

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461957

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌におけるEカドヘリン発現の分子機構の解明および臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical significance and molecular mechanism elucidation of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer

研究代表者

柏木 伸一郎(Kashiwagi, Shinichiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80637017

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)：申請者らは、本研究のテーマである“トリプルネガティブ乳癌(TNBC)におけるE-cadherin発現の分子機構の解明および臨床的意義”について上皮間葉移行(EMT)や腫瘍免疫、内分泌感受性の側面から探究をすすめ、国内外に発信してきた。そして実臨床への応用可能なTNBCの新たな治療戦略の構築を目的とした基礎研究・臨床研究を推進している。近年の基礎研究により、TNBCは遺伝子発現プロファイルによりさらに7種類のサブタイプに分類されることが示されている。申請者らはEMTが関与するMタイプやMSLタイプ、LARタイプを検証し、新たな個別化治療の可能性について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Triple-negative breast cancer (TNBC), a subtype of breast cancer that is estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative, has a poor prognosis. Recent research indicates that TNBC can be categorized into seven specific subcategories based on genetic expression profiles. In this study, we showed the possibility of a new therapeutic strategy for TNBC.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 個別化治療 上皮間葉転換 E-cadherin

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は多様性をもつ疾患であり、分子生物学的手法により異なる特徴を有する複数のサブタイプに分類される。“intrinsic subtype”と呼ばれる mRNA 発現プロファイルによれば、乳癌は luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, normal-like と 5 型に亜分類される。basal-like type は、estrogen receptor (ER) 陰性, progesterone receptor (PgR) 陰性, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 陰性のトリプルネガティブ乳癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) とほぼ一致している。TNBC は、ホルモン療法や抗 HER2 療法が無効で化学療法のみが治療法とされ、また生物学的悪性度の高いことから難治性乳癌である。申請者は TNBC に特異的な遺伝子変異、微小環境における変化、癌幹細胞への関与を研究し、その生物学的特性にもとづいた有効な薬剤の開発を目的としたトランスレーショナルリサーチをすすめている (Kashiwagi S, et al. *Br J Surg* 100(4): 490-496, 2013)。

(2) 細胞-細胞接着分子の一つである E-cadherin は癌細胞の浸潤・リンパ節転移・遠隔転移などに関連していると報告されており、E-cadherin 発現の低下は予後不良の指標であると考えられている。また、E-cadherin 陰性の浸潤性乳管癌は陽性例と比べて予後不良であるとされているが、TNBC との関係を示唆した報告は未だ少ない。TNBC は予後不良のタイプと良好なタイプが存在するために、TNBC にはさらに細かい亜分類が存在するものといわれている。これまでに申請者は、E-cadherin の発現低下が浸潤性小葉癌を除外した TNBC の独立した予後不良因子であり、TNBC の亜分類に有用なバイオマーカーであることを明らかにした (Kashiwagi S, et al. *Br J Cancer* 103; 249-255, 2010)。TNBC は non-TNBC と同様に化学療法が奏効する例が

みられる一方で奏効しない例を多く含み、しばしば治療に苦慮する。申請者は TNBC の化学療法感受性を予測し得るバイオマーカーとして E-cadherin が有用であればその臨床的意義は大きいと考え、術前・術後補助化学療法の効果予測因子としての有用性の検討を行った。術後化学療法を行った TNBC において、E-cadherin の発現の有無により有意な予後の相違を認めた。E-cadherin 発現のある症例ではたとえ予後不良の TNBC であっても術後化学療法により予後の改善が期待される。しかしながら E-cadherin 発現低下のある TNBC においては、術後化学療法の感受性は不良であった。これらの結果より、TNBC の E-cadherin 発現は術後化学療法の感受性マーカーになることが示唆された (Kashiwagi S, et al. 101th AACR #2708, 2010)。

(3) 一方、Ki-67 は種々の腫瘍において、分化度や脈管侵襲およびリンパ節転移といった腫瘍の悪性度や予後と相関することが知られており、細胞増殖マーカーとして有用であるとされている。Ki67 は乳癌における化学療法感受性マーカーとしての有用性の報告はあるものの、TNBC との関連についての報告は少ない。化学療法を受けた TNBC において Ki67 陽性/E-cadherin 陰性は対称群に比し有意に予後不良であった。化学療法非施行では Ki67 陽性/E-cadherin 陰性の発現と予後との相関は認めなかった。換言すれば、化学療法非施行群における Ki67 陰性または E-cadherin 陽性群について術後化学療法を施行していれば予後の改善が期待できた可能性がある。術後化学療法を受けた TNBC において、Ki67 陽性/E-cadherin 陰性であることは独立した予後因子であった。一方で、手術療法単独群では同様ではなかった (Kashiwagi S, et al. *Breast Cancer Res* 30; 13 (6): R122, 2011)。さらに、TNBC における術前化学療法の治療効果予測因子としての E-cadherin 発現の有用性

を検討した．E-cadherin 発現のある TNBC は完全奏功 (pCR) が有意に高率であることより，TNBC の術前化学療法における治療効果予測因子として E-cadherin の有用性を明らかにした (Kashiwagi S, et al. 47th ASCO #1077, 2011) ．

(4) これらの結果により，TNBC の術前・術後化学療法感受性を予測し得るバイオマーカーとして E-cadherin が有用であることが示唆された．本研究により TNBC に対する化学療法の新たな治療戦略を臨床応用することが可能であると考えられる．今後，E-cadherin 陰性の TNBC について分子標的治療を視野に検討していくとともに，その分子機構の更なる解明を図る必要がある．

2．研究の目的

(1) 近年，乳癌においては ER, PgR, HER2 の発現状況などからホルモン療法や分子標的療法などが選択されている．ER, PgR, HER2 が陰性であるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) では明らかなターゲットがなく治療法はいまだ確立されていない．

(2) 申請者はこれまでに TNBC の化学療法感受性を予測し得るバイオマーカーとして E-cadherin が有用であることを明らかにしてきた．本研究は E-cadherin の発現の有無により TNBC を細分類し，メチル化解析やプロテオーム解析などをすすめる分子機構の解明を図り，治療抵抗性と考えられる E-cadherin 陰性症例をターゲットとした治療の探索と検証を目的とするものである．

3．研究の方法

(1) 本研究では 2000 年から 2006 年に大阪市立大学病院および大阪市立総合医療センターにて手術を行った原発性浸潤性乳管癌 1036 例および 2004 年から 2010 年に術前補助

化学療法を行った 130 例を合わせた 1166 例の症例を対象としている．術後補助化学療法を行った TNBC 190 検体と術前補助化学療法を施行した TNBC 39 検体から DNA を抽出し，その遺伝子変異やメチル化解析を行う．さらにプロテオーム解析を行い，E-cadherin の関与を検証する．

(2) 細胞株を用いた実験としては，所属する研究室で樹立した TNBC 細胞株 OCUB-2，および MDA-MB 231 を TNBC 細胞株として使用する．non-TNBC 細胞株としては，所属する研究室で樹立した HER2 陽性細胞株 OCUB-1，および MCF-7 を使用する．

4．研究成果

(1) TNBC の 7 種類の molecular subtype において，申請者の教室ではこれまでに EMT が関与する mesenchymal (M) サブタイプや mesenchymal-stem like (MSL) サブタイプ (*Br J Cancer* 103; 249-255, 2010)(*Breast Cancer Res* 30; 13 (6): R122, 2011)(*Br J Surg* 100:490-496,2013)，また AR 高発現の認められる LAR タイプなどの検証を行い(39th *ESMO* #175P, 2014) これらのサブタイプに対する個別化治療の可能性について明らかにしてきた (*Br J Cancer* 103: 249-55, 2016)(*Ann Oncol* 25: v44-v74, 2014) (*Cancers* 9(1);4, 2017)．さらに去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の原因として指摘されている AR splice variant-7 (AR-V7) が，乳癌化学療法においても薬剤感受性に影響を及ぼす可能性についても報告した (106th *AACR* #3939, 2016) ．

(2) 同時に分子生物学的アプローチにより，EMT を介した TNBC の悪性形質獲得の検証をすすめている．EMT の制御に関わる

micro-RNA (miR) 200b を Lentiviral miRNA Expression Vector を用いて TNBC 細胞株に transfection させ , 安定細胞株である micro-RNA 200b 強制発現 TNBC 細胞株 (miR200b MDA-MB-231) を樹立した . また , Lipofectamine® 3000 Reagent を用いて E-cadherin-GFP Plasmid Vector にて E-cadherin 強制発現 TNBC 細胞株 (E-cadherin MDA-MB-231) を樹立し , これらの細胞株を EMT 抑制モデルとして親株との比較検証をすすめたところ , EMT 抑制モデルは luminal タイプに類似した細胞特性を有していた . さらに同様の手法を用いて , pEGFP-C1-AR Plasmid Vector を導入した AR 強制発現 TNBC 細胞株 (AR MDA-MB-231) を作成したところ , AR MDA-MB-231 は内分泌療法やホルモン受容体陽性乳癌に対する新たな分子標的薬として期待されている palbociclib (CDK4/6 阻害剤) に感受性を有しており , これらの TNBC サブタイプに対する新たな治療戦略の可能性を明らかにした (*AACR #2343, 2017*) .

(3) さらに申請者らは , 免疫活性が高いとされるサブタイプである TNBC と腫瘍免疫応答の関与を検証すべく , TILs やそのサブセット解析 (PD-1, CD8, FOXP3, LAG-3, TIM-3, OX-40 など) の探索をすすめている (*SABCS #P3-07-33, 2015*) (*AACR #1412, 2016*) (*PLoS ONE 12(2):e0170634, 2017*) . そして TNBC に対する術前化学療法では , PD-L1, LAG-3 発現や CD8/FOXP3 比率によって治療効果が予測し得る可能性を示した (*Br J Surg 103:845-854,2016*) (*SABCS #P4-04-14, 2015*) . また臨床的観点より , 担癌患者における炎症性マーカーによる治療効果予測についても検証し , 好中球・リンパ球比 (NLR) , 血小板・リンパ球比 (PLR) やリンパ球・単球比 (LMR) の有用性を明らかにした (*Ann Surg Oncol 23(4):1104-1110, 2016*) (*PLoS ONE 11(7):e0153459, 2016*) .

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 15 件)

Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K, Takahashi K, Noda S, Takashima T, Onoda N, Tomita S, Ohsawa M, Hirakawa K, Ohira M, Use of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to predict the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer, *PLoS One*, 査読有, 2017, 12(2):e0170634
DOI:10.1371/journal.pone.0170634

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Tanaka S, Morisaki T, Takashima T, Noda S, Onoda N, Ohsawa M, Hirakawa K, Ohira M, Expression and clinical significance of androgen receptor in triple-negative breast cancer, *Cancers*, 査読有, 2017, 9(1);4
DOI:10.3990/cancers9010004

Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Takahashi K, Hatano T, Takashima T, Tomita S, Motomura H, Ohsawa M, Hirakawa K, Ohira M, Circulating tumor cell clusters-associated gene plakoglobin is a significant prognostic predictor in patients with breast cancer. *Biomarker Res*, 査読有, 2017, 5:19
DOI: 10.1186/s40364-017-0099-2

Sera T, Kashiwagi S, Takashima T, Asano Y, Goto W, Iimori N, Noda S, Onoda N, Ohsawa M, Hirakawa K, Ohira M, A case of multiple metastatic malignant phyllodes tumor of the breast with tonsillar metastasis, *BMC Res Notes*, 査読有, 2017, 10(1):55
DOI:10.1186/s13104-017-2375-5

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Kurata K, Noda S, Takashima T, Onoda N, Tanaka S, Ohsawa M, Hirakawa K, Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in

predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer, *Br J Surg*, 査読有, 2016, 103:845-854
DOI:10.1002/bjs.10127

Asano Y, [Kashiwagi S](#), Onoda N, Kurata K, Morisaki T, Noda S, [Takashima T](#), Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K, Clinical verification of sensitivity to preoperative chemotherapy in cases of androgen receptor-expressing positive breast cancer, *Br J Cancer*, 査読有, 2016, 114(1):14-20
DOI:10.1038/bjc.2015.434

Asano Y, [Kashiwagi S](#), Onoda N, Noda S, Kawajiri H, [Takashima T](#), Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K. Predictive Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Efficacy of Preoperative Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer, *Ann Surg Oncol*, 査読有, 2016, 23(4):1104-1110
DOI:10.1245/s10434-015-4943-0

Asano Y, [Kashiwagi S](#), Onoda N, Noda S, Kawajiri H, [Takashima T](#), Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K, Platelet-lymphocyte ratio as a useful predictor of the therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, *PLoS One*, 査読有, 2016, 11(7):e0153459
DOI:10.1371/journal.pone.0153459

[Takashima T](#), Tokunaga S, Tei S, Nishimura S, Kawajiri H, [Kashiwagi S](#), Yamagata S, Noda S, Nishimori T, Mizuyama Y, Sunami T, Tezuka K, Ikeda K, Ogawa Y, Onoda N, Ishikawa T, Kudoh S, Takada M, Hirakawa K, A phase II, multicenter, single-arm trial of eribulin as first-line chemotherapy for HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer, *SpringerPlus*, 査読有, 2016, 5:164
DOI: 10.1186/s40064-016-1833-1

Kurata K, Onoda N, Noda S, [Kashiwagi S](#), Asano Y, Hirakawa K, [Ohira M](#), Growth arrest by activated BRAF and MEK inhibition in human anaplastic thyroid cancer cells, *Int J Oncol*, 査読有, 2016, 49: 2303-2308
DOI: 10.3892/ijo.2016.3723

[Kashiwagi S](#), Amano R, Onoda N, Noda S, Hirata K, Asano Y, Kurata K, Miura K, Yamazoe S, Kimura K, Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K, Nonfunctional adrenocortical carcinoma initially presenting as retroperitoneal hemorrhage, *BMC Surg*, 査読有, 2015, 15:46
DOI:
[Kashiwagi S](#), Onoda N, Asano Y, Kurata K, Noda S, Kawajiri H, [Takashima T](#), Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K, Ambulatory sentinel lymph node biopsy preceding neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer: a preliminary study, *World J Surg Oncol*, 査読有, 2015, 13:53
DOI: 10.1186/s12957-015-0471-3

[Kashiwagi S](#), Amano R, Onoda N, Noda S, Hirata K, Asano Y, Kurata K, Miura K, Yamazoe S, Kimura K, Ohsawa M, Kitagawa S, Hirakawa K, Nonfunctional adrenocortical carcinoma initially presenting as retroperitoneal hemorrhage, *BMC Surg*, 査読有, 2015, 15:46
DOI: 10.1186/s12893-015-0031-3

Kawajiri H, [Takashima T](#), [Kashiwagi S](#), Noda S, Onoda N, Hirakawa K, Pertuzumab in combination with Trastuzumab and Docetaxel for HER2 positive metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 査読有, 2015, 15(1): 17-26
DOI: 10.1586/14737140.2015.992418

Noda S, Onoda N, Asano Y, Kurata K, [Kashiwagi S](#), Kawajiri H, [Takashima T](#),

Hirakawa K, T-stage and positive sentinel nodes ratio are the useful factors to predict non-sentinel node metastasis in breast cancer patients with macro-metastasis in the sentinel node, Int J Surg, 査読有, 14:56-60
DOI: 10.1016/j.ijso.2015.01.006

〔学会発表〕(計4件)

Kashiwagi S et al, The novel potential of palbociclib (CDK4/6 inhibitor) in the treatment of triple-negative breast cancer, AACR 2017, 2017年4月3日, Washington DC, USA

Kashiwagi S et al, Prediction of The Treatment Response to Docetaxel, Trastuzumab and Pertuzumab Combination Regimen Chemotherapy in Breast Cancer using TILs, FACO 2016, 2016年9月22日, Amoi, China

Kashiwagi S et al, Prediction of the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer using tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), AACR 2017, 2017年4月16~20日, New Orleans, Louisiana, USA

Kashiwagi S et al, Predicting therapeutic effect by on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in endocrine therapy for stage IV breast cancer, SABCs 2016, 2016年12月6日~10日, San Antonio, Texas, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/surgical-oncology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏木 伸一郎 (KASHIWAGI Shinichiro)
大阪市立大学・大学院腫瘍外科・講師
研究者番号：80637017

(2)研究分担者

大平 雅一 (OHIRA Masaichi)
大阪市立大学・大学院腫瘍外科・教授
研究者番号：90203926

(3)研究分担者

高島 勉 (TAKASHIMA Tsutomu)
大阪市立大学・大学院腫瘍外科・講師
研究者番号：80336776