

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08980

研究課題名(和文)血管擬態の阻害によるHER2陽性乳癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel treatment of HER2-positive breast cancer by inhibiting vasculogenic mimicry

研究代表者

下田 雅史(Shimoda, Masafumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30644455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：増殖力が強く転移しやすい悪性度の高い乳癌はその性質を変えて生き延びようとする。血管の壁を構成する血管内皮に似た性質に変化して血流を獲得しようとする現象が知られているが、それを抑制する治療薬は未だ存在しない。申請者は先行研究において細胞の移動を抑えることでこの現象を抑制できることを見出している。本研究では、デファクチニブという細胞運動を標的とする低分子化合物により、乳癌細胞が移動できなくなって血管様構造を作れなくなることを発見した。また、マウス乳癌モデルにおいてデファクチニブが腫瘍の血管を減少させて増大を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HER2陽性乳癌やトリプルネガティブ乳癌という悪性度の高い乳癌は全体の3分の1程度を占め、その再発率の高さや再発後の生存期間の短さが問題である。本研究では悪性度の高い乳癌が持つ可塑性に着目してその性質を阻害する薬剤を見出すことにした。腫瘍の増大には血流の獲得が必要だが、乳癌細胞自身が血管内皮様の性質を持つことがある。本研究で申請者はデファクチニブという低分子薬剤が乳癌細胞を動きにくくして血管様の構造をとることを阻害し、腫瘍の増大を抑制することを初めて見出した。これは乳癌治療における新たな治療法となる可能性を持つ。本研究の更なる発展により、乳癌の治療成績の向上が図られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：High-grade breast cancer, which has a strong ability to proliferate and easily metastasize, tries to survive by altering its characteristics. It is known that it attempts to acquire blood flow by transforming into a similar nature as the endothelium that forms the walls of blood vessels, but there are currently no treatment drugs available to suppress this phenomenon. The applicant has discovered in previous research that this phenomenon can be suppressed by inhibiting cell movement. In this study, we discovered that a small molecule compound called Defactinib, which targets cell movement, prevents breast cancer cells from moving and forming blood vessel-like structures. Additionally, in a mouse breast cancer model, we found that Defactinib reduces tumor blood vessels and inhibits tumor growth.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：vascular mimicry vessel co-option

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HER2 陽性乳癌は膜型受容体チロシンキナーゼ HER2/ERBB2 を過剰発現し全乳癌の約 20-25%を占める。HER2 陽性乳癌に対しては HER2 を標的とする抗体薬 trastuzumab が抗がん剤と合わせて使用され、治療成績が劇的に改善した。しかし未だに HER2 陽性乳癌の治療体系には改善の余地がある。HER2 陽性乳癌は進行が早く、肝臓や脳などの重要臓器に転移しやすい高悪性度の癌腫であるが、その機序として、血管擬態(vasculogenic mimicry; VM)が注目されている。VM とは、癌細胞が血管内皮細胞様の形質を獲得し、それらが管腔を形成して血管と接続することで、癌巢内に血流を引き込もうとする現象である。申請者らは HER2 陽性乳癌細胞が trastuzumab に耐性化すると同時に VM の形質を獲得することを *in vitro* の系と臨床サンプルを用いた研究で明らかにした。また、salinomycin が RhoA の阻害を介して actin 線維の形成を抑制し、細胞運動を障害して VM を阻害することを見出した(Hori et al., Breast Cancer Res 2019)。Salinomycin は毒性があり臨床応用することができず、Rho を標的とする抗悪性腫瘍薬は存在しない。したがって、細胞運動の阻害を介して VM を抑制する別の標的を見出す必要があった。

2. 研究の目的

本研究ではヒトに使用可能な、細胞運動を阻害する低分子化合物を選び、VM を阻害しうるかどうかを *in vitro/in vivo* にて評価することを目的とした。また、申請者は *in vivo* で VM を評価する既知の方法には特異性の点で問題があると考えており、VM を同定するためのより特異性の高い方法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Trastuzumab 耐性 HER2 陽性乳癌細胞株として、JIMT-1、トリプルネガティブ乳癌細胞株として MDA-MB-231 を用いた。細胞の維持には通常の方法を用いた。チューブ形成法を以下のように行った。培養細胞を Accutase にて培養皿から剥離しシングルセルとしたのちに、Matrigel を底面に塗布したマルチウェルプレートに播種し、Lonza 社の完全 EBM-2 培地を使用して最長 72 時間培養した。位相差顕微鏡によりチューブ形成を経時的に観察した。チューブ形成の評価は 5 倍対物レンズで観察した 1 視野におけるチューブの数を数えることで行なった。細胞遊走能は gap closure 法にて経時的に評価した。JIMT-1 および MDA-MB-231 細胞株に luciferase (nanolantern) と green fluorescence protein (GFP) の発現カセットを安定的に組み込んだものを作成した。

(2) 動物実験

NOD-SCID 免疫不全マウスを用いて乳癌モデルを作成した。マウスを麻酔後に第 4 乳腺の内側で皮膚を切開し、その mammary fat pad に JIMT-1 または MDA-MB-231 細胞を 10^6 個接種した。触診で腫瘍の形成が確認できたところでマウスを 2 群に分け、DMSO または薬剤を 1 日 2 回経口投与した。腫瘍の体積を caliper によって経時的に計測した。腫瘍はマウスを安楽死させたのちに摘出し、ホルマリンで固定または液体窒素で凍結して保存した。

(3) チューブ形成阻害薬のスクリーニング

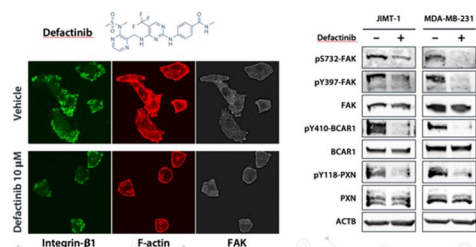
将来の臨床応用を見据え、スクリーニングにはヒトに投与されうる薬剤、または標的が明らかとなっている低分子化合物を用いることにした。大阪大学大学院薬学系研究科にストックされている化合物パネルから 259 個の化合物を選んで使用した。GFP を発現する JIMT-1 および MDA-MB-231 を用い、96 ウェルプレートでチューブ形成法を行った。1 ウェルごとに薬剤を加え、24-48 時間培養した。形成されたチューブの緑色蛍光画像を Cell Voyager (横河電機製) で取り込み、教師データで予め学習させておいた AI により (Cell Pathfinder; 横河電機製)、形成したチューブの程度を 0-9 の値でスコア化した。

4. 研究成果

(1) Focal adhesion kinase (FAK) 阻害剤によるチューブ形成阻害

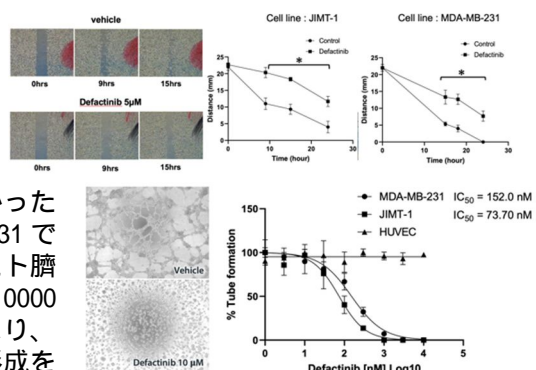
申請者は細胞運動を阻害する薬剤として、FAK 阻害薬 defactinib に着目した。Defactinib は現在固形癌に対する臨床試験が行われており、臨床応用のハードルが低いと考えられた。なお、当初予定していた RhoA-actin 経路上の分子を標的とする化合物についてチューブ形成法を用いて検討したが効果が弱く、臨床的に使用できる可能性がないと考えた。

まず、defactinib が FAK およびその下流の細胞運動に必要な経路を阻害しうるかを検討した。Defactinib 添加により、2 種類の細胞ともに FAK, BCAR1, PXN の各リン酸化が阻害された(右図)。また、defactinib 添加によって細胞内 F-actin の量が減り、focal adhesion が形成される時に出現する



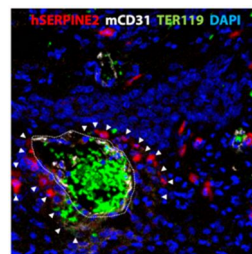
lamellipodia も消失することが形態的に示された。そこで、細胞運動が阻害されるかを調べたところ、2種類の細胞ともに defactinib により細胞遊走能が有意に低下することが明らかになった(右図)。

次に defactinib がチューブ形成に与える影響を検討した。Time-lapse 顕微鏡下にチューブ形成を観察すると、defactinib により細胞の運動が阻害されてチューブを形成しなくなることがわかった(右図)。その IC50 は JIMT-1 で 74 nM、MDA-MB-231 で 152 nM であった。また、正常な血管内皮であるヒト臍帯静脈内皮細胞で defactinib を作用させても、10000 nM までチューブ形成は阻害されなかった。以上より、defactinib は細胞運動の阻害によってチューブ形成を抑制する薬剤であることが示された。



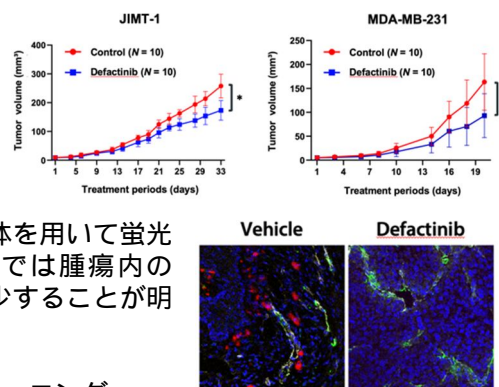
(2) In vivo における VM の検出法の検討

In vivo において VM は、腫瘍組織に血管内皮特異的マーカーPECAM-1 陰性かつ periodic acid-Schiff 反応陽性の細胞が管腔を形成する像であるとされている。しかし、periodic acid-Schiff 反応は mucin の存在で陽性となり、腫瘍細胞では高頻度に認められるため VM 特異的とは言えない。そこで申請者は VM をより特異的に腫瘍組織内で同定するため、血管内皮様の分化を生じた腫瘍細胞で発現する SERPINE2 の発現を蛍光免疫染色で検討した。マウス乳腺で形成させたヒト乳癌細胞株由来の腫瘍を、抗ヒト SERPINE2 抗体、抗マウス赤血球(TER119)抗体、および抗マウス PECAM-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い共焦点顕微鏡で観察した。残念ながら、2種類の細胞株で形成させた腫瘍いずれにおいても、SERPINE2 陽性細胞で構成され内部にマウス赤血球の存在する管腔構造、すなわち VM と考えられる像は認められなかった。腫瘍内出血を除き、腫瘍組織中で血管内皮を伴わずに赤血球が循環しているような像も認められなかった。その代わりに、SERPINE2 陽性細胞は主にマウス血管内皮細胞の周囲を取り囲む様に存在することが明らかになった(右図)。この像の解釈として、腫瘍細胞が血管内皮様に分化すると、腫瘍近傍の宿主血管の周囲を取り囲む様に浸潤する、いわゆる vessel co-option (血管乗っ取り; VCO)が生じた結果ではないかと考えている。VCO も VM 同様、腫瘍が血管新生によらずに血液灌流を獲得する現象であり、抗血管新生薬に対する耐性の一因になっているとの報告がある。この結果を踏まえ、今後は VCO がこのような像を呈するのかを詳しく検討したい。



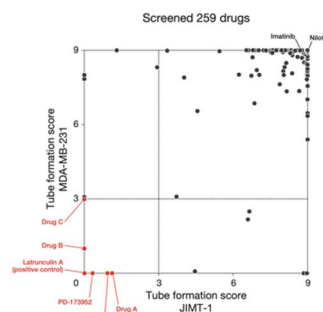
(3) Defactinib が腫瘍に与える影響

Defactinib が乳癌に与える影響をマウスモデルで検討した。2種類のヒト乳癌細胞株由来の腫瘍の増大は defactinib 投与によって有意に抑制された(右図)。Defactinib 投与群と vehicle 群より腫瘍を採取し、抗ヒト SERPINE2 抗体、抗マウス赤血球(TER119)抗体、および抗マウス PECAM-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。すると、defactinib 投与群では腫瘍内の SERPINE2 陽性細胞で取り囲まれた血管が著しく減少することが明らかになった(右図)。



(4) チューブ形成を阻害する低分子化合物のスクリーニング

Defactinib より強力にチューブ形成を阻害する薬剤を見出すため、259個の作用機序が既知の低分子化合物をスクリーニングした。2種類の細胞株を用い、両細胞株ともにチューブ形成をほぼ完全に阻害する(score 3以下)化合物を同定した(右図)。これらの化合物はいずれもある kinase の阻害剤であった。うち、臨床で使われている Drug A, B, C についてチューブ形成の IC50 を求めると、Drug A は 1.4 nM (JIMT-1)/7.3 nM (MDA-MB-231) であり、最も低濃度でチューブ形成を阻害した。Drug B, C の IC50 は 24.3-78.4 nM で同等の IC50 であった。今後は Drug A を用いて同様の研究を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下田雅史、増山美里、島津研三
2. 発表標題 高悪性度乳癌に対する血管擬態を標的とした新規治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増山美里、下田雅史、他
2. 発表標題 高悪性度乳癌にみられる血管擬態を標的とする新規治療法の開発
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増山美里、下田雅史、他
2. 発表標題 高悪性度乳癌にみられる血管擬態を標的とする新規治療法の開発
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	増山 美里 (Masuyama Misato)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	瀬戸 郁美 (Seto Ikumi)		

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