

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591901

研究課題名(和文) トラスツズマブ耐性に関わる分子機構の解析と新規治療法開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Study for molecular basis of trastuzumab-resistance and the development of novel therapeutic strategies.

研究代表者

杉江 知治 (Sugie, Tomoharu)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70335264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HER2の分子標的薬であるトラスツズマブは、HER2陽性乳癌の予後を劇的に改善した。しかし、今やトラスツズマブ耐性乳癌の克服が、臨床上の重要な課題となっている。本研究では、トラスツズマブの持つ抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)に対し耐性を獲得する分子機構の解明を行った。ADCC耐性乳癌細胞株の遺伝子発現解析から、耐性の獲得には、細胞膜の膜輸送に関わるvATPase(vacuolar type ATPase)が関与していることを見出した。構成ユニットのなかでもB1をコードするATP6V1B1が特異的に耐性機構に関わっており、今後パーフォリン・グランザイム経路との関連が注目される。

研究成果の概要(英文)：HER2-targeted therapy using trastuzumab has dramatically improved the prognosis of HER2-positive breast cancer. However, it becomes the important clinical issue how to overcome trastuzumab-resistant breast cancer. In this study, we addressed the molecular mechanism for acquired resistance to trastuzumab which can activate antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC). Gene expressing profile using ADCC-resistant breast cancer cell line showed that vacuolar type ATPase (vATPase) which drives active membrane transport was associated with ADCC-resistance. ATP6V1B1 gene coding subunit B1 might be specifically responsible for acquired resistance in terms of perforin/granzyme pathway.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：乳癌 HER2 トラスツズマブ 耐性 ADCC

## 1. 研究開始当初の背景

HER2 陽性乳癌は乳癌全体の 15-25%を占め、その増殖、転移能の高さから予後不良乳癌とされていた。しかし、HER2 を標的としたヒト化単クローン抗体であるトラスツズマブの登場により予後は著明に改善するに至った。トラスツズマブの作用機序については不明な点が多いが、HER2 分子との結合による細胞内への取り込みとライソゾームでの分解や HER2/HER3 をはじめとする二量体形成の阻害による細胞内シグナル伝達の遮断、そして抗体依存性細胞傷害活性 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity ; ADCC) による抗腫瘍免疫の活性化などが知られている。しかし、すべての HER2 陽性乳癌に対してトラスツズマブが有効ではなく、約 40%はトラスツズマブによる奏効が得られず、また奏効例でも治療開始 1 年未満に病勢の進行が見られることも少なくない。

現在、トラスツズマブ耐性に関する研究は、HER2 陽性乳癌細胞株をトラスツズマブ存在下で長期間 *in vitro* で培養し、そこで得られた細胞をトラスツズマブ耐性株として利用していることが多い。そのため、耐性と細胞内シグナル伝達経路の変化に関する研究はすすんでいるものの、もうひとつの重要なトラスツズマブの作用機序である抗腫瘍免疫に視点をおいた検討はほとんどなされていない。ADCC 活性については、宿主の Fc RIIa/IIIa 遺伝子多型によって活性に差があることやトラスツズマブ heavy chain Asn297 のフコースを除去した脱フコーストラスツズマブが ADCC 活性を増強し、通常型とくらべて有意に予後を改善することが知られている (Suzuki E, et al. *Clin Cancer Res* 2007.). しかし、ADCC 耐性が獲得される機序については不明な点が多く、腫瘍とエフェクター細胞の両面からこの ADCC 耐性の機序を調べることによって新しい免疫学的なルールを見出すことが期待できる。そしてこの成果から、あらたな

抗 HER2 治療法の開発につながる可能性があり、臨床上非常に重要であると考えられる。

以上を背景としてトラスツズマブ耐性獲得に関わる分子機構を解析し、耐性を克服する新規治療法 開発のための基礎的検討を行う研究を計画した。

## 2. 研究の目的

- (1) HER2 陽性ヒト乳癌細胞株を用いて、トラスツズマブを介した抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) 抵抗性の細胞株を樹立する。
- (2) ADCC 耐性株を用い、トラスツズマブ存在下の細胞傷害活性を親株と比較検討する。
- (3) ADCC 耐性株の遺伝子発現パターンを親株と比較し、耐性獲得において発現が増強もしくは低下している遺伝子を同定する。
- (4) 同定した遺伝子の発現が、親株と ADCC 耐性株の間で差があるのかを比較検討する。さらに親株に対して同定した遺伝子の発現調整 (ノックダウン等) を行い、ADCC に対する感受性に変化があるかを検討する。
- (5) 以上の検討からトラスツズマブ耐性の分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ADCC 耐性株の樹立

HER2 陽性乳癌細胞株である SKBR3 と健常者末梢血より分離した末梢血単核球 (peripheral mononuclear cell; PMBC) をトラスツズマブ 1  $\mu$ g 存在下に 4-9 時間培養する。その後、この細胞混合液より MACS cell separation system を用いて CD45 陽性細胞を除去し、残った SKBR3 を回収する。同様の操作を 7 回行い、最終的に残った SKBR3 を ADCC 耐性株とする。

### (2) トラスツズマブを用いた ADCC 活性の測定

親株および樹立した ADCC 耐性株を標的として、健常者 PMBC をトラスツズマブ存在下に E/T 比 10:1 で共培養し、LDH assay 法によって ADCC 活性を測定する。

(3) DNA マイクロアレイを用いて親株と ADCC 耐性株の DNA 発現プロファイルを比較検討し、ADCC 耐性に関わる遺伝子候補を抽出する。

(4) 抽出した遺伝子の発現が、実際に 親株 と ADCC 耐性株との間に差があるのかを real-time PCR 法を用いて mRNA レベルで評価する。

(5) 親株である SKBR3 に対して sh-RNA によって遺伝子ノックダウンを行なった細胞を標的として ADCC アッセイを行い、同定遺伝子と ADCC 耐性との関連を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) トラスツズマブ存在下において E/T 比 10:1 で行った ADCC 活性において、ADCC 耐性株である SKr は親株である SKBR3 と比較して抵抗性を示した (図 1)

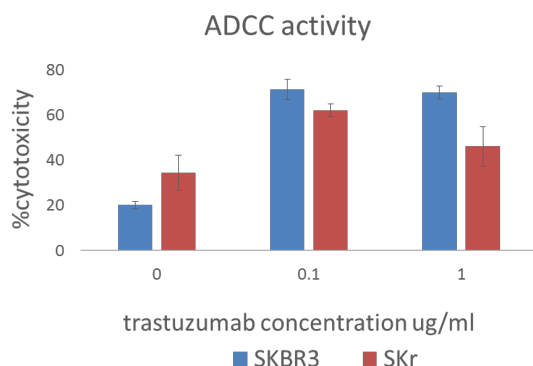


図 1 ADCC 耐性細胞と親株と ADCC の比較

(2) DNA マイクロアレイにおいて親株と比較して発現に差のあった遺伝子のなかで特に細胞膜輸送に関わる vATPase (vacuolar type ATPase) の構成分子の一つである、ATP6V1B1 の有意な減弱がみられた。vATPase は細胞膜やエンドソームや小胞、リソソームなどの細胞小器官の膜上に存在し、主に H<sup>+</sup> を取り込み、膜内部を酸性化することにより pH を調節し、その結果膜輸送に関与しているとされる。実際、qRT-PCR 法による遺伝子発現解析でも ATP6V1B1 の発現は、SKBR3 とくらべ SKr で有意に減弱していた (1.0 vs 0.5)。

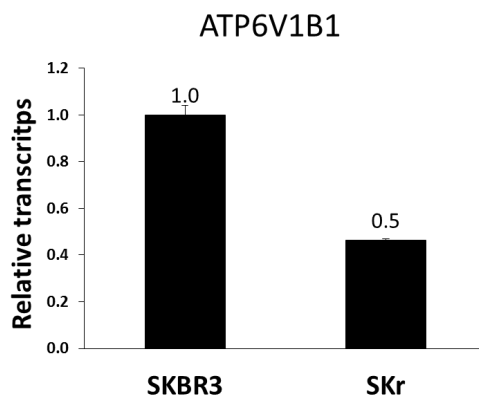


図 2 ADCC 耐性株 SKr における ATP6V1B1 発現

(3) sh-RNA を用いて親株の ATP6V1B1 遺伝子をノックダウンした細胞株 shATP6V1B1 を作製した。ノックダウン細胞では、親株と比べ ATP6V1B1 遺伝子発現は低下し (図 3)、細胞傷害アッセイでも有意に低い ADCC 活性を示した (図 4)。

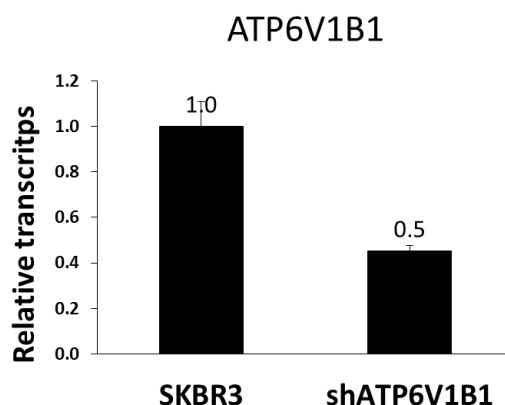
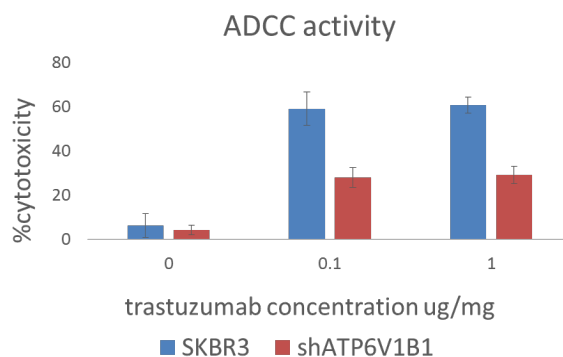


図 3 ATP6V1B1 ノックダウン細胞における ATP6V1B1 遺伝子発現



#### 図4 ATP6V1B1 ノックダウン細胞における ADCC 活性

以上より、ATP6V1B1 は ADCC 耐性獲得に関わる因子の一つであることをより強く示す重要な成果となり、かつ V1B1 分子が特異的に耐性機構に関わっていることが示唆された。

(4) これまでの結果から、ATP6V1B1 が ADCC 耐性に関わる特異的分子であることが強く示唆された。現在 ADCC 耐性株獲得メカニズムにおいて、パーフォリン/グランザイム経路で惹起される標的細胞のアポトーシス経路の膜輸送の過程において、vATPase が関与していると仮説を立てている。今後はこの仮説を検証するため、パーフォリン/グランザイムのリコンビナントを用い、耐性株/ノックアウト細胞で ADCC 活性の低下がみられるかを検証する予定である。この実験で仮説通りであれば、次にパーフォリン/グランザイムの細胞内移動と、ATP6V1B1 の関係について焦点をあてていきたい。また、親株と作製したノックアウト細胞をマウスに移植し同様の結果が得られるか、*vivo* での実験を予定している。

#### 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4件)

- 1) Sugie T. Immune-based mechanism in the treatment against breast cancer Jpn J Breast Cancer.2015; 30: 95-100. (査読無)
- 2) Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Furuhata A, Suzuki E, Toi M, Tsuruyama T, Okayama Y, Haga H.  
The killer cell Ig-like receptor 2DL4 expression in human mast cells and its potential role in breast cancer invasion.

Cancer Immunol Res. 2015; doi: 10.1158/2326-6066. (査読有)

3) Suzuki E, Kataoka T, Hirata M, Kawaguchi K, Nishie M, Haga H, Toi M BMC Cancer.2014; 12:39. (査読有)

4) Sumi E, Sugie T, Yoshimura K, Tada H, Ikeda T, Suzuki E, Tanaka Y, Teramukai S, Shimizu A, Toi M, Minato N Effects of zoledronic acid and the association between its efficacy and T cells in postmenopausal women with breast cancer treated with preoperative hormonal therapy: a study protocol. J Transl Med. 2014; 12: 310. (査読有)

[学会発表](計8件)

1) 杉江知治. 乳がん腫瘍浸潤リンパ球の意義と今後の課題、第23回日本乳癌学会学術総会,2015/7/2-4, 東京都.

2) 鈴木栄治, 荒武淳一, 河口浩介, 田中直, 西江万梨子, 平田勝啓, 片岡 竜貴, 戸井雅和. 乳癌におけるトラスツズマブを介した抗体依存性細胞傷害活性における単球とNK細胞の役割. 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/3-5, 京都府・京都市.

3) Suzuki E, Nishie M, Kawaguchi K, Tanaka S, Toi M. Loss of HER2 via trogocytosis by CD14+ cells in HER2 overexpressing breast cancer cells are associated with diminishing of trastuzumab mediated antibody dependent cellular cytotoxicity. AACR Annual Meeting, 2014/4/5-9, San Diego (USA).

4) Aratake J, Suzuki E, Uehiro N, Kawaguchi K, Tanaka S, Nishie M, Sato F, Toi M. Trogocytosis of HER2 overexpressing human breast cancer cell lines. AACR Annual Meeting, 2014/4/5-9, San Diego (USA).

5) Kawaguchi K, Suzuki E, Kawashima M, Toi

M. High neuropilin-1 expression on monocytes is positively associated with trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of the HER2-overexpressing breast cancer cell line. AACR Annual Meeting, 2014/4/5-9, San Diego (USA).

6) Nishie M, Suzuki E, Kawaguchi K, Sakamoto K, Fukushima Y, Hattori M, Sugie T, Toi M. AACR Annual Meeting, 2014/4/5-9, San Diego (USA).

7) 鈴木栄治、佐藤史顕、河川浩介、杉江知治、戸井雅和. ヒト乳癌細胞がトラスツマブを介した抗体依存性細胞傷害完成に対する耐性能を獲得するメカニズムの解明. 第 21 回日本乳癌学会学術総会, 2013/6/27-29, 静岡県・浜松市

8) 鈴木栄治、佐藤史顕、竹内恵、上野貴之、杉江知治、戸井雅和. Trastuzumab を介した抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) 耐性乳癌細胞株の樹立. 第 20 回日本乳癌学会学術総会, 2012/6/28-30, 熊本県・熊本市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

杉江知治 (SUGIE TOMOHARU)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70335264

### (2)研究分担者

鈴木栄治 (SUZUKI EIJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 00612897

佐藤史顕 (SATO FUMIAKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 20467426