

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861055

研究課題名(和文) ERとHER2のクロストークによる乳癌薬物治療抵抗性機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the interaction between crosstalk between ER and HER2 and drug resistance mechanism in breast cancer

研究代表者

徳田 恵美 (TOKUDA, Emi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70621960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞の重要な生存増殖経路である、エストロゲンレセプター(ER)とHER2蛋白が高発現するトリプルポジティブ乳癌の薬剤耐性機序を解明することを目的として以下の研究を行った。トリプルポジティブ乳癌細胞株：BT474と、BT474にHER2シグナルを遮断するトラスツズマブを長期投与し確立したBt474-R細胞を用い、細胞内シグナル伝達の変化、遺伝子発現変化の解析を行った。トラスツズマブに耐性を獲得することで、もう一方の増殖経路であるERシグナルの蛋白発現が強くなり、エストロゲンを産生する遺伝子系の活性化が認められ、HER2シグナルの長期遮断ではERへの依存度が強くなることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of drug resistance on triple-positive breast cancer in which estrogen receptor (ER) and HER2 protein are highly expressed, which are survival and proliferative pathway.

Triple-positive breast cancer cell line: BT474 and BT474-R cells that had established long-term administration of trastuzumab that blocks HER2 signal to BT474 were used to analyze changes of some proteins in signal pathway and change of gene expression. By acquiring resistance to trastuzumab, protein expression of the ER signal was high expressed, and a group of genes producing estrogen were activated.

研究分野：医学

キーワード：ER陽性HER2陽性乳癌 薬剤耐性 クロストーク

1. 研究開始当初の背景

乳癌の治療は、手術療法、薬物治療、放射線療法の大まかに3つに分かれている。初期で診断された乳癌の第一選択治療は手術療法であるが、進行乳癌・また転移再発乳癌の治療の第一選択は、主に薬物療法となることが多い。

乳癌の薬物療法は、乳癌に発現しているエストロゲンレセプター (ER) と HER2 蛋白の有無により大きく4つのサブタイプに分けることによって選択されている。ER 陽性乳癌に対しての治療は、主に ER をターゲットとしたホルモン療法、HER2 陽性乳癌に対しての治療は、HER2 蛋白を介したシグナル伝達系をターゲットとした分子標的治療、や細胞周期をターゲットとした殺細胞性をはじめとした化学療法が中心となっている。

ER の発現している乳癌は、生存に必要なメインストリームとされる ER シグナルパスウェイを使い、また HER2 が高発現している乳癌は同様にメインストリームである HER2 シグナルパスウェイを使い蔵書Kしていることは既知の事実である。ER 陽性 HER2 陽性乳癌に対しての薬物療法は、選択肢が多くはなるものの、2つのどちらのパスウェイを先に抑えるべきか、未だ一定の見解はない。

それを裏付ける結果の1つとして、ER 陽性 HER2 陽性乳癌における治療効果は、他のサブタイプ乳癌と比べて低いと報告されている。表1に示すように HER2 陽性乳癌に対する術前化学療法の完全奏効率を ER 発現別に示すと、ER 陽性 HER2 陽性乳癌に対する奏効率は、ER 陰性乳癌と比べて低いことが示されている¹⁾。

	AC	P+H	AC	P+H+L
ER 陽性		46%		55%
ER 陰性		58%		70%
Total		49%		60%

表1: HER2 陽性乳癌における ER 別化学療法完全奏効率の比較¹⁾

A: アンスラサイクリン系薬剤 C: シクロフォスファミド P: パクリタキセル H: トラスツズマブ L: ラパチニブ

ER 陽性 HER2 陽性乳癌の奏効率が低い理由として、HER2 シグナルパスウェイの細胞内シグナル伝達経路である、発癌において重要なシグナル伝達経路とされ癌細胞を分化・増殖へと導く Ras-MAPK 経路と、癌細胞の生存延長につながる PI3K-Akt 経路に加え、ER シグナルパスウェイも亢進するというように、複数の増殖刺激伝達経路間の相互連絡 (クロストーク) が成立していることが推測されている (図1)。多く

の研究者は、ER と HER2 のシグナル間に何らかの因子が関与しており、その因子が ER・HER2 の2つのパスウェイをコントロールしていると予測しているが、未だその因子が同定できていないのが現状である。

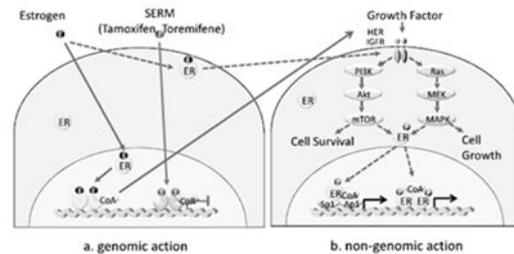


図1: ER と HER2 のクロストーク²⁾

PI3K-Akt 経路の活性化を制御すると、細胞分裂に関連する微小管が安定化することが近年報告されており⁴⁾、ER と HER2 とのクロストークの解明の因子となる可能性が示唆されていた。

我々は、以前 ER 陽性乳癌に対する薬物療法耐性の機序として、ER の発現が化学療法の一つであるパクリタキセルの感受性を規定することを報告した³⁾。ER のリガンドであるエストロゲンが ER の標的遺伝子でもある HDAC6 (細胞の微小管重合に関連している脱アセチル化酵素) を介して tubulin の脱アセチル化を引き起こし、細胞の微小管の安定性低下・細胞運動性の上昇を引き起こし、パクリタキセルの効果と相反する作用を起こすことが薬物耐性の機序の一つであることを報告しており、前述のクロストークに ER の標的遺伝子、微小管重合が何らかの影響を与えることが予測された。

2. 研究の目的

ER 陽性 HER2 陽性乳癌における薬物療法耐性の機序が ER シグナルパスウェイと HER2 シグナルパスウェイによるクロストークと関連していること、またその2つのシグナルの橋渡しを考えると考えられる調節因子が存在することを明らかにする。

3. 研究の方法

細胞実験では、ER 陽性 HER2 陽性細胞株 (BT474)、ER 陽性 HER2 弱陽性細胞株 (MCF7) を用いた。

BT474、MCF7 における、基本的なシグナルパスウェイの発現を確認する。ER シグナルパスウェイと HER2 シグナルパスウェイに関連する蛋白 (ER、PgR、HER2、Akt など) の発現の有無

をウエスタンブロット法で確認した。

BT474 に対し、トラスツズマブを長期に添加（最大濃度：1 μ M）継続することで、トラスツズマブ耐性細胞株（BT474-R）を樹立した。BT474-R 細胞株と、親株、親株に抗 HER2 薬であるトラスツズマブ（Tra）を投与した時の細胞シグナル伝達変化を と同様に蛋白レベルで確認し比較検討した。MCF7 と MCF7-R を長期にエストロゲン非添加培地で生存した細胞（MCF7-R）での HER2、ER 蛋白についても同様に比較検討した。とまた細胞株に対して HER2 を介するシグナルの遮断は抗 HER2 薬（トラスツズマブ：Tra）を使い、また ER を介するシグナルの遮断は抗エストロゲン薬（タモキシフェン：TAM）を使い、各薬剤単剤、また 2 剤併用での細胞増殖実験を行った。

BT474 細胞がトラスツズマブに対する耐性を獲得することで、細胞内シグナル伝達の変化から、遺伝子レベルの変化をきたすことが予測できる。そこで BT474・BT474-R 各細胞株の遺伝子発現の変化の有無につき、SurePrintG3 Human GE microarray 8x60K Ver. 3.0（Agilent 社）と DAVID(National Institute of Allergy and Infectious Diseases)を用い網羅的に遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

ER 陽性 HER2 陽性細胞である BT474 の蛋白発現は、HER2 シグナルパスウェイ系の HER2、その下流パスウェイの 1 つである、PI3K パスウェイである Akt、pAkt、ER シグナルパスウェイ系である ER、PgR とともに発現の亢進が認められた。また、MCF7 においては、ER、PgR の発現亢進は認められ、HER2 の発現は認められたものの BT474 と比較するとわずかな発現上昇のみであった。

BT474 と BT474-R に Tra を投与後、また BT474-R での ER と HER2 シグナルパスウェイにおける蛋白発現の変化を図 2 に示す。BT474 に Tra を投与すると、親株では発現していた HER2 蛋白の発現は明らかに低下したが、Tra に対する耐性を獲得すると HER2 の発現は上昇した。親株、Tra 投与後にはリン酸化 HER2 の変化は見られなかったが、BT474-R において発現の上昇が

認められた。PI3K シグナルパスウェイについて反映している、Akt の変化は、total Akt の変化は認められなかったが、リン酸化 Akt（S473）は Tra 投与直後では発現が減弱したが、BT474-R においては HER2 蛋白同様に発現上昇を認めた。また ER 蛋白では、わずかではあるが BT474、親株に Tra 投与後と比較すると BT474-R での発現上昇を認めた。また ER の下流遺伝子の一つとされる PgR の発現においても、Tra 投与により発現は低下し、Tra 耐性獲得後に PgR の発現は親株レベルに近づくように上昇した結果となった。以上より、HER2 のシグナルパスウェイを一時的に遮断することで ER・HER2 どちらものシグナルパスウェイが低下し、また抗 HER2 薬に耐性獲得し、HER2 シグナルパスウェイとは異なる経路での生存方法を獲得すると、ER シグナルパスウェイ系の蛋白が再発現するだけでなく、HER2 蛋白も再発現することが示された。

また MCF7 と MCF7-R でのシグナルパスウェイにおける蛋白の変化は、HER2 の発現には変化を認めず、ER の発現はやや亢進している程度で著変を認めなかった。

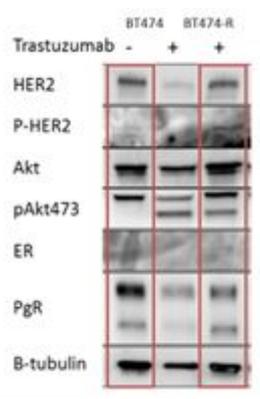


図 2：BT474 と BT474-R における蛋白発現の変化

次に BT474 と BT474-R に対する TAM と Tra による薬剤投与の細胞増殖抑制試験の結果を図 3 に示す。TAM の投与濃度、Tra の投与濃度どちらも 1 μ M で実験を行った。TAM の投与により、両細胞株ともに細胞増殖抑制効果が十分に認められ、特に BT474-R においてより TAM 投与による細胞増殖抑制の効果が認められた。また両細胞株に対し Tra の投与を行ったところ、BT474-R は親株と比べ細胞増殖の抑制効果は少ない結果となり、これより BT474-R が Tra に対する薬剤耐性を獲得していることが示されている。そこで TAM と Tra を同時に 2 細胞株に投与したところ、BT474 においては TAM

投与、Tra 投与と比較し、薬剤投与の相加効果が認められた。Tra 耐性である BT474-R においても 2 剤投与による相加効果が親株同様に認められた。また BT474 よりも、より 2 剤投与の効果を認めた。この結果より ER 陽性 HER2 陽性乳癌において、トラスツズマブに対する耐性を獲得しても、抗エストロゲン薬との併用により強い細胞増殖抑制効果を示すことがわかり、トラスツズマブは HER2 受容体を介して細胞増殖をコントロールするだけでなく抗エストロゲン薬と併用することで ER シグナルパスウェイを直接制御できる何らかの機能があるのではないかということが示唆された。

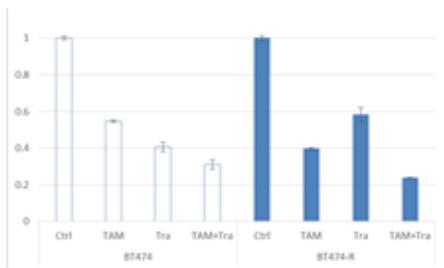


図3 : BT474、BT474-R 細胞に対する各薬剤の細胞増殖抑制効果 (コントロールを 1 とした時の相対比)

トラスツズマブに耐性を獲得することによる細胞の遺伝子変化の有無を調べるため、BT474 と BT474-R 細胞株に対して、マイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。30000 近い RNA と、30000 以上の Long non-coding RNA を耐性獲得前後で比較し、耐性獲得前後において 4 倍以上発現が変化していた遺伝子は 307 遺伝子認められた。それら遺伝子に対し、代謝経路やシグナル伝達経路を中心に解析ができる、KEGG パスウェイ解析を行った。その結果、注目しうる変化があったとされる遺伝子群としては、2-methoxyestrone、2-methoxy-estradiol、testosterone、2-Hydroxy-estradiol-17 といった、エストロゲンを産生するために必要な遺伝子系の活性化が認められた。つまり、HER2 シグナルを長期遮断することで、ER シグナルパスウェイを維持するために必要なリガンドであるエストロゲンをはじめとするステロイドホルモンを産生するために遺伝子が増える可能性が示唆できた。

< 引用文献 >

1) Robidoux A, Tang G, Rastogi P et al. Lapatinib as a component of

neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2013 Oct 3. S1470-2045(13)

- 2) 岩瀬弘敬、山本豊、アロマターゼ阻害薬耐性例に対する内分泌療法内分泌甲状腺外会誌.2012(29) 284-288
- 3) Tokuda E, Seino Y, Atsushi A et al, Estrogen receptor- α directly regulates sensitivity to paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 133(2), pp 427-436 2012
- 4) Onishi K, Higuchi M, Asakura T et al. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. Genes Cells. 2007 Apr;12(4):535-46.

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 3 件)

- 1) Tokuda E, Horimoto Y, Arakawa A, Himuro T, Senuma K, Nakai K, Saito M, Differences in Ki67 expressions between pre and post neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer Hum Pathol 査読あり Vol 63, 2017, 40-45
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.005>
- 2) 徳田恵美、林 慎一
ホルモン療法の感受性マーカー、がん分子標的治療、第 15 巻、2017 年、66-71
- 3) Horimoto Y, Arakawa A, Harada-Shoji N, Sonoue H, Yoshida Y, Himuro T, Igari F, Tokuda E, Mamat O, Tanabe M, Hino O, Saito M
Low FOXA1 expression predicts good response to neo-adjuvant chemotherapy resulting in good outcomes for luminal HER2-negative breast cancer cases ; Br J Cancer. 査読あり、112 巻、 2015、 345-511

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 徳田恵美、小松隆幸、中村美紗都、坪井洸樹、齊藤光江、林 慎一

PI3K 阻害剤の投与が内分泌耐性乳癌細胞株の細胞増殖に与える影響について、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2016 年 6 月 16 日、東京国際展示場(東京都・江東区)

2) 徳田恵美、酒田円佳、猪狩史江、魚森俊喬、水室貴規、森昌子、村上郁、岡崎みさと、清水秀穂、堀本義哉、田辺真彦、小坂泰二郎、瀬沼幸司、三浦佳代、飯島耕太郎、平井達夫、齊藤光江

HER2 陽性乳癌の転移性脳腫瘍に対するガンマナイフ治療と併用した全身治療の効果についての検討、第 14 回日本臨床腫瘍学会総会、2016 年 7 月 27 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

3) 徳田恵美、島田聡子、吉田悠子、清水秀穂、堀本義哉、田辺真彦、小坂泰二郎、三浦佳代、三浦弘善、齊藤光江

HER2 陽性転移性乳癌における当院での T-DM1 の使用経験について、第 13 回日本臨床腫瘍学会総会、2015 年 7 月 17 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

4) 徳田恵美、清水秀穂、堀本義哉、田辺真彦、三浦佳代、齊藤光江、林 慎一、山口ゆり

乳癌の化学療法効果におけるエストロゲンレセプター蛋白の発現と活性による評価の検討、第 16 回ホルモンと癌研究会、2015 年 7 月 10 日、朝日大学村上ホール(岐阜県・岐阜市)

5) 徳田恵美、高橋由佳、堀本義哉、清水秀穂、田辺真彦、中井克也、齊藤光江、清野祐子、山口ゆり、林 慎一

乳癌の化学療法効果におけるエストロゲンレセプター蛋白の発現と活性による評価の検討、第 22 回日本乳癌学会学術総会、2014 年 7 月 10 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 恵美 (TOKUDA, Emi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70621960

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

堀本 義哉 (HORIMOTO, yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

荒川 敦 (ARAKAWA, Atsushi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70245695