

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591666

研究課題名（和文） 乳癌のホルモン療法施行時における細胞内エネルギー調節に関する研究

研究課題名（英文） Study on intracellular energy regulation during endocrine therapy for breast cancer

研究代表者

上野貴之（UENO TAKAYUKI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40452362

研究成果の概要（和文）：

ホルモン療法に対する治療抵抗性や耐性獲得は乳癌治療の大きな障害であり、感受性予測や治療モニタリングが不可欠である。従来細胞増殖の抑制は検討されてきたが、細胞死の態様に関しては不明な点が多い。術前ホルモン療法前後における細胞死の態様と治療効果につき検討した。治療前後でアポトーシスは不変だがオートファジーは上昇を認め、治療効果と関連していた。間質のオートファジーも増加していた。治療効果にオートファジーの関与が示唆され、オートファジーの評価が、より詳細な治療効果の評価になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Endocrine therapy is a main therapeutic option for hormone receptor (HR)-positive breast cancer. De novo and acquired resistance to endocrine therapy is a hazard for efficient treatment of breast cancer, thus prediction and monitoring of therapeutic effect is critical. While suppression of proliferation by endocrine treatment has been well studied, cell death mode by endocrine therapy remains to be elucidated. The correlation between cell death mode and therapeutic effect was examined by using tissue specimens from the clinical trial with preoperative aromatase inhibitor treatment. Apoptosis markers did not show any change during treatment while autophagy markers increased by the treatment in both cancer cells and stromal cells. Increases in autophagy in cancer cells were associated with clinical effects of endocrine therapy, suggesting the involvement of autophagy in treatment effect by endocrine therapy, which may indicate that assessment of autophagic status might lead to detailed evaluation of therapeutic effects of endocrine treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学

1. 研究開始当初の背景

乳癌の治療は、手術の他に化学療法、分子標的療法、ホルモン療法、放射線療法などを組み合わせて集学的に行われる。このうちホルモン療法は、ホルモン受容体陽性の場合に適応になり、タモキシフェンをはじめとする選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) や選択的エストロゲン受容体ダウンレギュレーター (SERD) の他、アロマターゼ阻害剤 (AI) などが使用され予後の改善に効果をあげている。しかし、ホルモン受容体陽性であってもホルモン療法に感受性がみられない場合や、ホルモン療法の継続により耐性を獲得する現象がみられ、そのメカニズムの解明は重要な課題となっている。臨床上、ホルモン受容体発現以外の感受性予測や治療のモニタリングを効率的に行うことが、乳癌治療を効果的に行い治療の個別化を行う上で欠かせないものとなっている。一方で、ホルモン療法終了後何年もたってから晩期再発がみられることがあるが、乳癌の根治を目指す観点からは晩期再発の抑制が重要課題となっている。この点で、癌幹細胞モデルにおいて転移や再発の中心的役割を担うと考えられている癌幹細胞におけるホルモン療法の効果や影響を検討することは、乳癌治療戦略の上できわめて重要な課題である。

ホルモン療法はホルモン依存性乳癌の細胞増殖を抑制するほか、細胞死を誘導することが知られている。細胞増殖の抑制については、Ki67 などの細胞増殖マーカーがホルモン療法の効果を評価するのに利用されている。一方、細胞死を誘導するメカニズムについては、アポトーシスによるとの報告が多いが、実際の癌組織の中でアポトーシスが誘導されているかどうかは不明であり、有効な評価方法は確立していない。最近、様々なホルモン療法や化学療法において、癌細胞死がアポトーシスではなく、オートファジーによるとの報告がみられる (Autophagy 2006;2(2):85-90)。オートファジーは、ホメオスタシスの維持や、栄養枯渇状態における生存維持のために機能していると考えられている一方、細胞死のメカニズムとしても重要であり、胎生期の器官形成に必要なほか、様々な病態に関与している。このようにオートファジーは生存と細胞死という相反する結果を誘導するが、いずれの場合も細胞内エネルギー調節や ATP の産生が重要であると考えられており、オートファジーによる細胞内エネルギー調節の重要性が示唆されている (Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6(6):439-48)。

以上のように、ホルモン療法の作用機序としてオートファジーや細胞内エネルギー調節の関与が示唆されているが、その具体的なメカニズムは不明な点が多い。そこで、ホルモン療法による細胞死の態様を明らか

にし、ホルモン療法の作用メカニズム、耐性メカニズムを明らかにし、ホルモン療法の効果予測マーカーを同定すると共に、ホルモン療法耐性に関連する分子を同定することを目的として本研究を企画した。

2. 研究の目的

(1) ホルモン療法による細胞死の態様 (アポトーシス、オートファジーなど) を解析し、ホルモン療法が癌細胞に及ぼす効果を明らかにする。

(2) ホルモン療法による細胞増殖に対する影響を解析し、ホルモン療法が癌細胞の増殖に及ぼす効果を明らかにする。

(3) 組織中の乳癌幹細胞に対するホルモン療法の影響を検討する。

(4) 細胞死の態様、細胞増殖、乳癌幹細胞と臨床病理学的治療効果との関連を検討する。

(5) 以上の検討から、ホルモン療法の作用メカニズム、耐性メカニズムを明らかにし、ホルモン療法の効果予測マーカーを同定すると共に、ホルモン療法耐性に関連する分子を検討する。

3. 研究の方法

(1) ホルモン療法による細胞死の態様 (オートファジー、アポトーシスなど) の評価
オートファジー関連蛋白である beclin1, LC III の発現や変化を免疫染色にて検討する。アポトーシスに関して、サイトケラチン 18 のカスパー分解産物を認識する M30 抗体 (Roche) と、標準的な TUNEL 法を用いて組織中のアポトーシス細胞を観察する。免疫染色には、安定性が高いとされる自動免疫染色装置 Ventana HX システムを用い、治療前後での比較を行う。

(2) ホルモン療法前後の細胞増殖の評価

ホルモン療法の効果判定に関して Ki67 が有用であるとの報告がみられる。そこで、Ki67 を用いた免疫染色による評価と、mitotic count を評価することにより、治療前後での細胞増殖の変化や、治療反応性や治療抵抗性との関連につき解析し、ホルモン療法による細胞増殖と細胞死の関連を総合して評価する。

(3) 乳癌幹細胞とホルモン療法

現在、乳癌幹細胞のマーカーと考えられている CD44+CD24-/low や ALDH1 を用いて乳癌幹細胞と考えられる細胞を同定し、それらの細胞における細胞死の態様や細胞増殖、エネ

ルギー代謝に関して、連続切片を用いて評価を行う。

(4) 以上の細胞死の態様や増殖に関与する分子とホルモン療法の効果や予後との相関を調べ、ホルモン療法の反応性や耐性に関与する分子やマーカーの解析を行う。

4. 研究成果

(1) ホルモン療法による細胞死の態様（オートファジー、アポトーシスなど）の評価

アロマターゼ阻害剤による術前ホルモン療法前後での組織（74症例分）を用いて、ホルモン療法による細胞死の態様（オートファジー、アポトーシスなど）を評価するため、オートファジー関連蛋白である beclin1, LC III とアポトーシスマーカーである TUNEL, M30 の染色を施行した。ホルモン療法前後において、アポトーシスマーカーの発現は変化していなかったが、オートファジー関連蛋白は共に上昇を認めた。また、間質においてもアポトーシスマーカーの変化は認めなかったが、オートファジー関連蛋白は共に増加していた。以上より、ホルモン療法により、腫瘍のみでなく間質においてもオートファジーが誘導されることが示された。

(2) ホルモン療法前後の細胞増殖の評価

細胞増殖の評価はKi67を用いて行っているが、Ki67の変化や治療後のインデックスと治療効果との関連が強く示唆されている。しかし施設ごとにその染色性や評価法が異なることが問題となっているため、複数の施設による染色・評価の標準化を試みた。結果は国際学会発表、論文発表を予定している。

さらに、ホルモン療法前後の組織を用いて、細胞増殖の評価としてKi67染色を行ったが、ホルモン療法前後で減少が認められ、オートファジーの増加とは独立していた。

(3) ホルモン療法治療効果と細胞死、細胞増殖との関係

治療効果との関連においては、Ki67は臨床効果の有無にかかわらず減少が認められたが、オートファジー関連蛋白は臨床的効果が認められる症例で増加が強い傾向が認められ、ホルモン療法の治療効果にオートファジーが関与している可能性が示唆された。今まで、ホルモン療法の効果は主に細胞増殖の変化により評価されていたが、本研究によりオートファジーの誘導を評価することにより、より詳細に治療効果を評価できる可能性が示された。また、オートファジーの治療効果への関与は、オートファジー耐性が治療抵抗性に関与している可能性を示唆しており、治療耐性克服へつながる可能性がある。以上の

結果については現在論文作成中である。また、オートファジーに関連し減少するとされる Caveolin1 の発現を調べ、間質における caveolin の発現低下が予後と関連すること (Cancer Sci. 102(8), 2011, 1590-96)、またホルモン感受性乳癌とそれ以外の乳癌における遺伝子不安定性 (CNV) の違いについて検討し (Expert Opin Ther Targets 16, 2012, S31-35)、論文報告した。

乳癌幹細胞については、現在マーカーの染色を行い評価を行っている。

さらに、新たな術前ホルモン療法の臨床試験を開始し、現在、登録、治療、サンプル収集を行っている。がん細胞の細胞死の態様と細胞増殖、エネルギー代謝を検討し、それらと治療反応性、抵抗性との関連につき同様に解析を施行し、検証する予定である。

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3件)

- ① Ueno T, Emi M, Sato H Ito N, Muta M, Kuroi K, Toi M Genome-wide copy number analysis in primary breast cancer. Expert Opin Ther Targets. 査読有, 16, 2012, S31-35
- ② Qian N, Ueno T Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Yoshida N, Mikami Y, Wakasa T, Shintaku M, Tsuyuki S, Inamoto T, Toi M Prognostic significance of tumor/stromal caveolin-1 expression in breast cancer patients. Cancer Sci. 査読有, 102(8), 2011, 1590-96 DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.01985.x
- ③ 上野貴之 乳がん一転移性乳癌の治療がん治療最前線 査読無 1巻, 2010, 18-22

[学会発表] (計3件)

- ① Ueno T, Masuda N et al. A multicenter phase II trial of neoadjuvant letrozole plus low-dose cyclophosphamide in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive breast cancer (JBCRG07). ASCO Annual Meeting 2011/06 Chicago

- ② 上野貴之 乳がんの標的分子とその制御
日本分子生物学会年会 2010/12/08 神戸

- ③ 上野貴之 術前ホルモン療法の効果判定
Kyoto Breast Cancer Consensus
Conference (KBCCC) Satellite
Conference in Hokkaido 2010/06/26 小樽

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 貴之 (UENO TAKAYUKI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40452362

(2) 研究分担者

杉江 知治 (SUGIE TOMOHARU)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70335264
山城 大泰 (YAMASHIRO HIROYASU)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：70402914