

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460627

研究課題名(和文) 乳癌および肺癌におけるTYRO3を標的とする治療法開発の妥当性の検討

研究課題名(英文) Evaluation of TYRO3 as a therapeutic target in breast and lung cancers

研究代表者

南 博信 (Minami, Hironobu)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60450574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TYRO3とGas6の発現をRNA in situ hybridizationで検討したところ、発現はluminal A乳癌でみられ、luminal B乳癌ではみられなかった。HER2陽性乳癌では発現がみられないか、みられても弱く、Triple negativeでは発現はみられなかった。これは我々が先行研究で立てたTYRO3発現抑制が乳癌の治療戦略になるという仮説を支持するものであった。肺癌でもTYRO3は一部の腺癌に高発現していた。なお、臨床病理学的特徴のうち上皮成長因子受容体の変異やALK融合遺伝子との関連は示唆されなかった。

研究成果の概要(英文)：The expression of TYRO3 and Gas6 was investigated using RNA in situ hybridization in clinical tumor samples of breast and lung cancers. Both TYRO3 and Gas6 was highly expressed in luminal A breast cancer cells, but not in luminal B type or triple negative breast cancer. HER2-positive breast cancer expressed no or weak expression. These results support our hypothesis that inhibition of TYRO3 can be a therapeutic strategy for hormone receptor-positive breast cancer. TYRO3 was expressed in some of lung cancers, but no apparent relationship was observed between the expression of TYRO3 and EGFR mutations or ALK status.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：乳癌 肺癌 TYRO3 Gas6

### 1.1. 研究開始当初の背景

IGF-1 受容体阻害薬の耐性乳癌細胞株では TYRO3 のリン酸化が亢進していた。TYRO3 は治療標的としては注目されていなかったが、siRNA を用いて TYRO3 の発現を低下させたところ耐性株のみならず親株でも増殖が抑制された。そこで、さらに多くの各種乳癌細胞株で検討した。すなわち、エストロゲン受容体を発現し HER2 が増幅していない luminal-type の 4 つの乳癌細胞株、エストロゲン受容体陰性で HER2 が増幅している HER2-type の 2 つの乳癌細胞株、およびエストロゲン受容体が陰性で HER2 が増幅していない triple negative-type の 2 つの乳癌細胞株で siRNA により TYRO3 をノックダウンし、増殖に対する影響を検討した。その結果、luminal-type の 4 つの細胞株(MCF-7、T47D、CAMA-1、HCC-1428)において TYRO3 の発現抑制により顕著な増殖抑制が観察された。一方、HER2-type では中等度に増殖が抑制され、triple negative-type ではほとんど増殖抑制がみられなかった。また luminal type での増殖抑制効果はエストロゲンの存在にかかわらずみられたことからエストロゲンによる増殖刺激経路とは独立した役割を果たしていた。

さらに TYRO3 の下流のシグナルを検討したところ、増殖抑制が観察された luminal-type の細胞株で、ERK1/2、S6K や STAT3、cyclin D1 のリン酸化も低下していた。一方、増殖抑制がかからなかった細胞株ではこれらのリン酸化の低下は見られなかった。これらの事実より、TYRO3 が IGF-1 受容体阻害薬の耐性克服のみならず、TYRO3 陽性乳がんの治療標的となる可能性が高いと考えた。

多数例の乳癌手術症例で TYRO3 の発現が解析できれば、TYRO3 の予後因子としての意義が検討可能となる。TYRO3 を発現している乳癌が予後不良であれば、我々が目指している TYRO3 を標的とする治療法開発の妥当性が支持される。また、TYRO3 を指標として術後補助療法の個別化が可能となる。すなわち、TYRO3 が予後不良因子であれば、手術標本で TYRO3 が発現していれば術後補助療法を強化したり、逆に TYRO3 が予後良好因子であれば補助療法を簡略化することが可能となる。乳がん細胞株を用いた我々の研究で TYRO3 はエストロゲン受容体陽性乳癌で高発現している。エストロゲン受容体陽性乳がんは一般的に予後良好であり、現在は化学療法を省略する傾向にある。本研究でエストロゲン受容体陽性乳癌でも TYRO3 が発現している場合は予後不良であることが判明すれば、乳がん患者の術後治療に与える影響は大きい。

### 2. 研究の目的

本研究では乳がんにおける TYRO3 の臨床的意義を明らかにする目的で、乳がんの手術標本における TYRO3 および関連分子とくりにリガンドとなる Gas6 の発現状態を検討し、

臨床病理学的特徴との相関を検討する。最終的には TYRO3 の発現が乳がんの予後因子となる可能性を見当する。

また、肺がん細胞株でも TYRO3 が発現しているという基礎研究の報告があるが、治療標的としての可能性は検討されていない。そこで肺癌の手術標本においても TYRO3 の発現状況を検討する。

### 3. 研究の方法

乳癌細胞株を用いた今までの我々の研究において、特にエストロゲン受容体陽性の細胞株において TYRO3 をノックダウンすると増殖を抑制することが示された。また HER2 陽性乳癌細胞株でもエストロゲン受容体陽性細胞株ほどではないが増殖が抑制されることが示唆された。これは TYRO3 の発現あるいは機能を阻害する戦略が乳がんに対する有望な治療方法となることを示唆する。

本研究では、乳癌手術検体を用いて乳癌細胞における TYRO3 の発現の有無を検討し、臨床病理学的特徴との関連を検討した。具体的には、根治的目的で乳がんの切除手術を受けた患者の腫瘍細胞で TYRO3 の発現を RNA in situ hybridization (ISH) 技術を用いた RNAscope を用いて検討した。この方法では免疫組織染色用の抗体を作成する必要がなく、RNA を 1 コピーから検出可能で、ターゲット遺伝子の細胞内局在が検証可能である。免疫組織染色(IHC)と比べてこの方法ではバックグラウンドのシグナルが低いと、より詳細な検討が期待できる。また、プローブを変えることにより TYRO3 のみならず TYRO3 のリガンドである Gas6 の発現も同時に解析した。本研究期間中に TYRO3 および Gas6 のプローブが開発されたのでそれを利用した。

手術症例における各種臨床・病理学的情報も収集して、乳癌における TYRO3 の発現と臨床病理学的特徴との関連を検討した。

肺癌の臨床検体における TYRO3 の発現の意義を検討するために、根治的手術を施行した肺癌においても乳がんと同様に RNAscope を用いて TYRO3 の発現を検討した。その際、各種臨床病理学的情報も収集し TYRO3 発現との関連を検討した。

### 4. 研究成果

本研究では乳癌における TYRO3 の臨床的意義を明確にするため、乳癌の手術検体で TYRO3 発現を RNA in situ hybridization (ISH) 技術を用いた RNAscope を用いて検討した。加えて TYRO3 関連分子である Gas6 の発現も検討した。現在までに乳癌 5 例で解析を終了し、luminal A では腫瘍細胞に TYRO3 と Gas6 のいずれもが発現していた。一方、luminal B では発現がみられなかった。HER2 陽性乳癌の 2 例のうち 1 例では発現がみられず、もう 1 例では TYRO3 も Gas6 も発現していたが luminal A に比べると発現は弱かった。Triple negative では腫瘍細胞には発現はみられな

った。この結果は我々が先行研究で明らかにした乳癌細胞株における TYRO3 発現抑制による増殖抑制効果が luminal type で顕著であり HER2 type では弱かったことと合致する所見であり、我々の仮説を裏付けるものであった。

加えて肺がんでも TYRO3 の発現を予備的に解析し、肺腺癌 6 例中 2 例で TYRO3 が高発現し、さらに 1 例で弱いながらも発現していることを見出した。これは肺癌でも TYRO3 抑制効果を今後検討する研究に発展するものである。なお、臨床病理学的特徴のうち上皮成長因子受容体の変異や ALK 融合遺伝子との関連も予備的に検討したが、明らかな関連は示唆されなかった。

## 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 4 1 件)

Seruga B, Sadikov A, Cazap EL, Delgado LB, Digumarti RR, Leigh NB, Meshref MM, Minami H, Robinson E, Yamaguchi NH, Pyle D, Cufer T. Barriers and challenges to global clinical cancer research. *Oncologist*, 査読有、19(1):61-7, 2014

Ekyalongo RC, Mukohara T, Funakoshi Y, Tomioka H, Kataoka Y, Shimono Y, Chayahara n, Toyada M, Kiyota N, Minami H. TYRO3 as a potential therapeutic target in breast cancer. *Anticancer Res*, 査読有、34 (7); 3337-45, 2014

Tanioka M, Sasaki M, Shimomura A, Fujishima M, Doi M, Matsuura K, Sakuma T, Yoshimura K, Saeki T, Ohara M, Tsurutani J, Watatani M, Takano T, Kawabata H, Mukai H, Naito Y, Hirokaga K, Takao S, Minami H. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy in HER2-overexpressing breast cancer according to hormonal receptor status. *Breast*, 査読有、23 (4); 466-72, 2014

Yamaguchi Y, Yamaue H, Okusaka T, Okuno K, Suzuki H, Fujioka T, Ohtsh A, Ohashi Y, Shimazawa R, Nishio K, Furuse J, Minami H, Tsunoda T, Hayashi Y, Nakamura Y. Guidance for peptide vaccines for the treatment of cancer, the Japanese Society for Biological Therapy. *Cancer Sci*, 査読有、105 (7); 924-31, 2014

Fujiwara Y, Kobayashi T, Chayahara N, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Mukohara T, Nishiumi S, Azuma T, Yoshida M, Minami H. Metabolomics

evaluation of serum markers for cachexia and their intra-day variation in patients with advanced pancreatic cancer. *PLOS One*, 査読有、Published on line Nov 20, 2014 (doi: 10.1371/journal.pone.0113259)

Tanioka M, Sakai K, Sudo T, Sakuma T, Kajimoto K, Hirokaga K, Takao S, Negoro S, Minami H, Nakagawa K, Nishio K. Transcriptional *CCND1* expression as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab in HER2-positive/ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 査読有、147 (3); 513-25, 2014

Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*, 査読有、33(4); 1837-43, 2015

Inui Y, Matsuoka H, Yakushijin K, Okamura A, Shimada T, Yano S, Takeuchi Mai, Ito M, Murayama T, Yamamoto K, Itoh T, Aiba K, Minami H. Methotrexate-associated

lymphoproliferative disorders: management by watchful waiting and observation of early lymphocyte recovery after methotrexate withdrawal. *Leukemia Lymphoma*, 査読有、56(11); 3045-51, 2015

Shimono Y, Mukoyama J, Nakamura S, Minami H. MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. *J Clin Med*, 査読有、5(1); pii: E2, 2015 Dec 25

Funakoshi Y, Fujiwara Y, Kiyota N, Mukohara T, Shimada T, Toyoda M, Imamura Y, Chayahara N, Tomioka H, Umezumi M, Otsuki N, Nibu K, Minami H. Validity of new methods to evaluate renal function in cancer patients treated with cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 査読有、77; 281-288, 2016 (DOI: 10.1007/s00280-016-2966-1)

Sawada T, Watanabe M, Fujimura Y, Yagishita S, Yashita S, Shimoyama T, Maeda Y, Kanda S, Yunokawa M, Tamura K, Tamura T, Minami H, Koh Y, Koizumi F. Sensitive cytometry based system for enumeration, capture and analysis of gene mutations of circulating tumor cells. *Cancer Sci*, 査読有、107(3); 307-14, 2016 (DOI: 10.1111/cas.12868)

Nishimura M, Toyoda M, Tkenaka K,

Imamura Y, Chayahara N, Kiyota N, Mukohara T, Kotake T, Tsuji A, Saito K, Saito Y, Minami H. The combination of *HLA-B\*15:01* and *DRB1\*15:01* is associated with gemcitabine plus erlotinib-induced interstitial lung disease in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有、77; 1165-71, 2016

Mukohyama J, Iwakiri D, Zen Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y, Shimono Y. Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens. *Oncotarget*. 査読有、(e-pub 2016)

Minami H, Ando Y, Ma BBY, Lee J-H, Momota H, Fujiwara Y, Li L, Fukino K, Ito K, Tajima T, Mori A, Lin C-C. A phase 1, multicenter, open-label, 2-group, parallel, dose-escalation study of oral sonidegib in Asian patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci*. 査読有、107(10); 1477-83, 2016

Miyata Y, Yakushijin K, Inui Y, Imamura Y, Goto H, Mizutani Y, Kurata K, Kakiuchi S, Sanada Y, Minami Y, Kawamoto S, Yamamoto K, Ito M, Tominaga R, Gomyo H, Mizuno I, Nomura T, Kitagawa K, Sugimoto T, Murayama T, Matsuoka H, Minami H. A prospective study of the antiemetic effect of palonosetron in malignant lymphoma patients treated with the CHOP regimen. *Int J Hematol*. 査読有、104(6); 682-691, 2016

Sawada T, Araki J, Yamashita T, Masubuchi M, Chiyoda T, Yunokawa M, Hoshi K, Tao S, Yamamura S, Yatsushiro S, Abe K, Kataoka M, Shimoyama T, Maeda Y, Kuroi K, Tamura K, Sawazumi T, Minami H, Suda Y, Koizumi F. Prognostic impact of circulating tumor cell detected using a novel fluidic cell microarray chip system in patients with breast cancer. *EBioMedicine*. 査読有、11; 173-182, 2016. (DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.07.027)

[学会発表](計 9 件)

Tanioka M, Sakai K, Sudo T, Sakuma T, Hirokaga K, Takao S, Minami H, Negoro S, Nakagawa K, Nishio K. Transcriptional expression of Bcl-2 as predictive of response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab in HER2-positive ER-positive breast cancer patients. *Am Soc Clin Oncol* 2014 (Abst #602)

Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Am Assoc Cancer Res* 2015 (Abst# 319), Philadelphia

Ottmann OG, Alimena G, DeAngelo DJ, Goh Y-T, Heinrich MC, Hochhaus A, Hughes TP, Mahon F-X, Mauro ML, Minami H, Nguyen MH, Rea D, Steegmann JL, Chatterjee A, Iyer V, Martinez N, Vanasse GJ, Dong-Wook K. ABL001, a Potent, Allosteric Inhibitor of BCR-ABL, exhibits safety and promising single-agent activity in a phase I study of patients with CML with failure of prior TKI therapy. *Am Soc Hematol* 2015, Orland (Abst #138)

Kakiuchi S, Minami Y, Fukushima N, Matsuoka H, Naoe T, Minami H. Biomarker and gene profiling analyses in acute myeloid leukemia during treatment with hedgehog signaling inhibitor. *Am Soc Hematol* 2015, Orland (Abst #1263)

Nishimura M, Aikawa H, Hayashi M, Mizutani Y, Takenaka K, Imamura Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Mukohara T, Hamada A, Minami H. Quantitative mass spectrometry imaging of erlotinib in skin rashed of cancer patients receiving erlotinib. *Am Assoc Cancer Res* 2017, Washington DC

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 博信 (MINAMI, Hironobu)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60450574

### (2) 研究分担者

高尾 信太郎 (TAKAO, Shintaro)  
神戸大学・大学院医学研究科・客員教授  
研究者番号：10717218

眞庭 謙昌 (MANIWA, Yoshimasa)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50362778

伊藤 智雄 (ITO, Tomoo)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20301880