

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861152

研究課題名(和文) Triple negative 乳癌のサブ分類と上皮間質転換、癌幹細胞に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of new subtype of so called the triple negative breast cancer from analysis of cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition in breast cancer.

研究代表者

井上 亜矢子 (INOUE, Ayako)

山梨大学・総合研究部・病院助教

研究者番号：60570265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HER2は、乳癌の分子標的治療および免疫学的治療の標的である。HER2を過剰発現する癌腫は、MHC Class I を下方調整することでT細胞による殺細胞から免疫逃避する。乳癌ではHER2の発現は MHC Class I の発現と逆相関し、さらに、siRNAでHER2の発現を抑制するとMHC Class I の発現は上方調整された。また、乳癌細胞株でMAPKシグナル伝達経路をブロックすると乳癌細胞のMHC Class I の発現は増強することを明らかにした。この結果は、MHC Class I の発現を上方調整することで免疫治療を有効にすることが可能となりtriple negative乳癌の新規治療法となり得る。

研究成果の概要(英文)：Immunotherapeutic interventions with T cell-based approaches is targeting HER2. HER2-overexpressing tumors may escape cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis by down regulating MHC Class I. We explored expression of HER2, MHC Class I by immunohistochemistry and analyzed their correlation. We also explored the components of the signal transduction pathway that are involved in the regulation of MHC Class I expression using siRNAs targeting HER2 as well as an inhibitor of HER2 signaling. HER2 expression in breast cancers correlated inversely with MHC Class I expression. HER2 depletion by siRNAs resulted in MHC Class I up regulation. Moreover, MHC Class I expression on breast cancer cell lines was upregulated by inhibitor of mitogen-associated protein kinases, in a dose-dependent manner. Thus, agents that target the MAPK signaling pathway may increase MHC Class I expression in breast cancer cells.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：HER2 triple negative乳癌 MHC Class I T細胞 siRNA MAPK PD98059

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、癌組織中にわずかではあるが存在することが知られ、正常組織幹細胞と同様、自己複製能ならびに多分化能を有し正常組織幹細胞と同様、自己複製能ならびに多分化能を有し、分裂、増殖、分化することにより、通常の癌腫を形成するだけでなく、癌幹細胞の特徴を有したままであると、抗癌剤、放射線治療などの通常の癌腫に有効な治療法に対しても強い耐性を誘導、発現することが明らかとなっている。乳癌では、2003年、AL-HajjらがCD44+CD24-/lin という幹細胞表面マーカーの発現を乳癌組織で検討し、乳癌組織内に乳癌幹細胞が存在することを示した。また、乳癌は、初回手術後長期間を経て再発することが知られ、この機序として現在、乳癌幹細胞が関与するニッチという概念が確立している。2006年には、Asselinらが予後不良乳癌である triple negative 乳癌の癌組織の中に CD44+CD24-/lin の乳癌幹細胞が存在することを明らかにした。これらの事実から、triple negative 乳癌の発生、ならびに再発、そして化学療法に抵抗性であるということに乳癌幹細胞が大きく関与している可能性があると考えた。

また、2008年、Senduraiらは、癌の形態学的変化であり、癌の転移に必須のプロセスとされている上皮間質転換が癌細胞で生じると、癌幹細胞マーカーが発現し、癌幹細胞の性質を獲得することを明らかにしており、triple negative 乳癌の発生には上皮間質転換、さらにそれによって誘導される癌幹細胞の発生が、強く関与している可能性があると考えた。

一方、癌細胞内での抗癌剤の薬剤濃度が低下する機序として、ATP-binding cassette (ABC) super family が知られている。これはATP依存性に働く膜輸送蛋白で、本来、正常細胞では種々の低分子化合物を輸送し、その生理的機能を制御し、生存に不可欠な機能を有することが示されているが、癌細胞では特に P glycoprotein などがこの癌における多剤耐性機構に関与していることが明らかになっている。2003年、Frankらが正常表皮メラニン細胞で新しいABC transporterであるABC5を発見し、さらに2005年にはABC5が malignant melanoma でドキシソルピシン耐性に関与していることを報告した。また、2008年、SchattonらはABC5が malignant melanoma の癌幹細胞のマーカーとなることを報告した。これらの事実から、癌細胞の多剤耐性機構にこの癌細胞から癌幹細胞への形質転換が強く関与していると考えた。

さらに、近年、triple negative 乳癌がBRCA1などDNA修復酵素に異常のある群、basal marker 陽性の群、癌幹細胞が豊富で間葉系マーカーが陽性の群に分類されることが明らかとなり、いわゆる triple

negative 乳癌をさらに分類して検討することが必要と考えた。

2. 研究の目的

近年、乳癌においても癌幹細胞の存在が明らかになった。一方、癌細胞に上皮間質転換が生じると、癌細胞が癌幹細胞に形質転換する可能性が示唆されている。また、癌幹細胞は、分裂、増殖、分化することにより、通常の癌腫を形成するだけでなく、癌幹細胞の特徴を有したままであると、抗癌剤、放射線治療などの通常の癌腫に有効な治療法に対しても強い耐性を誘導、発現することが明らかとなっている。

本研究の目的は、薬物療法が効きにくく、有効な治療法のない予後不良なHER2陰性、estrogen receptor (ER)陰性、progesteron receptor (PgR)陰性のいわゆる triple negative 乳癌を basal-like と claudin-low に分類し、そのうえで各々のサブタイプと乳癌幹細胞との関係ならびに上皮間質転換の関与を明らかにし、一括して治療抵抗性がいられている、いわゆる triple negative 乳癌をサブタイプ別に検索し新規治療法を確立することにある。

3. 研究の方法

- (1) 従来の乳癌における遺伝子発現プロファイリングに加えて、乳癌幹細胞マーカー発現の解析による乳癌の分類を行った。

凍結保存されていた乳癌手術検体 3200例あまり(うち triple negative 乳癌約 400例)のうち、初回手術より10年以上経過し予後が判明している 1200例(うち triple negative 乳癌約 150例)を対象に、従来の遺伝子発現プロファイリングで分類するために、Estrogen receptor(ER)、progesterone receptor (PgR)、HER2(FISHも施行)、Ki-67、CK5/6、CX17、p53を免疫染色し分類した。

により分類された各々の群で、上皮間質転換が認められるか否かを検索するために、抗 EMT 抗体で免疫染色し解析した。

により分類された各々の群で、癌幹細胞マーカーが発現しているか否かを、CD44、CD24、ALDH1の免疫染色により解析した。特に triple negative 乳癌約 150例に関しては、上皮間質転換が認められない症例であっても、basal-like と claudin-low というその亜分類を試みるため、全例に施行した。

遺伝子発現プロファイリングによる分類と、上皮間質転換の有無と癌幹細胞マ

ーカーとの関連を解析し、いわゆる triple negative 乳癌を basal-like と癌幹細胞マーカーが陽性である可能性がある群に分類し。その場合には、新たな亜系を設定し研究を展開する。

これらの群と各種臨床病理学的因子ならびに予後と従来の遺伝子プロファイリング、上皮間質転換の有無と癌幹細胞マーカーの関連を解析した。

- (2) 分類ごとの乳癌細胞株の樹立
樹立した各プロファイルを持った細胞株に乳癌幹細胞が存在するか否か、上皮間質転換がみられるか否か、ならびに side population が存在するか否かを、各樹立細胞株の増殖能を in vitro、in vivo で検討し、浸潤能を Matrigel invasion assay により検討した。

各樹立細胞株で、現在までに報告されている分子標的の遺伝子変異を解析した。また、乳癌に高頻度に発現し、その浸潤転移能に関与するといわれているムチンコア蛋白である MUC の発現についても解析した。

樹立細胞株で、現在乳癌薬物療法として使用されている薬剤の感受性を解析するため、分子生物学的解析により明らかとなった分子標的に対して現在開発されている分子標的治療薬が有効であるか否かを検討した。

4. 研究成果

Progesterone receptor (PgR) 陰性、estrogen receptor (ER) 陰性、HER2 陰性のいわゆる triple negative 乳癌を DNA 修復酵素に異常のある群、basal marker 陽性の群、間葉系マーカーが陽性の群に分類することが本研究の目的である。本研究では、当科で採取した乳癌新鮮標本検体を対照に triple negative 乳癌のスクリーニングを施行した。スクリーニングの方法は PgR、ER、HER2 の免疫染色を施行、さらにその増殖能と悪性度の検索のために Ki-67、CK5/6、CK17、p53 の免疫染色も同時に施行した。増殖能と悪性度は Luminal Type 別に分類した。その結果 Luminal Type A が最も多く、次いで HER2 陽性の Luminal Type B、HER2 陰性の Luminal Type B が同数で、いわゆる triple negative 乳癌の頻度は最も少なかった。本研究ではこれらの分類を確実に施行することが最も重要であると考えられたために、一部の検体では、HER2 の発現を確認するため fluorescence in situ hybridization、(FISH) も施行した。

これらの分類に基づき、さらに HER2 enriched、basal like、claudin-low を分類した。

続いてこれらの分類別に上皮間葉転換 (EMT : epithelial mesenchymal transition/epithelial to mesenchymal transition) の有無を検索するために、抗 EMT 抗体の免疫染色を施行した。いずれの検体でも抗 EMT 抗体では染色されず。抗原暴露の条件、反応温度、反応時間等の設定を種々検討したが、染色されず、乳癌では上皮間葉転換が生じていない可能性があるとも考えられるが、いずれの対象検体も病期が早期で悪性度は決して高くないことから、さらに進行した病期で上皮間葉転換が生じている可能性があり進行癌で検討する必要があると考えた。

本研究申請期間中の乳癌手術症例は 208 例であり、そのうち HER2 陰性、エストロゲンレセプター陰性、プロゲステロンレセプター陰性の triple negative 乳癌は 21 例 11% であった。一方、HER2 が過剰発現している症例は 49 例 24% であった。HER2 は乳癌の分子標的治療薬の標的であるとともに、T 細胞をベースとした免疫学的治療のターゲットでもある。

研究代表者は、すでに HER2 の過剰発現のみられる癌腫は、MHC Class を down regulate することにより T 細胞による殺細胞効果から免疫逃避することを明らかにしている。乳癌における HER2 発現に関して免疫治療の可能性に関して研究を展開した。すなわち、乳癌における HER2 の発現と MHC Class の発現との関係ならびに、MHC Class が HER2 の発現により down regulation されるその基本的な機序について検討した。検討項目は、HER2、MHC Class の発現の程度を免疫染色科学的に評価し、それぞれの因子の関係を解析した (図 1)。

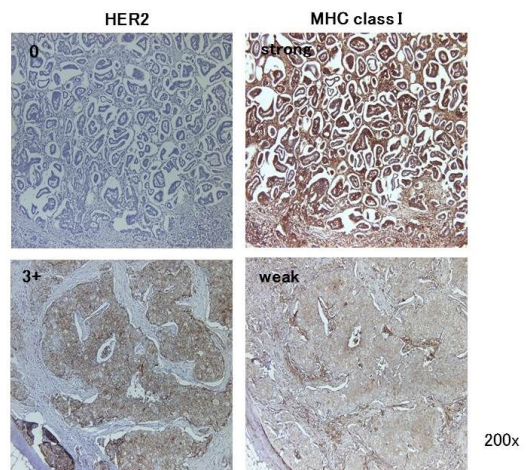


図 1

また、MHC Class の発現を制御するシグナル伝達経路を解明するために HER2 の inhibitor として siRNA を使用した。結果として、乳癌では HER2 の発現は MHC Class の発現と逆相関し (図 2) さらに、

siRNA により HER2 の発現を抑制すると、MHC Class I の発現は upregulate された。

Correlation between HER2 and MHC class I

	MHC class I	
	Weak (~70%)	Strong (71%~)
HercepTest 0, 1+	30	18
HercepTest 2+, 3+	20	2

p = 0.031 by chi-square test

図 2

また、乳癌細胞株で MAPK の抑制薬である PD98059 の投与により MHC Class I の発現が upregulate されたことから、MAPK シグナル伝達経路をブロックすることにより乳癌細胞の MHC Class I の発現を増強することを明らかにした。この結果は、MHC Class I の発現を upregulate することで免疫治療を有効にすることが可能となり triple negative 乳癌の新規治療法となり得ることを示した。

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)

Shiraishi K, Mimura K, Izawa S, Inoue A, Shiba S, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Inoue M, Fujii H, Kono K. Lapatinib acts on gastric cancer through both antiproliferative function and augmentation of trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Gastric Cancer*. 16(4):571-80. (査読有) 2013 (DOI: 10.1007/s10120-012-0219-5)

井上慎吾、井上亜矢子、丸山孝教、井上正之、藤井秀樹、原田和俊、金丸明美、藤原沙耶花、渡辺宏恵、花輪和巳：他職種の協力のもと通常治療にまで導入できた進行乳癌の 1 例。山梨医学(査読有)2013 41 : 4-7

[学会発表](計 3 件)

井上正行、井上慎吾、大森征人、井上亜矢子、川崎朋範、松田 啓、藤井秀樹：乳癌細胞における MHC Class1 発現は HER2 発現と逆相関する、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2014.7.10~7.12、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

井上亜矢子、井上慎吾、井上正行、大森征人、丸山孝教、中澤匡男、藤井秀樹：術前化学療法施行例における乳房内残存病変と残存リンパ節病変の検討、第 22

回日本乳癌学会学術総会、2014.7.10~7.12、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

井上慎吾、大森征人、井上亜矢子、井上正行、藤井秀樹、石黒浩毅、中込さと子、久保田健夫：乳癌外科医の遺伝医療への貢献、第 40 回山梨総合医学会、2014.3.9、流通会館(山梨県中央市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 亜矢子 (INOUE, Ayako)
山梨大学・総合研究部・病院助教
研究者番号：60570265