの効果予測因子である、マイクロサテライト不安定性 (MSI-High) の状況を TN 乳癌患者で確認することは大きな意義がある。

2. 研究の目的

ADC は次世代の抗体医薬として開発が加速され、基盤技術の開発も急速に進んでいる。ADC はモノクローナル抗体に結合した抗癌剤の作用で抗腫瘍効果を発揮するため、特定の細胞内に抗がん剤が送達することができる。TNBC の EGFR をターゲットにした第一世代のモノクローナル抗体では、臨床試験では十分な効果を証明することはできなかったが、次世代 ADC は標的蛋白を楔として、細胞内に選択的に抗癌剤を送達することで、特異性高く癌細胞を攻撃することができると考えられる。TNBC において EGFR は増殖のドライバー遺伝子である必要はなく、EGFR を介して選択的に TNBC に抗癌剤を細胞内に送達するための標的として考える。また抗 EGFR 抗体療法は、現在有効な治療予測因子が存在しないのが現状である。そこで EGFR のメチル化状態を確認することで、ADC の効果が EGFR のメチル化によって抗体部の親和性の違いに注目することで治療予測因子としての可能性を検索する。EGFR のメチル化による ADC の治療効果に違いを確認し、さらに人体サンプルを使い TNBC における EGFR のメチル化状態を確認し臨床的意義を検討する。ADC と EGFR の親和性を確認し、分子生物学な根拠に基づいて治療が有効な TNBC 患者の集団を特定することが出来る。

3. 研究の方法

乳癌細胞株 (TNBC 及びホルモン感受性乳癌) を用いて、EGFR と PRMT1 の発現と EGFR の細胞外メチル化をウエスタンブロット法で確認する。TNBC のサブタイプ別の細胞株 (HCC38, HCC1937, MDA-MB-468, BT-549, Hs-578T, MDA-MB-436, MDA-MB-231, MDA-MB-453) 及び luminal cell lines (MCF-7, T47D) について検討する。また免疫沈降法により EGFR と PRMT1 の直接の interaction を確認する。さらに EGFR が過剰発現している TNBC 細胞株 (MDA-MB468, HCC38, BT-549) について、EGFR のメチル化を行う PRMT1 遺伝子改変細胞株 (過剰発現モデル及びノックダウンモデル) を作成する。これらの細胞株を使いウエスタンブロットにより蛋白発現を確認し、TNBC の cell line について EGFR に対する ADC の治療効果を確認する。さらに EGFR のシグナル変化 (p-EGFR (pY1068), ERK, p-ERK (pT202/pY204), AKT, p-AKT (p-Ser473), STAT3, p-STAT3 (p-Y705)) についても検討を行う。また Cancer sphere formation assay, Colony formation assay を行いこれらの細胞株の癌細胞増殖、生存、浸潤能の役割を調べる。細胞株を使用した EGFR のメチル化に関する実験を行い分子生物学的なアプローチを確立した後に、原発性乳癌として手術が行われた TNBC について、EGFR 発現と EGFR のメチル化および非メチル化の状況について免疫組織学的染色を行う。これにより TNBC における EGFR に対する ADC 治療の有効性が見込まれる潜在的な患者群を確認する。さらに TNBC における MSI

(Microsatellite instability)を確認し、次世代の治療として期待されている ADC+免疫チェックポイント阻害剤の併用における、治療効果予測される患者群を検討する。

4. 研究成果

TN 乳癌細胞株及び TN 乳癌患者での EGFR のメチル化状態

EGFR が TNBC でメチル化されているかどうかを判断するために、TNBC 細胞株(HCC38、HCC1937、468、BT-549、Hs-578T、MDA-MB-436、MDA-MB-231、および MDA-MB-453) R198 / 200 でメチル化された EGFR に対する特異抗体を使用したウエスタンブロット分析をおこなった。また EGFR と PRMT1 の発現を調べた。コントロールとして、ER 陽性 luminal 細胞株(MCF-7 および T47D)を検討した。EGFR の発現は、MDA-MB-453 を除くすべての TNBC 細胞で検出された。EGFR は MDA-MB-468 細胞で過剰発現していた。PRMT1 の発現はすべての乳がん細胞株で見つかり、乳癌のサブタイプとは無関係であった。メチル化された EGFR は MDA-MB-468 細胞で検出された。さらに TNBC 組織マイクロアレイの免疫組織化学 (IHC) 染色により、TNBC 患者組織の EGFR メチル化状態を調べた。患者組織の 20%で高頻度に EGFR メチル化(R198/200)されていることが分かった。EGFR をターゲットにした ADC 製剤において、治療効果が期待できる群が存在し、その治療効果予測因子として機能する可能性が認められた。

PRMT1 は EGFR メチル化と EGFR 下流シグナル伝達を調節している

PRMT1 が EGFR のメチル化を通じて MDA-MB-468 細胞の EGFR 活性を調節する可能性があることから、MDA-MB-468 の PRMT1 ノックダウン細胞とコントロール細胞の細胞増殖を比較した。PRMT1 ノックダウン細胞における EGFR シグナル伝達のダウンレギュレーションと一致していた。また細胞増殖は対照細胞と比較して PRMT1 ノックダウン細胞で有意に減少していた。EGFR シグナル伝達が癌幹細胞の特性に重要であることから、PRMT1 のノックダウンは MDA-MB-468 細胞の sphere formation を強く減少させていた。PRMT1 が細胞増殖と幹細胞特性の維持に重要であることを示しており、その効果は、PRMT1 を介した EGFR メチル化を介した EGFR シグナル伝達の亢進に起因する可能性が考えられた。

TNBC における MSI の状況

高密度の TIL を伴った TN 乳癌に対して MSI テストを実施した。DNA ミスマッチ修復 (MMR) タンパク質と PD-L1 発現も免疫組織化学的に調査した。すべてのサンプルはマイクロサテライト安定であり、結果的に MSI-H 腫瘍は高密度の TIL が存在する TN 乳癌では存在しないことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshiya Horimoto, May Thinzar Hlaing, Harumi Saeki, Shigehisa Kitano, Katsuya Nakai, Ritsuko Sasaki, Aiko Kurisaki, Arakawa Atsushi, Naomi, Otsuji, Shuji Matsuoka, Emi Tokuda, Masami Arai, Mitsue Saito	4. 巻 111
2. 論文標題 Microsatellite instability and mismatch repair protein expressions in lymphocyte - predominant breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2647-2654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14500	査読の有無 有
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------