

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461983

研究課題名(和文) Notch4を標的としたホルモンレセプター陰性、HER2陰性乳癌の治療法開発

研究課題名(英文) Development of Notch4-targeted therapy for patients with HR-negative and HER2-negative breast cancer

研究代表者

久保 真 (KUBO, Makoto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60403961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Notchシグナル経路はTN乳癌に必須のシグナルであり、治療標的となる。Notch4核内移行率はTN乳癌(21例)で54%だったのに対し、non-TN乳癌(46例)では18%と有意に低かった。さらに、Microarrayを用いてCD24とSTAT1の関係性を見出し、in vivoにてCD24がSTAT1、Hedgehogシグナル経路を抑制することを示した。また、TN乳癌71例中59例(83%)がBasal-likeであり、うち37例(62.7%)がBRCAnessであった。TN乳癌はNotchシグナル経路が活性化するStemnessであるだけでなく、BRCA遺伝子機能不全状態でもある。

研究成果の概要(英文)：This study shows that NOTCH4 receptor is a potential new therapeutic target for TNBC. First, NOTCH4 inhibition reduced proliferation and invasiveness in TNBC cells and reduced tumour volume and tumorigenicity, in vivo. Second, CD24 siRNA-transfected breast cancer cells (BCCs) demonstrated higher expression of Hedgehog signaling molecule, increased anchorage-independent proliferation, and enhanced invasiveness and superior tumorigenicity. DNA microarray analysis identified STAT1 as a relationship between CD24 and SHH. CD24 siRNA-transfected BCCs with concurrent STAT1 inhibition exhibited decreased SHH expression. Finally, we focused on instability of TNBC. Of the 71 TNBCs, 59 tumors (83%) were the basal-like phenotype. The results of the MLPA assays showed that 37 (62.7%) tumors had a BRCAness. Our study proved that TNBCs involve the stemness which activates Notch signaling and the BRCAness which increases gene instability.

研究分野：乳腺外科、臨床・腫瘍学、臨床遺伝学

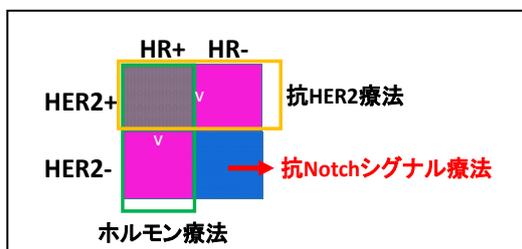
キーワード：トリプルネガティブ乳癌 Notchシグナル経路 Notch4 Stemness Basal-like BRCAness

1. 研究開始当初の背景

1) 多くの臨床試験やトランスレーショナル・リサーチの結果、乳癌は生物特性 (HR や HER2 発現状況など) に基づいてターゲットを定めた治療法が選択されている癌腫の一つである (文献①)。しかしながら、2) トリプルネガティブ (TN) 乳癌やホルモン治療耐性乳癌などでは、必ずしも満足できる治療選択が得られない病態も存在する (文献②)。また、3) 多様な生物学的特質をもつ症例 (Heterogeneity) や、原発巣と転移巣の形質が異なる症例 (Discordance) が最近注目されている。さらには、4) 抗癌剤耐性を有する乳癌幹細胞が存在し、現在の治療戦略の効果を改善するには乳癌幹細胞に対する治療法の開発が必要とも考えられている (文献③)。したがって、TN 乳癌に対しては機能的メカニズムを解明することと、新規の治療標的を探索する必要がある。

2. 研究の目的

HR 陰性かつ HER2 陰性のいわゆる TN 乳癌は明らかな治療標的を持たないため、抗癌剤治療の奏効率が比較的高いにもかかわらず、早期に遠隔転移を来し予後不良である。我々は、乳癌の形態形成シグナルを解析する中で、TN 乳癌では Notch 経路、特に Notch4 が活性化し、機能亢進している可能性を見出した。したがって、本研究の主目的は「Notch 経路、特に Notch4 を標的とする TN 乳癌の治療法および予防法の開発の可能性を検証すること」である (下図参照)。



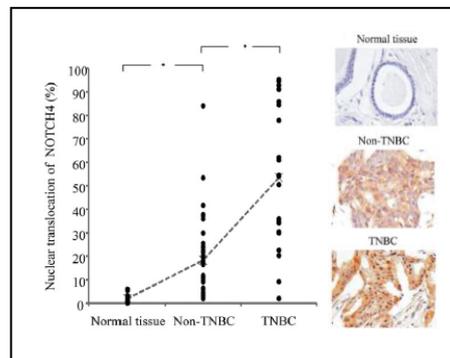
3. 研究の方法

目的の達成は、次の4段階、すなわち、(1) 乳癌組織を用いて、Notch シグナル経路、特に Notch4 の活性化を定量的に解析、さらに病理学的因子との関連を解析し治療対象となる乳癌症例の頻度を算定し、治療対象としての可能性を検証する。(2) 乳癌細胞株を用いて、シグナル阻害剤および RNA 干渉法により、治療標的となる機能 (増殖、浸潤、抗癌剤感受性など) を同定する。(3) 乳腺上皮細胞および種々の乳腺疾患組織を用いて、Notch シグナル経路、特に Notch4 の発癌予防・癌浸潤への関与を解析する。これら成果に基づき、(4) 免疫不全マウスの系を用いて、治療および予防効果を検証する。

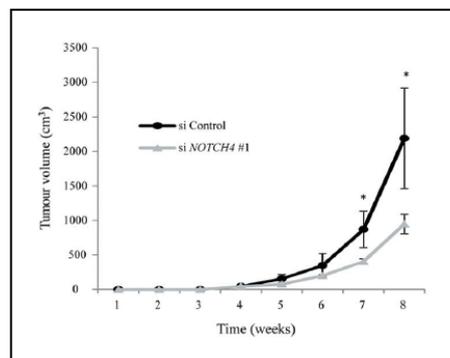
4. 研究成果

(1) Notch シグナル経路は TN 乳癌に必須の

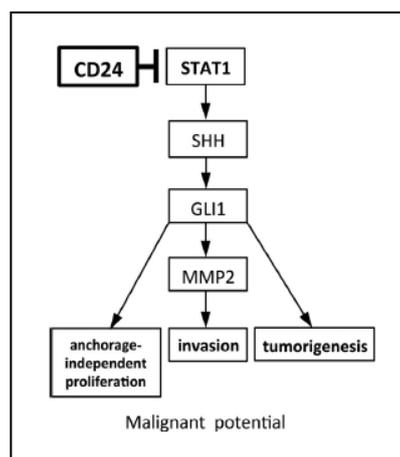
シグナルであり、治療標的となる可能性を示すことに成功した。手術摘出浸潤性乳管癌組織 67 例について、免疫化学組織染色法を用いて Notch4 の核内移行率を指標に Notch 経路の活性化の違いを証明した。Notch4 核内移行率は、TN 乳癌 (21 例) で平均 54% だったのに対し、non-TN 乳癌 (46 例) では平均 18% と有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (下図参照)。



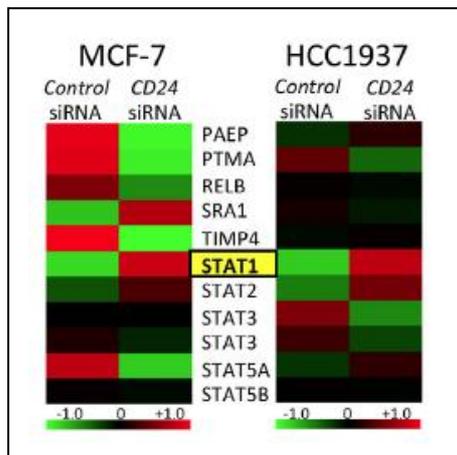
(2) 免疫不全マウス移植系を用いた in vivo にて、Notch 経路を阻害することにより移植腫瘍の増殖を有意に抑制することを証明した ( $p < 0.05$ ) (下図参照)。Notch 経路、特に Notch4 が腫瘍増殖に重要な役割を果たしていることがわかり、治療標的として期待される。



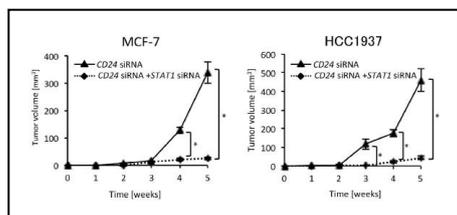
(3) さらに、CD24 が STAT1、Hedgehog シグナル経路を抑制し、乳癌の悪性化、Stemness を抑えることを証明した (下図参照)。



乳癌では、CD44(+)/CD24(- or low)は幹細胞マーカーとして用いられる。Microarrayを用いてC24とSTAT1の関係性を見出し(下図参照)、



免疫不全マウス移植系を用いた in vivo にて、CD24 経路を阻害することにより stemness が刺激され、有意に移植腫瘍の増殖速度が増すことを証明した。反対に STAT1 をノックダウンすると STAT1- Hedgehog シグナル経路は抑制され、有意に移植腫瘍の増殖速度は減弱した (p < 0.01) (下図参照)。



(4) TN 乳癌の遺伝子不安定性を示すために、手術摘出標本のうち TN 乳癌を追加して検討した。TN 乳癌 71 例中 59 例 (83%) が Basal-like であり、そのうち 37 例 (62.7%) が BRCAness と高率であった。すなわち、TN 乳癌は Notch シグナル経路が活性化する Stemness であるだけでなく、DNA 修復ができない BRCA 遺伝子機能不全状態 BRCAness でもあることが証明された。

#### <引用文献>

- ① 乳癌診療ガイドライン、薬物療法 2012 年度版、日本乳癌学会編
- ② Bosch A, Cancer Treat Rev 36:206-15, 2010.
- ③ Liu R, New Engl J Med 356:217-226, 2007.

#### 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 2 件)

- ① Suyama K, Onishi H, Imaizumi A, Shinkai K, Umebayashi M, Kubo M, Mizuuchi Y, Oda Y, Tanaka M, Nakamura M, Katano M. CD24 suppresses malignant phenotype by downregulation of SHH transcription through STAT1 inhibition in breast cancer cells. Cancer Lett. 査読有 374(1): 44-53, 2016. DOI:10.1016/j.canlet.2015.12.013.
- ② Nagamatsu I, Onishi H, Matsushita S, Kubo M, Kai M, Imaizumi A, Nakano K, Hattori M, Oda Y, Tanaka M, Katano M. NOTCH4 is a potential therapeutic target for Triple-negative Breast cancer. Anticancer Research, 査読有 34(1): 69-80, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403446>

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kubo M. TNBC-correlation with other markers to predict outcome. The 14th Asian Breast Diseases Association Meeting & Symposium. 2016年9月3日. スカラエスパシオ (福岡県・福岡市)
- ② 巢山 久実、大西 秀哉、今泉 晃、片野 光男. Hh 経路制御による乳癌幹細胞制御療法の開発. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016年4月15日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ③ 久保 真、森 瞳美、甲斐 昌也、山田 舞、中村 雅史、他 5 名. トリプルネガティブ乳癌のバイオマーカーとしての BRCAness と PD-L1 発現. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016年4月14日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ④ 甲斐 昌也、森 瞳美、巢山 久実、山田 舞、久保 真、中村 雅史. BRCAness 乳癌において EGFR は予後予測因子となりうる. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016年4月14日. リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府・大阪市)
- ⑤ Mori H, Kubo M, Yamada M, Kai M, Osako T, Nishimura R, Arima N, Okido M, Kuroki S, Oda Y, Nakamura M. BRCAness and PD-L1 Expression of Basal-like and Non-Basal-like Triple Negative Breast Cancer. The 38th San Antonio Breast Cancer Symposium(2015). 2015年12月11日. San Antonio (米国) Basic Science Award

- ⑥ 巢山 久実、大西 秀哉、今泉 晃、新海 健太郎、甲斐 昌也、田中 晴生、久保 真、田中 雅夫、片野 光男. 乳癌における CD24 分子発現の意義：CD24 分子発現と Hh 経路活性化の連関解析. 第 115 回日本外科学会定期学術集会. 2015 年 4 月 16 日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ⑦ 巢山 久実、大西 秀哉、甲斐 昌也、田中 晴生、久保 真、新海 健太郎、永松 伊織、松下 章次郎、森藤 良浩、今泉 晃、田中 雅夫、片野 光男. Hh 経路制御による乳癌幹細胞制御療法の開発：CD24 分子発現と Hh 経路活性化の連関. 第 114 回日本外科学会定期学術集会. 2014 年 4 月 4 日. 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑧ 永松 伊織、甲斐 昌也、松下 章次郎、大西 秀哉、久保 真、中野 賢二、田中 雅夫、片野 光男. トリプルネガティブ乳癌に対する新たな治療標的の同定：Notch シグナル系. 第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会. 2013 年 12 月 6 日. いわて県民情報交流センターアイーナ (岩手県・盛岡市)
- ⑨ 巢山 久実、大西 秀哉、甲斐 昌也、田中 晴生、久保 真、永松 伊織、今泉 晃、田中 雅夫、片野 光男. 乳癌細胞における CD24 分子発現と Hh 経路活性化の連関の解析. 第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会. 2013 年 12 月 5 日. いわて県民情報交流センターアイーナ (岩手県・盛岡市)

[その他]

ホームページ等

- ・九州大学大学院医学研究院  
臨床・腫瘍外科  
<http://www.surg1.med.kyushu-u.ac.jp/>
- ・九州大学大学院医学研究院  
腫瘍制御学  
<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 真 (KUBO, Makoto)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：60403961

### (2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)  
福岡女学院看護大学・看護学部・学長  
研究者番号：10145203  
(平成27年4月1日より削除)

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ  
研究拠点・教授

研究者番号：00315061

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30553276