

乳癌細胞に対する HER1/HER2 チロシン燐酸化阻害剤 LAPTINIB と抗エストロゲン剤 FULVESTRANT の相加的抗腫瘍効果に関する研究

野村 長久

目的：増殖因子シグナル伝達の活性化が、エストロゲン受容体 (ER) のエストロゲン非依存的な活性化を引き起こし、乳癌のホルモン療法抵抗性の一因になっていることが、最近の基礎研究により示されている。また、増殖因子シグナル伝達の阻害は、ホルモン療法抵抗性の克服に役立つことが示唆されている。この仮説を検証するために、3種類の乳癌細胞株を用い HER1/HER2 チロシン燐酸化阻害剤 lapatinib (Lap) と抗エストロゲン剤 fulvestrant (Ful) 併用による抗腫瘍効果を検討した。さらに、その作用メカニズムも検討した。

方法：3種類の乳癌細胞株は、すべて当教室で樹立した。KPL-1 及び KPL-3C 細胞株は、ER 陽性であるが HER1/HER2 の発現は弱い。KPL-4 細胞株は、ER 陰性であるが HER2 を過剰発現している。細胞増殖はコールターカウンターにより細胞数を計測した。細胞周期の測定は propidium iodide 染色後にフローサイトメトリー (FACS) を用いた。アポトーシス測定は terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 法を用いた。細胞周期やアポトーシス誘導に関わる因子の蛋白発現レベルは、ウエスタンブロット法を用い検討した。

結果：3種類の乳癌細胞株の中で、KPL-4 細胞株が Lap に対し最も感受性が高かった (50% 増殖阻止濃度 [IC₅₀], 1.5 μM)。Lap は KPL-4 細胞のアポトーシスを誘導した (FACS における sub-G1 分画の増加や TUNEL 陽性細胞の増加)。KPL-1 及び KPL-3C 細胞株では Lap の抗腫瘍効果は弱かった (IC₅₀ は各々 8.1 μM and 5.0 μM)。Lap と Ful の併用は、アポトーシスの増加を伴って、相加的な抗腫瘍効果を示した。Lap は KPL-4 細胞において、抗アポトーシス因子 Bcl-2 や survivin の蛋白発現を低下させたが、KPL-1 及び KPL-3C 細胞では有意の変化は認めなかった。一方、Lap と Ful の併用により、KPL-1 及び KPL-3C 細胞において Bcl-2 や survivin の低下が認められた。さらに、Lap 単独や Ful との併用により、これらの3種類の細胞株で、細胞周期関連因子 p21 や p27 の増加が認められた。

結語：これらの研究結果から、Lap は HER2 を過剰発現する乳癌に対し強力な抗腫瘍効果が期待でき、さらに、Lap と Ful との併用は、ER 陽性乳癌に対し、相加的な抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

(平成19年4月18日受理)

(Amersham Life Sciences) を用い発色させた。検索遺伝子の蛋白発現量は、GAPDH のバンドの濃度と比較検討した。再現性をみるため、2 回以上同様の実験を行った。

統計学的処理

計測データは、MS エクセル及び StatView ソフトウェアを用い統計学的処理を行い、平均値 ± 標準誤差で表示した。連続変数の群間比較は、分散分析を用いた。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意な差であると判定した。

結 果

1) 細胞増殖抑制効果

Lap の用量依存性細胞増殖抑制効果は、すべての乳癌細胞株で認められた (Fig. 1)。50% 阻止濃度は KPL-1、KPL-3C および KPL-4 細胞株で各々 $8.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 、 $5.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ 、 $1.5 \pm 0.07 \mu\text{M}$ であった。HER2 を過剰発現する KPL-4 細胞株が Lap に対し、最も感受性が高かった。

Lap ($2 \mu\text{M}$) と Ful (10 nM) の併用実験では、ER 陽性の KPL-1 及び KPL-3C 細胞株で相加的な細胞増殖抑制効果がみられたが、ER 陰性の KPL-4 細胞株では相加的効果は認めら

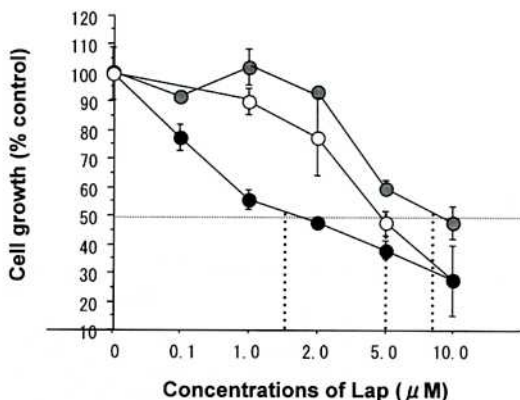


Fig. 1. Lap の細胞増殖抑制効果：乳癌細胞株をエストロゲン除去培地に Lap ($0 \sim 10 \mu\text{M}$) 添加した培養液で 3 日間培養し、細胞数を測定した。KPL-1 細胞株、○-○；KPL-3C 細胞株、灰色○-灰色○；KPL-4 細胞株、●-●；縦棒は標準誤差。

れなかった (Fig. 2A-2C)。

2) 細胞周期分析

Lap や Ful の細胞増殖抑制効果の作用機構を解明するために細胞周期に与える影響を調べた。KPL-1 細胞株は Lap では有意の変化は見られず、Ful により sub-G1 分画の増加が見られ、両薬剤の併用によりさらに sub-G1 分画が増加した。KPL-3C 細胞株は Lap 及び Ful により sub-G1 分画の増加が見られ、両薬剤の併用により相加的に sub-G1 分画が増加した (Fig. 3)。一方、KPL-4 細胞株は Lap により sub-G1 分画の増加が見られたが、Ful 単独または併用による sub-G1 分画の変化は認められなかった。

3) TUNEL 分析

細胞周期分析で確認された sub-G1 分画がアポトーシスであることを確認するため TUNEL 分析を行った。Lap 単独では、KPL-1 及び KPL-3C 細胞株では有意の変化を認めなかった。しかし、KPL-4 細胞株では TUNEL 染色陽性の分画が明らかに増加した (Fig. 4)。

4) ウェスタンブロット解析

細胞周期やアポトーシス誘導に関わる因子 (cyclin-dependent kinase inhibitors [CDK1] である p21, p27, 抗アポトーシス因子 Bcl-2, survivin) の Lap や Ful による蛋白発現レベルの変動を検討した。

ER 陽性乳癌細胞株 KPL-1 及び KPL-3C では、Ful は p21, p27 の発現を増加させ、Bcl-2, survivin の発現を低下させた。また、Lap は有意の変化を与えなかった。また、Ful と Lap の併用は、相加的に p21, p27 の発現を増加させ、Bcl-2, survivin の発現を低下させる傾向がみられた。一方、HER2 を過剰発現する KPL-4 細胞株では、Ful はどの因子に対しても変化を与えなかったが、Lap は p27 発現の増加及び Bcl-2, survivin の発現を低下させた (Fig. 5, 6)。

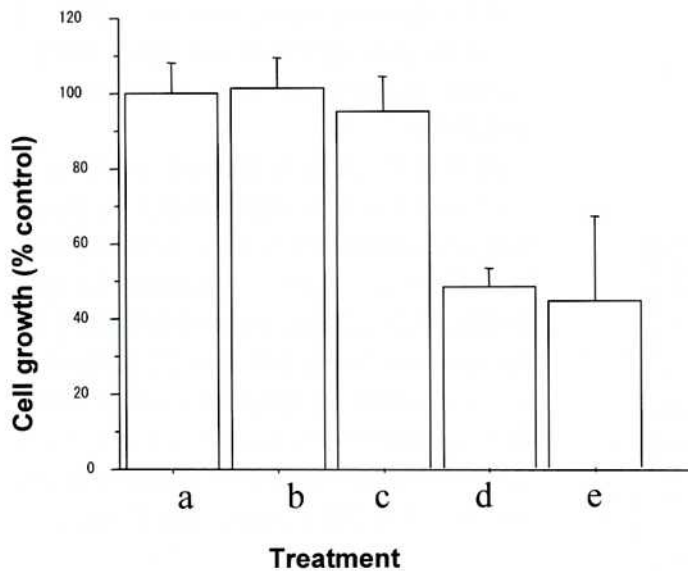
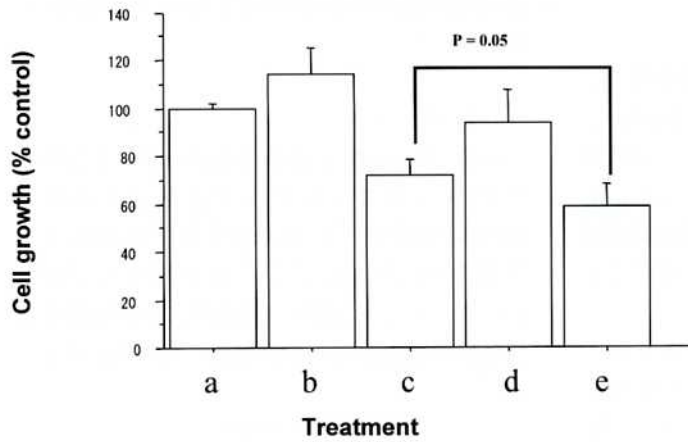
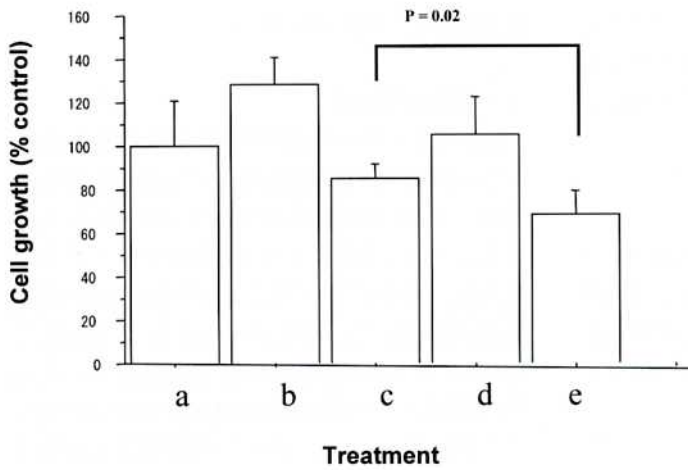


Fig. 2. Lap と Ful の併用効果：乳癌細胞株をエストロゲン除去培地に1 nM E2, Lap (2 μ M), Ful (10 nM) を添加した培養液で3日間培養し、細胞数を測定した。A, KPL-1細胞株；B, KPL-3C細胞株；C, KPL-4細胞株；値は平均値 \pm 標準誤差；a, コントロール；b, 1 nM E2；c, 1 nM E2 + 10 nM Ful；d, 1 nM E2 + 2 μ M Lap；e, 1 nM E2 + 10 nM Ful + 2 μ M Lap；縦棒は標準誤差。

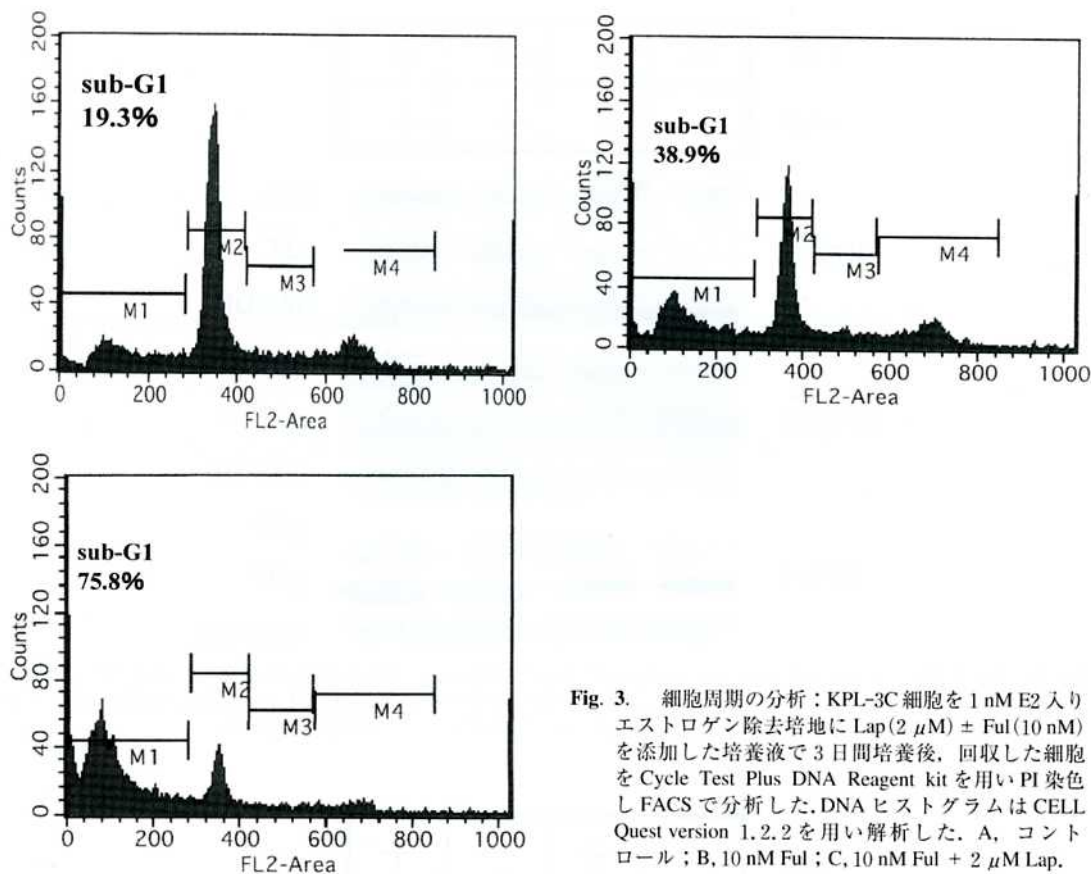


Fig. 3. 細胞周期の分析：KPL-3C細胞を1 nM E2入りエストロゲン除去培地にLap(2 μM) ± Ful(10 nM)を添加した培養液で3日間培養後、回収した細胞をCycle Test Plus DNA Reagent kitを用いPI染色しFACSで分析した。DNAヒストグラムはCELL Quest version 1.2.2を用い解析した。A、コントロール；B、10 nM Ful；C、10 nM Ful + 2 μM Lap。

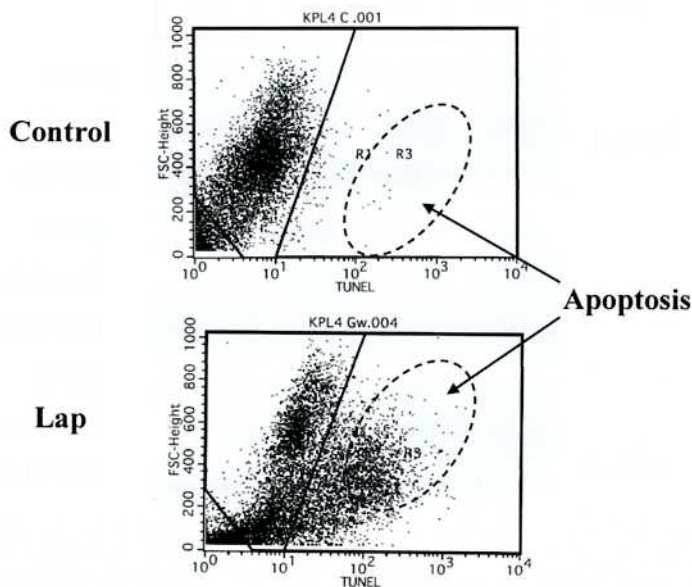


Fig. 4. TUNEL法によるアポトーシス分析：KPL-4細胞を1 nM E2入りエストロゲン除去培地にLap(2 μM)を添加した培養液で3日間培養後、in situ cell death detection kitで処理後、FACSでTUNEL陽性分画を定量化した。コントロールにおけるTUNEL陽性率は1.5%、Lap処理では31.7%と計測された。

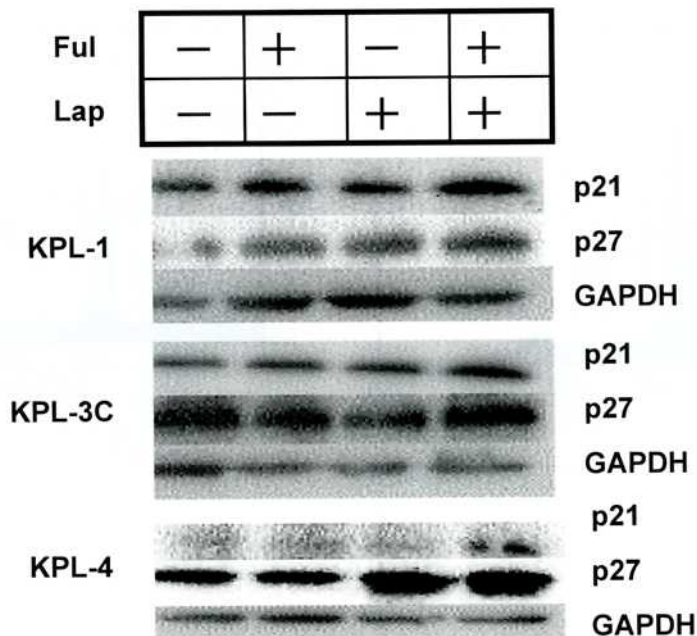


Fig. 5. Lap と Ful による細胞周期関連因子 p21, p27 の蛋白発現レベルの変化: 乳癌細胞株を 1 nM E2 入りエストロゲン除去培地に Lap (2 μ M) \pm Ful (10 nM) を添加した培養液で 3 日間培養した. 回収した細胞を用いウエスタンブロット法で p21, p27 の発現レベルを調べた. 内部標準として GAPDH を用いた.

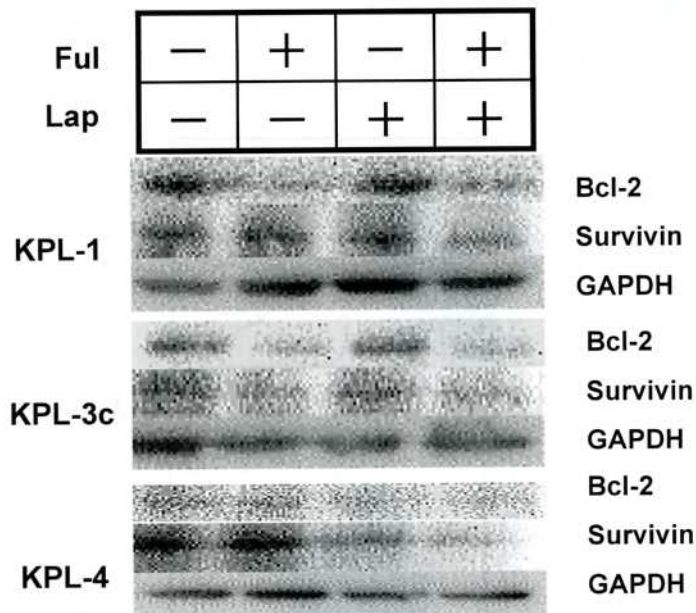


Fig. 6. Lap と Ful による抗アポトーシ因子 Bcl-2, survivin の蛋白発現レベルの変化: 乳癌細胞株を 1 nM E2 入りエストロゲン除去培地に Lap (2 μ M) \pm Ful (10 nM) を添加した培養液で 3 日間培養した. 回収した細胞を用いウエスタンブロット法で Bcl-2, survivin の発現レベルを調べた. 内部標準として GAPDH を用いた.

考 察

乳癌の治療体系の中で、HER2シグナル伝達を標的としたtrastuzumabによる治療法は、進行・再発症例ばかりでなく、術後補助療法においても重要な役割を果たしている¹⁶⁾。また、HER1も一部の乳癌において発現の亢進が認められており、HER2同様、乳癌の悪性形質進展に寄与していることが示されている。さらに、HER1、HER2ともに、そのシグナル伝達の亢進は、ホルモン依存性乳癌のホルモン療法に対する抵抗性を誘導することが示されている¹⁷⁾。

そこで、ホルモン療法とHER1、HER2のシグナル伝達阻害剤との併用療法が、前臨床試験ばかりでなく臨床試験においても検討されている¹⁸⁾。前臨床試験において、アロマターゼ阻害剤とLapの同時併用投与が、ER陽性HER2過剰発現乳癌に対し有用なことが示唆されている⁷⁾。また、ER陽性HER2低発現乳癌細胞に対して、Lapとtamoxifenの併用が有用なことも検証されている⁸⁾。

そこで我々は、これらの知見を確認するため、当教室で樹立した3種類の乳癌細胞株を用い、Lapと抗エストロゲン剤Fulとの併用効果を検討した。その結果、ER陰性HER2過剰発現KPL-4細胞株では、Lap単剤で1.5 μ Mという臨床的に達成可能な濃度で50%細胞増殖抑制効果を示した(Fig. 1)。この結果は、これまでの前臨床試験結果と合致していた。さらに、ER陽性HER2低発現KPL-1、KPL-3C細胞株においては、Lap単剤では十分な細胞増殖抑制は得られなかった。しかし、Fulを併用することで、2 μ Mという臨床的に到達可能な濃度で相加的な細胞増殖抑制効果を示した(Fig. 2)。これらの結果から、ER及びHER2の発現状況別に治療戦略を考えた場合、LapはER陰性HER2過剰発現する乳癌では単剤投与がふさわしく、ER陽性HER2低発現乳癌に対しては、Fulとの併用投与がふさわしいとの結論を導き出せる。

さらに我々は、LapやFulの単独または併用投与による細胞増殖抑制効果の作用機構を検討するため、細胞周期やアポトーシスの変化、さらにそれらを誘導する因子の発現レベルを調べた。HER2過剰発現するKPL-4細胞株では、Lapは抗アポトーシス因子Bcl-2及びsurvivinの蛋白発現を低下させ(Fig. 6)、強力にアポトーシスを誘導することが示された(Fig. 4)。また、KPL-4細胞株はER陰性であり、Fulとの併用効果は認められなかった。一方、ER陽性HER1/HER2低発現するKPL-1及びKPL-3C細胞株では、FulとLapの併用は、相加的にp21、p27の蛋白発現を増加させ、Bcl-2、survivinの発現を低下させた(Fig. 5, 6)。この結果は、両薬剤の併用により、相加的に細胞増殖が抑制されたことやアポトーシスが增加した所見と一致する(Fig. 2, 3)。

LapがCDKIであるp27の蛋白発現を増加させ、G1-S細胞周期移行阻害を引き起こすことは既に報告されている⁸⁾。また、Lapによる抗アポトーシス因子survivin発現の低下は、アポトーシス誘導において中心的な働きをしていることも報告されている¹⁹⁾。今回の実験結果は、これまで報告されているLapのアポトーシス誘導や細胞増殖抑制の機構を支持するものである。

本研究の意義としては、1) HER1/HER2チロシン磷酸化阻害剤Lapは、ER陰性HER2過剰発現乳癌に対して単剤で強力な抗腫瘍効果を示すこと、2) ER陽性HER2低発現乳癌に対してもLapは抗エストロゲン剤Fulを併用することにより相加的な抗腫瘍効果を得られることを示唆した点にある。今後、LapがER、HER2発現別に乳癌の治療薬として臨床応用されることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御指導と御高覧を賜りました川崎医科大学外科学(乳腺甲狀腺)教室 園尾博司教授ならびに紅林 淳一准教授に深甚なる謝意

を表します。また研究の技術的面にご協力頂きました川崎医科大学外科学(乳腺甲状腺)教室 田中 克浩講師, 大久保 澄子元臨床助教, 川崎医科大学衛生学 大槻 剛巳教授, 三浦 由恵助教, 前田 恵助教, 幡山 圭代研究補助員, 山下 佳子研究補助員, また細胞培養や実験手技について直接ご指導頂きました組織培養・免疫センターの東脇 久恵研究補助員, 桑田

なるみ研究補助員, 伊賀 典子研究補助員, 坂口 治子研究補助員に深謝いたします。

なお, 本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 17-113S, No.18-101) および文部科学省・学術振興会科学研究費補助金 (課題番号18591448) の援助により行われた。

文 献

- 1) Kurebayashi J, Okubo S, Yamamoto Y, et al. : Inhibition of HER1 signaling pathway enhances antitumor effect of endocrine therapy in breast cancer. *Breast Cancer* 11 : 38 - 41 2004
- 2) Okubo S, Kurebayashi J, Otsuki T, et al. : Additive antitumour effect of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (Iressa, ZD1839) and the antioestrogen fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in breast cancer cells. *Br J Cancer* 90 : 236 - 244, 2004
- 3) Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, et al. : Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)- overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61 : 8887 - 8895, 2001
- 4) Hutcheson IR, Knowlden JM, Jones HE, et al. : Inductive mechanisms limiting response to anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Endocr Relat Cancer* 13 Suppl 1 : S89 - S97, 2006
- 5) Burris HA 3rd, Hurwitz HI, Dees EC, et al. : Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* 23 : 5305 - 5313, 2005
- 6) Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. : Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 66 : 1630 - 1639, 2006
- 7) Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. : A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 7795 - 7800, 2006
- 8) Chu I, Blackwell K, Chen S, et al. : The dual ErbB1/ErbB2 inhibitor, lapatinib (GW572016), cooperates with tamoxifen to inhibit both cell proliferation- and estrogen-dependent gene expression in antiestrogen-resistant breast cancer. *Cancer Res* 65 : 18 - 25, 2005
- 9) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H : A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumour-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice. *Br J Cancer* 71 : 845 - 853, 1995
- 10) Kurebayashi J, Otsuki T, Yamamoto S, et al. : A pure antiestrogen, ICI 182,780, stimulates the growth of tamoxifen-resistant KPL-1 human breast cancer cells in vivo but not in vitro. *Oncology* 55 Suppl 1 : 23 - 34, 1998
- 11) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H : A new human breast cancer cell line, KPL-3C, secretes parathyroid hormone-related protein and produces tumours associated with microcalcifications in nude mice. *Br J Cancer* 74 : 200 - 207, 1996
- 12) Kurebayashi J, Sonoo H : Parathyroid hormone-related protein secretion is inhibited by oestradiol and stimulated by antioestrogens in KPL-3C human breast cancer cells. *Br J Cancer* 75 : 1819 - 1825, 1997
- 13) Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, et al. : Isolation and characterization of a new human breast cancer cell line, KPL-4, expressing the Erb B family receptors and interleukin-6. *Br J Cancer* 79 : 707 - 717, 1999
- 14) Kunisue H, Kurebayashi J, Otsuki T, et al. : Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br J Cancer* 82 : 46 - 51, 2000
- 15) Robertson JF, Erikstein B, Osborne KC, et al. : Pharmacokinetic profile of intramuscular fulvestrant in advanced breast cancer. *Clin Pharmacokinet* 43 : 529 - 538, 2004

- 16) Demonty G, Bernard-Marty C, Puglisi F, et al. : Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer. *Eur J Cancer* 43 : 497 - 509, 2007
- 17) Kurebayashi J : Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 (Suppl 1) : 39 - 46, 2005
- 18) Johnston SR. : Clinical trials of intracellular signal transductions inhibitors for breast cancer--a strategy to overcome endocrine resistance. *Endocr Relat Cancer* 12 (Suppl 1) : S145 - S157, 2005
- 19) Xia W, Bisi J, Strum J, et al. : Regulation of survivin by ErbB2 signaling : therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res* 66 : 1640 - 1647, 2006