

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15571

研究課題名（和文）アロマターゼ阻害剤耐性再発乳癌に対するエストロゲン療法のバイオマーカー開発

研究課題名（英文）Development of biomarkers of estrogen therapy for aromatase inhibitor-resistant recurrent breast cancer

研究代表者

森 瞳美（Mori, Hitomi）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70795541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ER陽性乳癌に対し、エストロゲン治療後のESR1+/ ESR1-両細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。エストロゲン刺激型（SC31）およびエストロゲン抑制型（GS3）の患者由来異種移植片モデルを用いたシングルセル解析を行った。エストロゲンは、ER を活性化しESR1+細胞を刺激するが、ER+癌においてESR1-細胞の増殖にも影響を及ぼすことを初めて示した。E2はGS3のみで腫瘍抑制遺伝子IL24を誘導した。E2治療後のIL24+細胞では、アポトーシス関連遺伝子発現が増加した。IL24の発現が、E2療法適応患者の選択および治療効果予測のバイオマーカーになる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内分泌療法を選択する際、必ずしもER100%陽性である必要はないが、ホルモン依存性乳癌のER-細胞に関する情報はほとんどない。エストロゲン療法の有用性・安全性は確立していないため、日本の乳癌診療ガイドライン2022年版では、治療として推奨されていない。エストロゲンが乳癌の退縮を誘導するメカニズムを解明し、ER陽性閉経後乳癌、AI耐性症例の中でエストロゲン治療の効果が期待できる症例を予測するバイオマーカーを特定することができれば、既存の薬剤でAI耐性再発乳癌患者を救うことが可能となる。本研究ではIL24がバイオマーカーになる可能性を示唆し、今後エストロゲン療法の適応をしぼる一助になると考える。

研究成果の概要（英文）：The benefit of endocrine therapy is normally observed for cancers with 10% or more of cells positive for ER expression. We compared the gene expression profiles in both ESR1+ and ESR1- cells in ER+ tumors following estrogen treatment. Our single-cell RNA sequencing analysis of estrogen-stimulated (SC31) and estrogen-suppressed (GS3) patient-derived xenograft models offered an unprecedented opportunity to address the molecular and functional differences between ESR1+ and ESR1- cells. While estrogen should activate ER and stimulate ESR1+ cells, our findings regarding ESR1- cells were important, indicating that the proliferation of ESR1- cells in ER+ cancer is also influenced by estrogen. Another valuable finding from our studies was that estrogen also upregulated a tumor-suppressor gene, IL-24, only in GS3. Estrogen increased the percentage of cells expressing IL-24, associated with the estrogen-dependent inhibition of GS3 tumor growth.

研究分野：乳癌

キーワード：ER陽性乳癌 アロマターゼ阻害剤耐性 エストロゲン受容体 シングルセル解析 エストロゲン療法 DHT

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

2001 年以降、いくつかの小規模な前向き臨床試験で、ER 陽性閉経後乳癌の AI 耐性症例に対するエストロゲン療法の効果が報告されている (Lønning ら 2001, Agrawal ら 2006, Ellis ら 2009, Iwase ら 2013, Chalasani ら 2014, Zucchini ら 2015)。エストロゲンが乳癌の退縮を誘導するメカニズムについては、AI 耐性乳癌細胞株と前述した WHIM16・PDX モデルを用いて検討されており、そのメカニズムには小胞体ストレス (Lewis ら 2005, Ariazi ら 2011, Obiorah ら 2014, Fan ら 2018, Hosford ら 2019) または Fas/FasL 経路の活性化 (Song ら 2001) によるアポトーシスが関与していたと報告されている。しかし、そのメカニズムの全貌は明らかになっておらず、エストロゲン療法の有用性・安全性は確立していないため、日本の乳癌診療ガイドライン 2018 年版では、まだ治療として推奨されていない。そこで、「エストロゲンが乳癌の退縮を誘導するメカニズムは上記経路のアポトーシスだけなのか？」また、「エストロゲンで退縮する乳癌を特定するバイオマーカーはないのか？」と考えた。

2. 研究の目的

エストロゲンが乳癌の退縮を誘導するメカニズムを解明し、ER 陽性閉経後乳癌、AI 耐性症例の中でエストロゲン治療の効果が期待できる症例を予測するバイオマーカーを特定することができれば、既存の安価な薬剤で AI 耐性となった再発乳癌患者を救うことが可能となる。GS3 は、ER100% 陽性であり、世界で唯一の *ESRI* に遺伝子変異がないエストロゲン乳癌抑制 PDX モデルである。人工的に作成された AI 耐性乳癌細胞株と違い、GS3 は、実際に AI 治療耐性となり再発 (脳転移) した患者さんのサンプルを移植して確立されたヒト乳癌組織であり、臨床試験に近い環境で *In vivo* の試験を行うことが可能である。

乳癌の領域において ER の評価は、診断および治療方針の決定において必要不可欠であるが、シングルセル解析を用いて ER 陽性細胞と ER 陰性細胞に分けて解析を行った報告、さらに *ESRI* 陽性細胞/陰性細胞間のクロストークを示唆した報告はまだなく、独自性の高い研究と言える。GS3 モデルでエストロゲンが腫瘍退縮を誘導する際に見られた「*ESRI* が減少する」、「腫瘍増殖関連遺伝子が抑制される」、「*IL24* 発現を誘導する」という特徴は、通常の ER 陽性乳癌とは真逆の反応であり、非常に興味深い点である。そこで、筆者が DC1 期間中に滞在した Shiu-an Chen 研究室で、エストロゲンによって増殖が促進される ER 陽性乳癌の PDX モデル (SC31) を確立し、同様の *In vivo* 薬剤試験 (エストラジオール 1mg 対プラセボ) を行った。

本研究では、SC31 に対する *In vivo* 薬剤試験 (エストラジオール 1mg 対プラセボ) のサンプルを用いたシングルセル解析を行い、GS3 と SC31 のシングルセルデータを比較解析することで、ER 陽性閉経後乳癌、AI 耐性症例に対するエストロゲン療法有効群を特定するバイオマーカーの開発を目的とする。

3. 研究の方法

癌組織は均一な組織ではないため、腫瘍組織片から抽出した mRNA によるバルク RNA シークエンスでは、腫瘍の平均的な情報しか得ることができない。しかし、シングルセル解析では、約 5000 個の細胞ひとつひとつにおいて数千種類の遺伝子発現を評価することが可能であり、バルク RNA シークエンスでは得られない腫瘍内の差異や変化を紐解くことができる。

1) シングルセルの分離

ER 陽性乳癌である GS3(エストロゲン抑制モデル)と SC31(エストロゲン増殖モデル)それぞれにエストラジオール 1mg 対プラセボ試験を行い(各モデル2匹ずつ無作為に割り当て、計8匹使用する)、2つの生物学的複製から分離された組織片を統合する。腫瘍組織を細かく切り刻んだ後、試薬で消化し、70 μ m のセルストレーナーで濾過する。残留赤血球を除去し死細胞吸着マイクロビーズを用いて死細胞を除去し、生きたシングルセルを分離する。

2) シングルセル RNA シークエンスと解析

シングルセルを 10x Genomics (米国カリフォルニア州プレザントン)のクロムコントローラーにロードし、シングルセル RNA シークエンスライブラリーを作成する。ライブラリーは、HiSeq 2500 機器(イリミナ、米国カリフォルニア州サンディエゴ)を使用して、セルあたり 50k~100k の読み取りの深さでシークエンスする。シークエンスの生データは、セルレンジャーパイプライン(バージョン2.0)を使用して処理する。その後のデータ分析は、R ソフトウェアと Seurat パッケージを使用して実行する。ミトコンドリアの読み取り率が 20%を超え、検出可能な遺伝子が 200 未満の細胞は、低品質と見なし除外する。2,000 個の上位遺伝子を使用してデータをクラスター化し、UMAP を使用して、結果のクラスターを視覚化する。軌道解析は、R ソフトウェアと Monocle パッケージを使用する。軌道解析は、疑似時間を通じて細胞間の関係を調査するアルゴリズムであり、細胞の分化の過程や治療による変化の過程を予測することが可能となる。

3) GS3と SC31 の比較

いずれも ER 高発現の乳癌であるが、エストロゲンに対しては腫瘍退縮と腫瘍増大と真逆の反応を示す。両者を比較することにより、エストロゲンによる乳癌退縮のメカニズムをさらに解明し、バイオマーカーの候補を挙げることを目標としている。本研究では、①SC31 のプラセボ治療細胞とエストロゲン治療細胞の比較、および②GS3 と SC31 のシングルセルデータを統合して再クラスタリングした上で行う 4 群間の比較(GS3/SC31×エストロゲン/プラセボ)を計画している。免疫組織化学染色によるタンパクレベルでは ER が 100%陽性であっても、mRNA レベルでは必ずしも *ESR1* が 100%陽性ではない。GS3 単独の解析時と同様に *ESR1* 陽性細胞/*ESR1* 陰性細胞に注目して解析を進める予定である。また、すでに公表されているシングルセル解析の論文の多くは、その生データを公開しており、GS3、SC31 の腫瘍のデータ(プラセボ治療群)と、公開されている ER 高発現乳癌との比較、また ER 低発現乳癌との比較も、シングルセルデータの統合と再クラスタリングを行うことで可能となる。GS3と SC31 の比較解析により挙げられるバイオマーカー候補を、他の乳癌のデータを用いて検証することも可能である。

4) GS3を用いた E2 と DHT の比較:

GS3に対し、エストラジオール 1mg 対プラセボ試験を行うと、E2 治療により治療退縮を認めため、他の性腺ステロイド(プロゲステロン、内因性のアンドロゲンであるジヒドロテストステロン(DHT))の影響 GS3を用いて検討する。P4(10mg)、DHT(12.5mg)ペレットを GS3 に移植し、治療を行なった。

4. 研究成果

E2 は、SC31/GS3 双方でエストロゲン応答遺伝子の発現を誘導した。しかし、E2 は SC31 で細胞周期を促進し、GS3 では抑制した。また、E2 治療後、SC31 でインターフェロン α/γ 応答遺伝子発現が減少し、SC31/GS3 双方で TNFA/NF κ B 関連遺伝子発現が減少した。これらの遺伝子発現変化は、同じ腫瘍内の *ESR1+*/*ESR1-*両細胞で見られ、*ESR1-*細胞に対す

るエストロゲンの効果を初めて示した。E2はGS3のみで腫瘍抑制遺伝子IL24を誘導し、間欠的E2治療によりGS3がエストロゲン非依存性を獲得した後は、IL24発現レベルが低下した。E2治療後のIL24+細胞では、アポトーシス関連遺伝子発現が増加し、腫瘍増殖関連遺伝子発現が低下した。以上より、エストロゲンはER+乳癌対し、異なる反応(腫瘍増殖/抑制)を誘導し、ESR1+/ESR1-両細胞に影響を及ぼした。本研究では、IL24の発現が、E2療法適応患者の選択および治療効果予測のバイオマーカーになる可能性を示唆した。この研究成果は、2021年12月8日に米国テキサス州で開催された第44回San Antonio Breast Cancer Symposium スポットライト・ポスターディスカッション(PD1-04)で発表した。また、この論文はCancer誌に掲載された(2021, 13(24), 6375)。

この研究成果をもとに、さらなるホルモン治療とシングルセル解析に取り組んだ。興味深いことに、P4ではGS3の腫瘍退縮が起こらなかったが、DHT対プラセボ試験を行ったところ、DHTでも腫瘍退縮を認めた。プラセボ群で強陽性であるCEACAM5(CEA)発現は、E2治療後にほぼ消失していたが、DHT治療後は、発現量に変化が見られなかった。3サンプルを統合したシングルセル解析では、プラセボ群と比較し、E2治療、DHT治療後ともに、G1期細胞の割合が増加し、G2M期細胞の割合が減少していた。この研究成果を2022年12月7日に米国テキサス州で開催された第45回San Antonio Breast Cancer Symposium ポスターセッション(P3-11-05)で発表した。現在は、追加のシングルセル解析を行い、論文執筆中である。

2年間を通して、論文1編、国際学会2回、国内全国学会7回の発表を行い、研究成果を発信した。また、本研究は、日本乳癌学会の研究奨励賞、日本外科学会のYoung Investigator's Awardを受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshitake Ryohei, Mori Hitomi, Ha Desiree, Wu Xiwei, Wang Jinhui, Wang Xiaoqiang, Saeki Kohei, Chang Gregory, Shim Hyun Jeong, Chan Yin, Chen Shiuan	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification and characterization of a proliferative cell population in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer through spatial and single-cell transcriptomics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.01.31.526403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori Hitomi, Saeki Kohei, Chang Gregory, Wang Jinhui, Wu Xiwei, Hsu Pei-Yin, Kanaya Noriko, Wang Xiaoqiang, Somlo George, Nakamura Masafumi, Bild Andrea, Chen Shiuan	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of Estrogen Treatment on ESR1+ and ESR1? Cells in ER+ Breast Cancer: Insights from Single-Cell Analysis of Patient-Derived Xenograft Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6375 ~ 6375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13246375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hitomi Mori, Kohei Saeki, Gregory Chang, Jinhui Wang, Xiwei Wu, Noriko Kanaya, George Somlo, Shiuan Chen
2. 発表標題 Efficacy of Gonadal steroids on aromatase inhibitor-resistant ER+ breast cancer: Insights from single-cell trajectory analysis of a patient-derived xenograft model
3. 学会等名 The 45th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森瞳美、Shiuan Chen、鬼塚哲、本山健太郎、永井英司、中房祐司
2. 発表標題 アロマターゼ阻害剤(AI)耐性再発乳癌に対するエストロゲン療法のバイオマーカー開発
3. 学会等名 第 122 回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森瞳美、Shiuan Chen、服部正見、本山健太郎、永井英司、中房祐司
2. 発表標題 アロマターゼ阻害剤耐性再発乳癌に対する性ホルモンの有効性
3. 学会等名 第23回ホルモンと癌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森瞳美、Shiuan Chen、服部正見、本山健太郎、永井英司、中房祐司
2. 発表標題 乳癌シングルセル解析の魅力と今後の挑戦
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森瞳美、Shiuan Chen、鬼塚哲、本山健太郎、永井英司、中房祐司
2. 発表標題 シングルセル解析を用いたER陽性乳癌におけるESR1+およびESR1-細胞に対するエストロゲン治療の影響
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitomi Mori, Kohei Saeki, Gregory Chang, Jinhui Wang, Xiwei Wu, Pei-Yin Hsu, Noriko Kanaya, Xiaoqiang Wang, George Somlo, Masafumi Nakamura, Andrea Bild, Shiuan Chen
2. 発表標題 Influence of Estrogen Treatment on ESR1+ and ESR1 - Cells in ER+ Breast Cancer: Insights from Single-Cell Analysis of Patient-Derived Xenograft Models.
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 Hitomi Mori
2. 発表標題 1.Estrogen-mediated mechanisms in estrogen receptor-positive breast cancer at the single cell level
3. 学会等名 44th San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森瞳美
2. 発表標題 Estrogen-induced cell cycle arrest as an unexpected outcome of aromatase inhibitor-resistance in ER+ breast cancer
3. 学会等名 第29回 乳癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森瞳美
2. 発表標題 アロマターゼ阻害薬耐性ER+再発乳癌に対するエストロゲン療法
3. 学会等名 第29回 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

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