

重粒子と分子標的薬 Lapatinib や Pertuzumab との併用 による乳癌幹細胞殺傷効果

研究者氏名	主任研究員 崔 星
日本所属機関	独立行政法人放射線医学総合研究所
共同研究者名	教授 于 冬
中国所属機関	蘇州大学 放射線医学防護学院

要旨

乳癌はサブタイプにより癌細胞の性質が異なる。その中で HER2 陽性乳癌は予後不良群でしたが、HER2 を標的とする分子標的薬（ハーセプチン）の登場により劇的に改善された。しかし、HER2 陽性群は依然 HER2 陰性群に比べ再発や転移を来しやすい。放医研では今まで 10 例近い重粒子線による乳癌試験治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究では、乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の細胞生存、spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討した。BT474、SKBR3 細胞において CD44+細胞集団は検出できず、ESA+/CD24-細胞集団は 0.9~1.5%と存在し、ESA-/CD24+細胞集団に比べ有意に高い spheroid 形成能を有することが認められた。さらに、ESA+/CD24-割合は、X 線と Lapatinib との併用処置では顕著に増加させるのに対し、炭素線と Lapatinib との併用処置では有意に減少させ、顕著な subG1 や G2/M 期の延長、apoptosis 誘導が認められた。また、炭素線と Lapatinib との併用処置 24h 後、X 線照射のものに比べ、より大きいサイズの γ H2AX foci が認められた。以上より、HER2 陽性乳癌細胞において、ESA+/CD24-細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べてより修復しにくい複雑な DNA 損傷を与えることによって乳癌幹細胞を有効的に殺傷する可能性を示唆した。

Key Words : 乳癌幹細胞、重粒子、生存率、DNA 修復

緒言

乳癌は女性がかかりやすい癌第 1 位で、日本では年間 5 万人超が新たに乳癌と診断され、女性癌死者数では、癌死全体で第 5 位となっている。中国では毎年 25 万人と世界平均の 2-3 倍増加率で増えており、2021 年以降では 250 万人になると推測しており、大きな社会問題となっている。現在、放医研では QOL に優れている重粒子臨床試験治療を開始しており、重粒子乳癌治療の効果をより高度な先進医療に発展させるためには、いかに再発や転移と深くかかわる癌幹細胞まで殺傷できるかなど分子レベルのメカニズム解明が不可欠である。近年乳癌治療においては、各種新規分子標的薬の有効性が報告され、その中の Lapatinib は、分子量が小さいため、細胞膜を通過し細胞内に入り EGFR および HER2

の2つの受容体に共通のチロシンキナーゼドメインに直接結合して、下流のシグナル伝達を抑制し、腫瘍細胞の増殖抑制或はアポトーシスを誘導することで制癌効果が証明され(1)、最近の海外臨床試験においては、Lapatinib 単独或は Trastuzumab との併用による手術可能な HER2 陽性乳癌や早期乳癌に対し有効性が報告されている(1, 2)。また、Pertuzumab は、HER2 受容体と他の HER 受容体 (EGFR/HER1、HER3 および HER4) との二量化を特異的に阻害するヒト化モノクローナル抗体で、進行性、転移性 HER2 陽性乳癌に有効であることが報告され(3)、新たな乳癌分子標的薬として期待されている。本研究では、乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討した。

対象と方法

細胞株は BT474、SKBR3 の2種類の乳癌細胞株を使用し、乳癌幹細胞マーカーとされる ESA-PE、CD24-FITC を用いた。まず、BT474、SKBR3 細胞から FACS Aria を用い、癌幹細胞様細胞 (ESA+/CD24-細胞)、非癌幹細胞 (ESA-/CD24+細胞) を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無を spheroid 形成能について評価した。そして、BT474、SKBR3 それぞれ細胞に対し、X 線或いは炭素線照射後の癌幹細胞様細胞 (ESA+/CD24-細胞) の割合の変化を FACS Aria にて解析した。炭素線照射は HIMAC (290 MeV/n, 50 keV/mm, 6-cm SOBP 中心)、X 線照射は 200kV_p (Pantac HF-320S, Shimadzu Co., Tokyo) を使用した。細胞周期解析には FACS Calibur (BD Bioscience) を、細胞生存は CellTiter-Glo™ kit (ProMega 社)、apoptosis 解析は Annexin V-PI kit (BD Bioscience)、DNA 損傷解析は γ H2AX 抗体 (Abcam 社) 用いて免疫蛍光染色法にて検出した。

結果

まず、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独より有意な細胞生存を抑制が認められた (Fig. 1)。上記細胞において、ESA+/CD24-細胞集団は ESA-/CD24+細胞に比べ sphere 形成能が高く、炭素線と Lapatinib との併用によりその形成能が有意に抑制された (Fig. 2)。BT474 細胞において ESA+/CD24-細胞の割合は 0.9-1.5% 検出され、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べその ESA+/CD24-細胞の割合を有意に低下させた (Fig. 3)。細胞周期及び Apoptosis 解析では、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べ顕著な subG1 や G2/M 期の延長及び apoptosis 誘導が認められた (Fig. 4, 5)。また、BT474、SKBR3 より分離した ESA+/CD24-細胞と ESA-/CD24+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を 24 時間後測定したところ、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べてより多くの γ H2AX foci 数と大きいサイズの γ H2AX foci 残存が認められた (Fig. 6)。

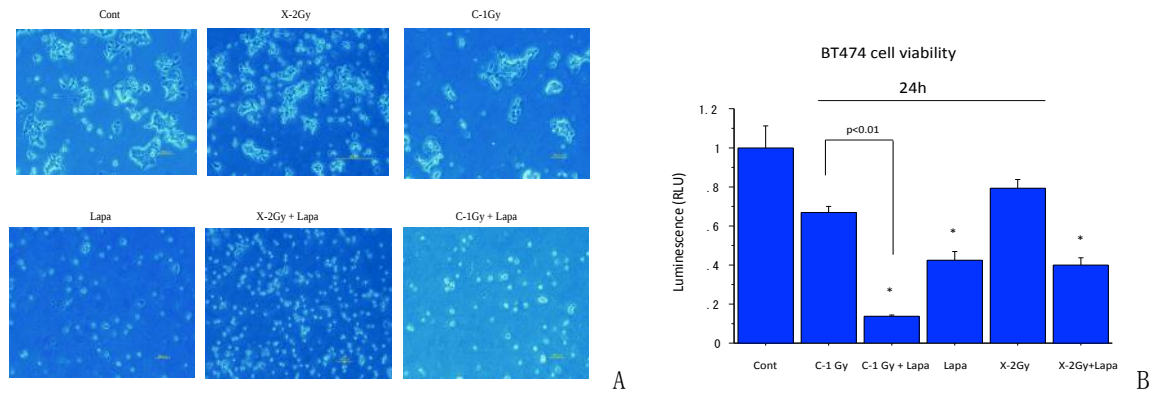


Fig.1 A. Morphological Changes 5 d after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1 μ M) in BT474 Cells. B. Cell viability 24 h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib in BT474 Cells

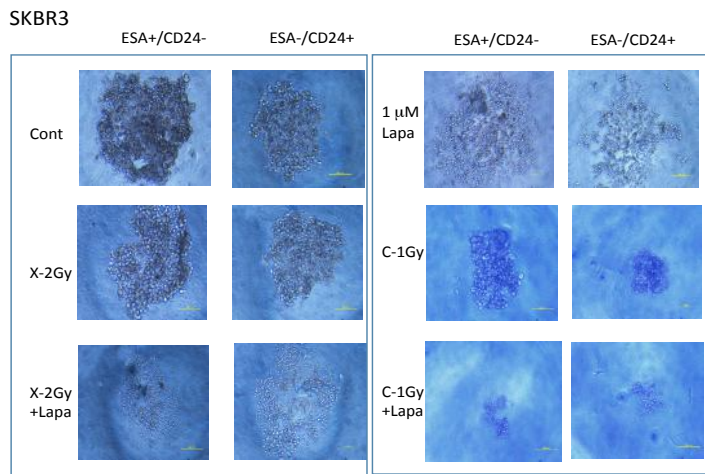


Fig.2 Spheroid formation ability after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1 μ M) in SKBR3 Cells

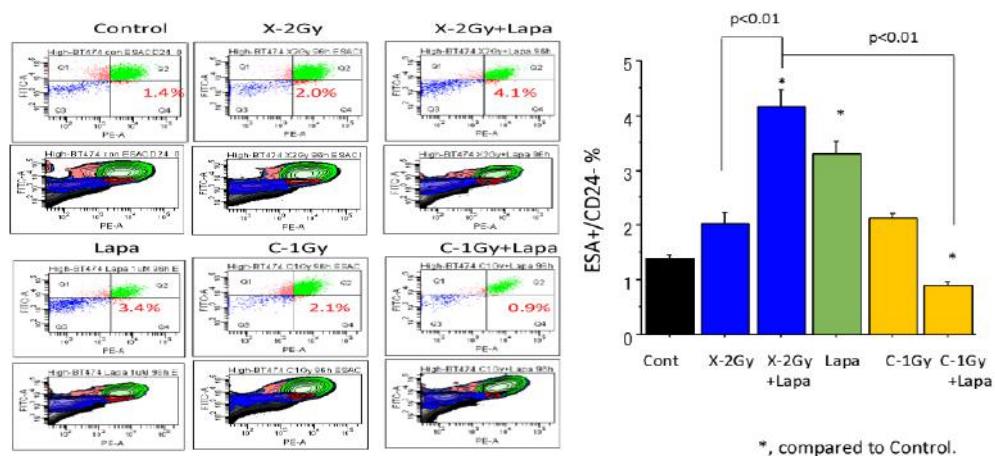


Fig.3 Proportion Changes of cancer stem cells 96h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1 μ M) in BT474 Cells

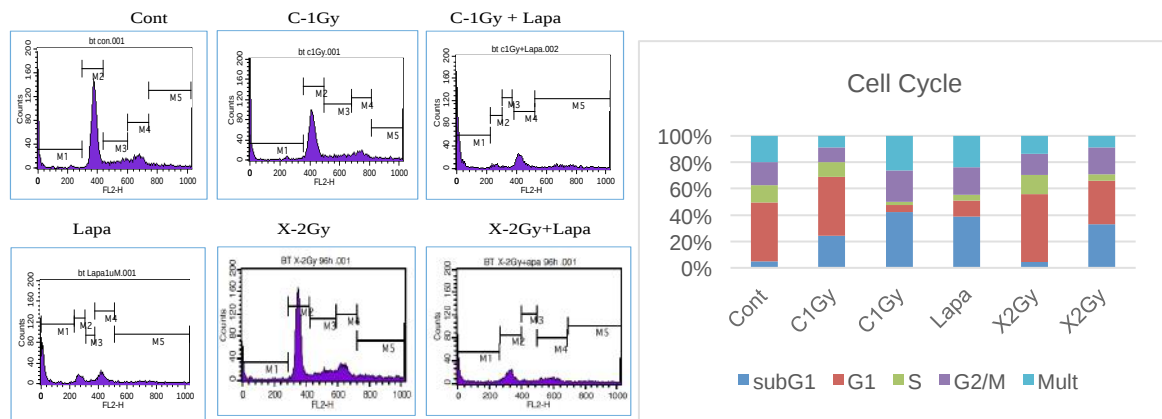


Fig.4 Cell cycle changes 96h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

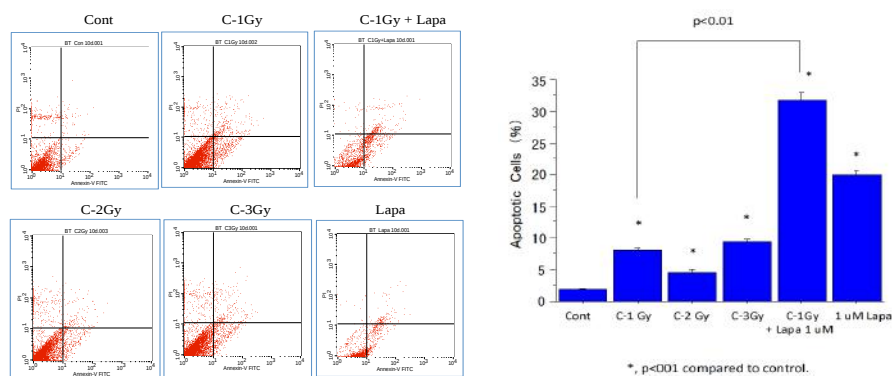


Fig.5 Induction of apoptosis after Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

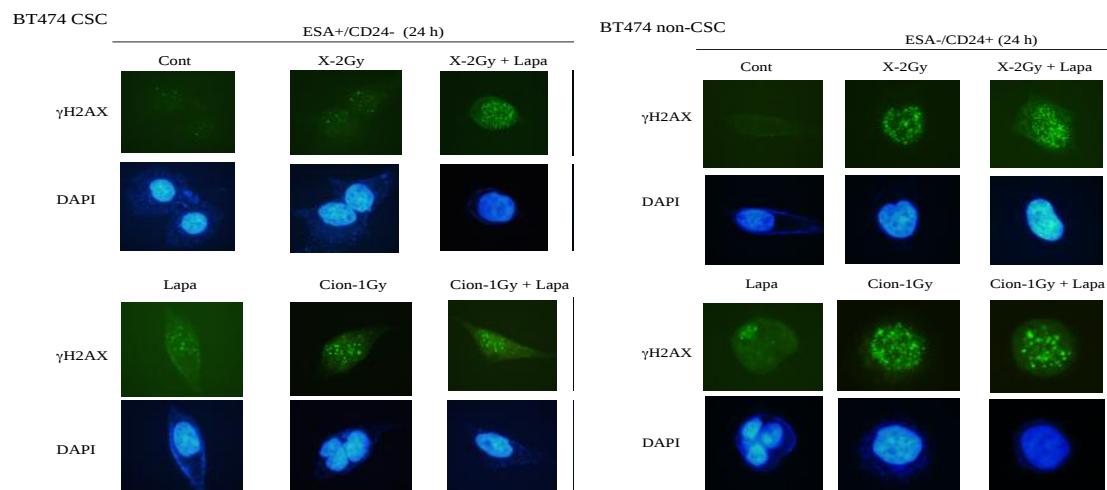


Fig.6 γH2AX formation 24h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

考察

我々は、重粒子線の高い制癌分子機構として、大腸癌、膵臓癌細胞株を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞に対し、炭素線はX線照射に比べ生物効果 (RBE=2.1-2.3) とし

て 2 倍以上強く癌幹細胞を殺傷することを世界で初めて報告してきた (4, 5)。そして最近、炭素線と抗癌剤 Cisplatin との併用は難治性 Triple Negative 乳癌癌幹細胞をより有効に殺傷することを突き止めた (6)。今回我々は、HER2 陽性乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討したところ、BT474、SKBR3 細胞において CD44+細胞集団は検出できず、ESA+/CD24-細胞集団は 0.9~1.5%と存在し、ESA-/CD24+細胞集団に比べ有意に高い spheroid 形成能を有することが認められた。炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独より有意に細胞生存や癌幹細胞様 ESA+/CD24-細胞集団の spheroid 形成能を顕著に抑制することが認められた。ESA+/CD24-割合は、X 線と Lapatinib との併用処置では顕著に増加させるのに対し、炭素線と Lapatinib との併用処置では有意に減少させ、顕著な subG1 や G2/M 期の延長、apoptosis 誘導が認められた。また、BT474 細胞より分離した ESA+/CD24-細胞と ESA-/CD24+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を 24 時間後測定したところ、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べてより多くの γ H2AX foci 数と大きいサイズの γ H2AX foci 残存が認められた。以上より、HER2 陽性乳癌細胞において、ESA+/CD24-細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べより強く乳癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。この結果は、将来的に局所制御率が極めて優れている重粒子と分子標的薬 Lapatinib との併用処置が進行性、転移性 HER2 陽性乳癌治療に有効である可能性を示唆している。一方、Pertuzumab は、HER2 受容体と他の HER 受容体 (EGFR/HER1、HER3 および HER4) との二量化を特異的に阻害するヒト化モノクローナル抗体で、進行性、転移性 HER2 陽性乳癌に有効であることが報告され (3)、炭素線と Pertuzumab との併用効果について次回追ってご報告したい。

参考文献 (下線は代表研究者と共同研究者) :

1. Robidoux A, Tang G 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 Nov;14(12):1183-92.
2. de Azambuja E, Holmes AP et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):1137-46.
3. Swain SM, Kim SB et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):461-71.
4. Cui X*, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3676-87.
5. Sai S*, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamiyo T, Kamada T, and Shirai T. Combination of Carbon Ion Beam and Gemcitabine Causes Unreparable DNA Damage and Death of Radioresistant Pancreatic Cancer Stem-Like Cells In Vitro and In Vivo 2015 *Oncotarget* Mar 20;6(8):5517-35.
6. Sai S*, Vares G, Kim EH, Karasawa K, Wang B, Neno M, Horimoto Y, Hayashi M.

Carbon ion beam combined with cisplatin effectively disrupts triple negative breast cancer stem-like cells in vitro. 2015 Mol Cancer Sep 4;14:166. doi: 10.1186/s12943-015-0429-7.

Sai S = Cui X, *, Corresponding author.

注：本研究は以下の学会で発表。

崔星、林光弘、于冬、堀本義哉、唐澤久美子

重粒子単独或はLapatinibとの併用によるHER2陽性乳癌幹細胞に対する影響

第24回日本乳癌学会総会 2016年6月16日-18日 東京 （予定）

作成日：2016年3月10日