

# AI 耐性乳がん二次治療薬剤耐性の予測マーカー開発とメカニズム解明

藤田保健衛生大学 医学部 生化学 講師 林 孝典

## 1. 研究の背景・目的

乳がんの中で最も罹患率が高いエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんの治療には、アロマターゼ阻害剤 (AIs) を用いたエストロゲン枯渇治療が頻用されており、その治療効果は非常に高い。しかし、いったん AIs 耐性が出現すると治療戦略は困難となってくる。近年、PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路の活性化に伴う ER の異常リン酸化や CDK4/6 の活性化が AIs 耐性の原因である事が明らかになった。2015 年から ER 異常リン酸化に対して mTOR 阻害剤：Everolimus (Eve) が使用開始され、CDK4/6 の活性化には、その阻害薬 Palbociclib (Palb) の臨床応用が始まった。抗がん剤やホルモン受容体アンタゴニストなどの従来治療に加えて分子標的薬も一定の治療成果を上げており、AIs 耐性乳がんの治療戦略は多様化してきている。

Eve や Palb といった分子標的薬は有効だが、薬価が非常に高額である上、治療開始時から耐性を示す症例も多い。治療効果判定に 8-12 週間かかるため患者の QOL と医療経済の観点から、治療開始前に利用可能な効果予測マーカーの発見は急務と言える。本研究では申請者が樹立した細胞株を網羅的に解析し、分子標的薬の効果を予測するバイオマーカー候補を絞って臨床研究に発展させるのが目的である。

申請者が樹立した AIs 耐性モデル細胞株を網羅的に解析し、効果予測マーカーを探索申請者は AIs 耐性乳がん研究のため、モデル細胞株として広く利用される長期エストロゲン枯渇耐性 MCF-7 (LTED) を樹立して解析を行い、AIs 耐性原因の解明に一定の研究成果を上げてきた(引用論文 1, 2)。

LTED 樹立は比較的困難な上、長い期間がかかるため、一般的には 1 株樹立して親株との比較研究を行う研究手法がとられるが、再現性が悪いなどの問題も多い。クローン化された LTED を 30 株も用いて、信頼性の高い AIs 耐性乳がんの基礎研究を計画できるのは世界的にも申請者だけであり、信頼性の高い研究を実施している。

## 2. 材料と方法

### (1) 細胞培養

MCF-7 細胞(ヒト ER $\alpha$  陽性乳癌細胞株)は American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入して用いた。MCF-7 細胞は, 10%ウシ胎児血清 (FBS) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した RPMI 1640 培地 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) を用いて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。エストロゲン枯渇耐性株樹立と維持には 10%チャコールデキストラン (DCC) 処理 FBS (Nichirei Biosciences Inc. Tokyo, Japan) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したフェノールレッド不含 RPMI1640 培地を使用した。CIP2A のノックダウンには stealth RNAi およびそれらの対照用の siRNA を Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。培養細胞の生存率は, Cell Counting Kit 8 (Dojindo Molecular Technologies, MD, USA) を用いて算出した。

#### (2) RNA 精製及び定量 RT-PCR

全 RNA は培養細胞から Pure Link RNA mini キット (Thermo Fischer Scientific) によって精製を行い, Prime Script II 1st Strand Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて cDNA 合成反応を行った。定量 PCR は TaqMan probe 法を用いた。測定に用いた試薬 (TaqManGene Expression Assay 2 種類)を本研究資金から捻出した。

#### (3) Western blotting によるタンパク解析

各種タンパク量はウェスタンブロッティング(WB)法を用いて解析した。サンプルは SDS-PAGE (12 % SDS-polyacrylamide gel) で分離した後に polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (GE Healthcare, UK) に転写, 非特異な抗体の付着を防止するため ImmunoBlock (DS Pharma Biomedical Co., Ltd. 日本) を用いてブロッキングを行った。各種抗体, ER $\alpha$  (1:2000), pER S167 (1:500), および GAPDH (1:2000) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Akt (1:2000), phosphorylated Akt Ser473 (1:1000), S6K (1:1000), phosphorylated S6K (1:1000) , CIP2A (1:1000)は Cell Signaling Technology, Inc., (Danvers, MA, USA)より購入した。各抗体は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo, Inc., Osaka, Japan) を用いて希釈した。検出用の第 4 2 回がんその他の悪性新生物研究助成二次抗体には西洋ワサビペルオキシターゼ標識抗ウサギおよびマウス抗体 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。 研究実績報告書

#### (4) RNA シークエンス

RNA-seq に用いるライブラリーは NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina により調整を行い, Bioanalyzer 2100 High Sensitivity DNA キットにより品質チェック,

KAPA Library Quantification Kit (日本ジェネティクス) により定量を行った。調整したライブラリーはイルミナ HiSeq1500 を用いて解析した。

### 3. 研究結果

#### (1) LTED の網羅的解析

Eve に対する感受性が高い株と低い株の遺伝子発現パターンに差があるかについて、RNA-seq を用いて解析した。その結果、122 の遺伝子で有意な差が認められた。その内、6 遺伝子について検討を進め、Rab31 と DPYSL5 が非常に高い相関を示すことが明らかになった。また、質量分析装置 Orbitrap を用いてプロテオミクス解析を行った結果、Rab タンパクスーパーファミリーの内、Rab5a をはじめ 8 種類に有意差が見られた。Orbitrap に使用したカラム代金は本研究資金から捻出した。

#### (2) Rab31 および DPYSL5 の機能解析

Rab31 と DPYSL5 が実際に予後と関連するかについて Kaplan-Meier (KM) Plotters をもちいて検討した結果、ER 陽性乳がんの内 Rab31 が高発現の患者は発現の低い患者に比べて有意に良い ( $p=0.0058$ ,  $HR=0.79$  (0.67-0.94)) が、ER 陰性乳がんの患者では有意差が見られなかった。一方、DPYSL5 ではいずれの場合も有意な差は見られなかった。

### 4. 考察

AI 耐性乳がんの治療戦略は重要な課題であるが近年、新たに分子標的薬が登場して多様性が増しており、大きな効果を上げている。一方で分子標的薬の効果は個々で大きく異なっており、治療開始時に耐性を示す例も少なくない。我々が樹立した多数の LTED の分子標的薬の感受性は非常に多様であり、AI 耐性乳がんの治療について基礎的な検討や分子標的薬剤に対する治療耐性を解明する有効な手段となりえる。

今回我々が明らかにした Rab31 と DPYSL5 は、Eve や Palb といった分子標的薬の効果予測マーカーとなりえる可能性があり、今後臨床検体を用いた検証実験を行う予定である。現在、乳腺外科をはじめ臨床各科と共同で倫理委員会申請を済ませ、胸腹水からのがん細胞収集体制も既に確立済みであるため 2019 年度以降、本検証を進める予定となっている。さらに、Rab31 は細胞増殖やアポトーシスを誘導するタンパクである上、ER によって転写が調節されると明らかになっている。(引用文献 3, 4) 本研究からも ER 陽性乳がんの予後に関連している可能性があるため、Rab31 と Rab スーパーファミリーが ER 陽性乳がんに対する影響や分子機構の解明を進める必要があると考えている。

5. 文献

1. Takanori Hayashi, Masahiro Hikichi, Jun Yukitake, et al,. Forskolin increases the effect of everolimus on aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Oncotarget*, 9, pp23451-23461, 2018
2. Takanori Hayashi, Masahiro Hikichi, Jun Yukitake, et al,. Estradiol suppresses phosphorylation of ER $\alpha$  serine 167 through upregulation of PP2A in breast cancer cells. *Oncology Letters*, 14, pp8060-8065, 2017
3. Chao-Tao Tang, Qian Liang, Li Yang, et al,. RAB31 Targeted by MiR-30c-2-3p Regulates the GLI1 Signaling Pathway, Affecting Gastric Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Frontiers in Oncology*. 8: 554, 2018
4. Matthias Kotzsch, Thomas Kirchner, Susanne Soelch, et al,. Inverse association of rab31 and mucin-1 (CA15-3) antigen levels in estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer tissues with clinicopathological parameters and patients' prognosis. *American Journal of Cancer Research*, 7(9): 1959-1970. 2017