

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591911

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌の新規治療法開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Experimental research on the development of new treatment strategies for triple negative breast cancer

研究代表者

紅林 淳一 (Kurebayashi, Junichi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10248255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)の新規治療薬として期待されるpoly ADP-ribose polymerase (PARP) 1阻害薬olaparibとmTOR阻害薬everolimus (EVE)に注目し、乳癌細胞株を用いて基礎研究を行った。olaparibはTNBC細胞ばかりでなくER+HER2-乳癌細胞に対しても抗腫瘍活性を示し、CSC比率の低下をもたらし、DNA傷害性薬剤と相加的抗腫瘍効果を示した。ER+HER2-乳癌細胞において抗エストロゲン薬とolaparibは相加的抗腫瘍効果を示した。EVEはBRCA1変異を伴うTNBCで強い抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We conducted experimental studies to investigate anti-tumor activity of a poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 1 inhibitor olaparib and a mTOR inhibitor everolimus (EVE) using breast cancer cell lines. We also investigated the effects of the agents on the ratio of CSC. Olaparib possesses growth inhibitory activity in not only TNBC cell lines but also ER-positive, HER2-negative cell lines. A combined treatment of olaparib with antiestrogen (AE) rendered an additive growth inhibitory effect in ER-positive cell lines. Anti-tumor activity of EVE was investigated using a panel of human breast cancer cell lines of various subtypes. EVE possessed a drastic growth inhibitory effect on a BRCA1-mutated, TNBC cell line and also exhibited a moderate growth inhibitory effect on a part of ER-positive breast cancer cells lines. EVE tended to decrease the ratio of CSC in most cell lines.

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：乳癌 トリプルネガティブ・サブタイプ PARP阻害薬 mTOR阻害薬 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

- (1) 乳癌患者の内分泌療法、抗 HER2 療法に対する治療効果を予測するため、乳癌組織における estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2 の発現が臨床の場でルーチンに検査されている。これら 3 つの因子すべてが陰性の乳癌が triple negative (TN) 乳癌であり、内分泌療法や抗 HER2 療法が無効であり、今のところ抗癌化学療法のみが治療に用いられている。TN 乳癌は、生物学的悪性度が高く、早期に遠隔転移を起こしやすく、きわめて予後が悪い。そのため TN 乳癌の新たな治療法の開発が急務となっている。
- (2) 最近の基礎的研究により、多くの TN 乳癌は、遺伝子発現プロファイルを用いた乳癌の分類の一つ”intrinsic subtype”における basal-like subtype と類似した遺伝子発現プロファイルを有している。また、家族性乳癌の原因遺伝子 *BRCA1* の変異保因者に発生する乳癌の多くは、TN 乳癌に分類される。すなわち *BRCA1* の機能異常と TN 乳癌の発生に関連があることが推測されている。また、多くの TN 乳癌では、HER1 や c-KIT の過剰発現、Src シグナル伝達の亢進などが認められている。これらの TN 乳癌の特徴を標的とした分子標的薬を用いた多くの前臨床・臨床試験が進められている。
- (3) 平成 20-22 年度に研究代表者らは、乳癌細胞株パネルの生物学的特徴の解析、本パネルを用い Src 阻害薬 dasatinib が TN 乳癌細胞 (epithelial-mesenchymal transition [EMT] を示す basal B subtype で有効性が高い) に対し強い抗腫瘍活性を示すこと、dasatinib は、aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) 陽性細胞、すなわち乳癌幹細胞に対し、より強い増殖

抑制効果を示すことを見出した。さらに、臨床乳癌標本を用い c-Src や p-Src (Y416, Y527) の腫瘍細胞における発現を検討し、Src シグナル伝達の亢進が多くの乳癌で認められ、遠隔転移の発生と相関することを見出した。また、TN 乳癌で高頻度に見られる *BRCA1* を代表とする DNA double strand break 修復異常を標的とした PARP 阻害薬 olaparib を入手し、上記パネルを用い細胞増殖抑制効果や乳癌幹細胞に与える影響を検討し始めている。

- (4) 血液腫瘍と同様に固形腫瘍においても癌幹細胞 (cancer stem cells, CSC) が存在し、この CSC が抗癌化学療法薬や放射線療法に対する抵抗性を示し、遠隔転移や再発の原因となっていることが推測されている。従って、CSC に対しより強い抗腫瘍効果を示す薬剤の使用は、治療効果の延長や癌の治癒につながる可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) 今回の基礎研究においては、*BRCA1* 機能低下を代表とした DNA double strand break の修復障害を有する TN 乳癌細胞に対する PARP-1 阻害薬 olaparib の細胞増殖抑制作用及びその作用機序の解明、TN 乳癌以外のサブタイプの乳癌細胞に対する olaparib の細胞増殖抑制効果とその作用機構の解明、olaparib と抗癌化学療法薬との併用効果 (DNA 傷害を誘導する薬剤との相乗効果) とその作用機構の解明、以上の細胞増殖抑制効果と CSC 比率の変化との関連を検討する予定である。
- (2) 臨床例において PARP1 阻害薬に感受性のある集団を同定するために、*BRCA1*, PARP1, PTEN, 活性型 Src, focal-adhesion kinase (FAK) などの発

現を系統的に免疫組織化学的に検討する。

- (3) 本研究は、平成 20-22 年度に研究代表者らが整備してきた遺伝子発現プロファイルで分類される各種 subtype を網羅したヒト乳癌細胞株パネルを用い、TN 乳癌の新規治療薬として世界的に注目されている PARP1 阻害薬の *in vitro* における抗腫瘍効果及びその作用機構を検討する。さらに、臨床材料を用いてこれらの新規分子標的薬の標的及び関連因子の発現を系統的に分析する。本研究において、TN 乳癌に対して有効な治療法が見出されれば、その治療法の臨床導入を進めることの科学的根拠が構築できる。

3. 研究の方法

- (1) "Intrinsic subtype" 分類の 4 種類のサブタイプを網羅する 7 種類のヒト乳癌細胞株パネルを用い、PARP1 阻害薬 olaparib 及び mTOR 阻害薬 everolimus (EVE) の単剤における抗腫瘍活性 (細胞数カウント、時間・濃度依存性) を検討する。同時に、CSC の比率 (mammosphere assay, CD44/CD24 flow cytometry 解析) に与える影響を検討する。さらに、抗癌化学療法薬 (paclitaxel, doxorubicin, etoposide, SN38, 5-fluorouracil, cisplatin など) との併用が抗腫瘍活性・CSC 比率に与える影響を系統的に検討する。また、抗腫瘍活性の作用機構を検討するため、これらの単独または併用投与が、細胞周期や apoptosis に与える影響を解析する。以上の実験により、TN 乳癌細胞に対し有効性の高い (抗腫瘍活性ばかりでなく CSC 比率低下を伴う) 治療法が選別される。
- (2) 上記 *in vitro* 実験により選別された「分子標的薬と化学療法剤の良好な組み合わせ

わせ」の作用機構を解明するため、これらの薬剤の単独または併用投与が、細胞内シグナル伝達因子 (とくに Erk シグナルや FAK シグナル) やアポトーシス関連因子 (Bcl-2, Bax, Bcl-xL) の発現に与える影響を検討する。また、これら分子標的薬の標的因子 (PARP1, BRCA1/2, リン酸化 Src) や関連したシグナル伝達因子 (PTEN, Erk, FAK) の臨床標本における発現量を免疫組織化学的に半定量化し、薬剤感受性予測因子の将来の候補としてのデータを蓄積しておく。

4. 研究成果

- (1) 平成 23 年度は、PARP 1 阻害薬 olaparib に関する基礎研究を行い、olaparib は TNBC 細胞ばかりでなく ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞に対しても抗腫瘍活性を示し、細胞周期における G2/M 分画への集積、アポトーシスの誘導、CSC 比率の低下をもたらし、さらに DNA 傷害性化学療法薬 SN38 と相加的に抗腫瘍効果を示した。また、ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞において抗エストロゲン薬と olaparib が相加的な抗腫瘍効果を示すことが判明した。
- (2) 平成 24 年度は、ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞におけるエストロゲン、各種内分泌療法薬、olaparib の細胞増殖や癌幹細胞に与える影響を探索的に検討した。その検討の中で、内分泌療法抵抗性獲得のメカニズムの一つとして、CSC 制御機構の異常が関わっている可能性が示唆された。また、内分泌療法薬と mTOR 阻害薬 EVE の併用が、相加的抗腫瘍効果とともに CSC 比率減少効果の増強をもたらすことも示された。
- (3) 平成 25 年度は、様々なサブタイプの乳癌細胞株パネルにおける EVE の抗腫瘍効果、細胞周期、アポトーシス、さら

に CSC 制御に与える影響について検討した。EVE は、BRCA1 遺伝子変異を伴う TN で極めて強い抗腫瘍効果を示した。また、ER 陽性細胞の一部に対しても、中等度の抗腫瘍活性を示した。多くの細胞株において、G1-S 移行阻害およびアポトーシスの誘導がみられた。CSC 比率は、低下する細胞株が多かったが、著変は認められなかった。さらに、平成 24 年度に得られた ER 陽性乳癌細胞株における抗エストロゲン薬 (AE) による CSC 抑制の作用メカニズムに関する研究も行った。AE は、ER 陽性の乳癌細胞株全てにおいて、エストロゲンによる CSC 比率増加作用を阻害した。しかし、その阻害効果は、ホルモン感受性の低下した細胞株では、弱い傾向を示した。また、ER 陽性の non-CSC による ER 陰性 CSC に対するパラクリン経路による制御機構の解明を目指す pilot study を開始した。ホルモン感受性が高い MCF-7 細胞株にエストロゲンを暴露させ、CSC と non-CSC をフローサイトメトリーで sorting し、mRNA expression microarray で発現プロファイルを比較検討した。その結果、non-CSC においてエストロゲンにより CSC に比べより強く発現が促進されるパラクリン因子の候補遺伝子が同定された。今後、さらに本研究を進めていく予定である。

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 12 件)

Shimo T, Kurebayashi J (ほか 5 名、2 番目): Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in

breast cancer cells. Breast Cancer 21: 75-85, 2014. doi: 10.1007/s12282-012-0356-z. 査読有.
Kurebayashi J, Kanomata N (他 8 名、1 番目): Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity and high Ki67 labeling index predict a poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone. Breast Cancer 21: 214-222, 2014. doi: 10.1007/s12282-012-0380-z. 査読有.
Kurebayashi J, Kanomata N (他 5 名、1 番目): Prognostic value of phosphorylated HER2 in HER2-positive breast cancer patients treated with adjuvant trastuzumab. Breast Cancer 2013 [Epub ahead of print] <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12282-013-0478-y>. 査読有.
Kikuchi Y, Kurebayashi J (他 7 名、6 番目): Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation. Front Genet 5: 271, 2013. doi: 10.3389/fgene.2013.00271. 査読有.
山下哲正、紅林淳一 (他 4 名、2 番目): エストロゲン受容体陽性乳癌細胞における抗エストロゲン薬と mTOR 阻害薬 エベロリムスの細胞増殖及び癌幹細胞制御に対する効果. 川崎医学会誌 39: 65-79, 2013. <http://igakkai.kms-igakkai.com/archives/2066>. 査読有.
紅林淳一: 乳がんのサブタイプ分類とゲノミクス. クリニシアン 622: 82-87, 2013. 査読無.

紅林淳一：ホルモン療法耐性・HER2 陰性乳がんに対する薬物治療の実際 1) ホルモン療法. 臨床腫瘍プラクティス、9: 362-366, 2013. 査読無.

紅林淳一：ホルモン感受性と抵抗性の予測因子. 癌と化学療法、40: 2500-2504, 2013. 査読無.

Takagi K, Moriya T (他 13 名、13 番目) : Intratumoral estrogen concentration and expression of estrogen-induced genes in male breast carcinoma: comparison with female Breast carcinoma. Hormones and Cancer 4: 1-11, 2013. doi: 10.1007/s12672-012-0126-6. 査読有.

紅林淳一：トリプルネガティブ乳癌の治療戦略. 内分泌甲状腺外科学会雑誌 29: 293-297, 2012. 査読無.

Kanomata N, Kurebayashi J (他 3 名、1 番目) : Clinicopathological significance of Y416Src and Y527Src expression in breast cancer. J Clin Pathol 64: 578-586, 2011. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200042. 査読有.

Sassa M, Kurebayashi J (他 6 名、6 番目): Aberrant promoter methylation in overexpression of *CITED1* in papillary thyroid cancer. Thyroid 21: 511-517, 2011. doi: 10.1089/thy.2010.0295. 査読有.

[学会発表](計 11 件)

Kurebayashi J: Biological markers: as guidance for clinical decision in breast cancer treatment and their limits. Eisai Symposium of Contemporary Oncology 2014, 2014 年 2 月 15 日, Jeju, South Korea

紅林淳一：乳癌の内分泌療法. 第 1 回 Breast Cancer Board Japan 会議、2013 年 9 月 14 日、大阪

Kurebayashi J, Kanomata N, et al.: Prognostic factors in HER2-positive breast cancer patients treated with adjuvant trastuzumab and chemotherapy. The 12th St. Gallen Breast Cancer Conference, 2013 年 3 月 14 日, St. Gallen, Switzerland

Yamashita T, Kurebayashi J, et al.: Effects of antiestrogens on the cell growth and regulation of cancer stem cell population in breast cancer cells. The 12th St. Gallen Breast Cancer Conference, 2013 年 3 月 14 日, St. Gallen, Switzerland

紅林淳一、下登志朗他：乳癌幹細胞の制御を指標とした新しい治療戦略. 第 20 回日本乳癌学会学術総会プレジデンシャルシンポジウム 1、2012 年 6 月 28 日、熊本

紅林淳一：トリプルネガティブ乳癌の治療戦略. 第 24 回日本内分泌外科学会総会シンポジウム 5、2012 年 6 月 9 日、名古屋

紅林淳一：トリプルネガティブ乳癌のバイオロジー. 第 28 回日本乳腺甲状腺超音波診断会議ワークショップ 2、2012 年 4 月 22 日、岡山

紅林淳一、園尾博司：乳癌のサブタイプ分類と個別化治療. 第 112 回日本外科学会定期学術集会シンポジウム 13、2012 年 4 月 14 日、幕張

Shimo T, Kurebayashi J, et al.: Anti-tumor and anti-cancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. The 8th European

Breast Cancer Conference, 2012年3月
21日、ウィーン

紅林淳一、鹿股直樹他：乳癌の克服を
目指した薬物療法：乳癌幹細胞を指標とし
た基礎研究．第19回日本乳癌学会学術
総会プレジデンシャルシンポジウム1、
2011年9月2日、仙台

紅林淳一：Intrinsic subtypeの開発と生
物学的意義．第9回日本臨床腫瘍学会学
術集会ワークショップ1、2011年7月
21日、横浜

〔図書〕(計3件)

紅林淳一：新しい分子標的療法への期待
(HER2陽性乳癌に対する薬剤を除く)
「これからの乳癌診療2013-2014」, pp.
72-79、園尾博司監修、金原出版、東京、
2013

紅林淳一：術後補助療法における分子標
的治療薬．オンコロジー・クリニカルガ
イド乳癌薬物療法、pp. 292-301、南山
堂、東京、2013

紅林淳一：新薬情報、「これからの乳癌
診療2011-2012」, pp. 120-126, 金原出
版株式会社、東京、2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

紅林淳一 (KUREBAYASHI JUNICHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10248255

(2)研究分担者

森谷卓也 (MORIYA TAKUYA)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230160

鹿股直樹 (KANOMATA NAOKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60263373

(3)連携研究者

なし