

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461945

研究課題名(和文) トラスツズマブ獲得耐性の機序:TGF-β/SMAD経路と上皮間葉転換の関与

研究課題名(英文) Involvement of TGF-beta/SMAD signaling in trastuzumab resistance

研究代表者

下田 雅史 (Shimoda, Masafumi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30644455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：目的：TGFβ及びその下流のSMAD経路が抗HER2薬に対する耐性化に関与しているかを明らかにする。

結果：TGFβ-SMAD3経路の持続的な活性化は、HER2陽性乳癌細胞において抗HER2薬耐性化及び癌幹細胞形質を誘導した。SMAD3の活性化はトラスツズマブ(Tz)耐性に関わる複数の遺伝子の転写調節に関わっていた。乳癌組織における核内SMAD3の発現とTzを含む化学療法の病理学的奏功の間には負の相関が認められた。SMAD3を阻害すると、TGFβによる薬剤耐性化が阻止され、Tz耐性細胞におけるTz感受性が回復した。

結論：TGFβ-SMAD3経路は抗HER2薬に対する耐性化とその維持に関与する。

研究成果の概要(英文)：Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of TGFβ and its downstream SMAD pathway on resistance to anti-HER2 drugs.

Results: We found that continuous activation of the TGFβ-SMAD3 pathway induced resistance to anti-HER2 drugs and cancer stem cell traits in HER2-positive breast cancer cells. The induction of drug resistance by TGFβ required strong activation of SMAD3. In fact, activated SMAD3 regulated multiple genes that harbor SMAD-binding elements and are involved in trastuzumab resistance. Nuclear SMAD3 expression in tumor tissue was inversely correlated with sensitivity to neoadjuvant treatment with trastuzumab. Small inhibitor of SMAD3 not only prevented the acquisition of resistance to anti-HER2 drugs but also restored trastuzumab sensitivity in trastuzumab-resistant cells.

Conclusions: This study indicates that the TGFβ-SMAD3 pathway plays an important role in the induction and maintenance of resistance to anti-HER2 drugs.

研究分野：乳癌外科学

キーワード：乳癌 HER2 TGF-beta SMAD3 トラスツズマブ ラパチニブ 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膜型受容体チロシンキナーゼである human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)は15-25%の浸潤性乳癌で高発現しその悪性度を高めている。HER2 タンパクの細胞外ドメイン IV に結合するヒト化モノクローナル抗体である trastuzumab (Tzm)はHER2 陽性乳癌を予後を劇的に改善するが、依然としてその薬剤への耐性はHER2 陽性乳癌治療の大きな障壁となっている。例えば、進行再発乳癌の80%以上は1年半以内にTzmに耐性を示す (Slamon et al., *New Engl J Med*, 2001)。

近年、上皮間葉転換(EMT)が癌の浸潤・転移と密接に関わっており、一部の化学療法薬に対する耐性化にも寄与することが明らかとなってきた (Singh and Settleman, *Oncogene*, 2010)。実際、EMTを誘導するSNAIL2やintegrinの一部はTzmの耐性化に関与している。しかし、EMTを誘導するシグナルとして最も知られているTGFβ/SMAD経路の活性化がTzmやlapatinib (Lap)といった抗HER2薬への耐性化に関与するかどうかは申請時点まで不明であった。

2. 研究の目的

- (1) TGFβ/SMAD経路の活性化がTzmやLapに対する耐性化に関与するかどうかを基礎実験で明らかにし、それが臨床に当てはまるかどうかを臨床検体を用いて検討する。
- (2) TGFβ/SMAD経路において、現在開発されている薬剤の標的分子はTGFβ及びTGFβ受容体であるが、それ以外にSMADが新たな標的分子となりうるかどうかを検討する。

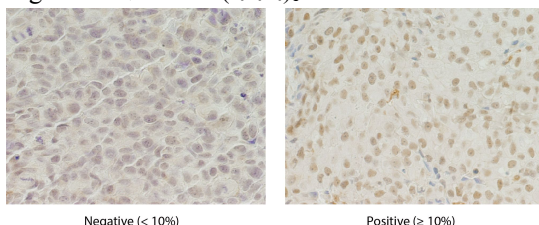
3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Tzm/Lap耐性誘導のため、TGFβ添加低血清培地でHER2陽性乳癌細胞を14日間培養した。その後、細胞をTzmまたはLap存在下で7日間培養し、WST-8 (同仁化学研究所)による比色法またはINCellAnalyzer 6000 (GE Healthcare)を用いて細胞数を測定した。

(2) SMAD3免疫組織化学染色 (IHC)

対象は当科においてpaclitaxel (PTX)と5FU + epirubicin + cyclophosphamide (FEC)にて術前化学療法を施行されたHER2陽性乳癌全例(72例)。種々の理由により11例が除外され、術前Tzm併用群37例と非併用群24例を解析した。解析前に、核内SMAD3陽性細胞が10%以上のものをpositive、10%未満のものをnegativeと定めた(下図)。



検鏡は2名で行い、最後に病理医がレビュー

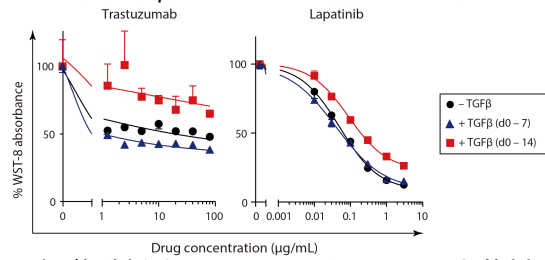
した。この研究では大阪大学医学部附属病院倫理審査委員会で承認され同意が得られた症例を対象に行われた。

4. 研究成果

(1) TGFβによるTzm/Lap耐性の誘導

まず、HER2陽性乳癌細胞株において、TGFβによる刺激がTzm/Lapに対する耐性を誘導するかを検討した。細胞株にはSKBR3を用いた。14日間のTGFβ刺激によりTzm及びLapに対する耐性が生じた。7日間の刺激では耐性化は生じなかった(下図)。

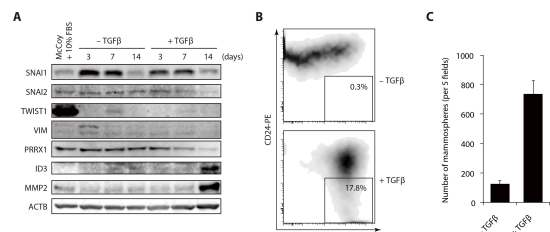
なお、TGFβで14日間刺激をすると、細胞増



殖が抑制される。このため、見かけ上薬剤に対する感受性が低下した可能性があった。そこで、TGFβ刺激細胞における細胞死の有無を測定したところ、TGFβで刺激しない場合よりも有意に細胞死が抑制されていた。

(2) TGFβによる癌幹細胞形質の誘導

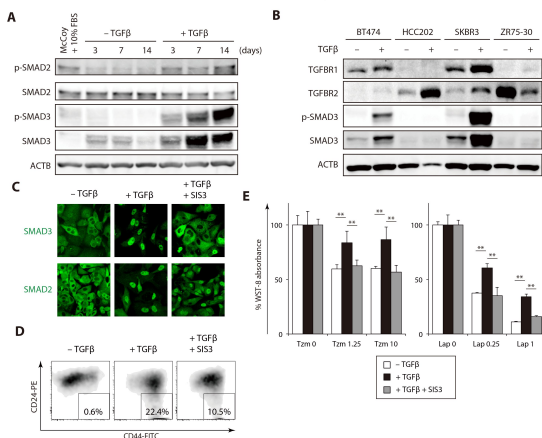
癌細胞においてEMTがいわゆる癌幹細胞形質をも誘導することが知られている (Mani et al., *Cell*, 2008)。癌幹細胞は治療抵抗性と密接に関連していることから、TGFβ刺激によって癌幹細胞形質が誘導されるかどうかを検討した。SKBR3はEMTで重要な役割を持つE-cadherinを欠損しているため、明確なEMTマーカーの発現を示さなかったが、CD44+CD24-画分の増加(下図A)や癌幹細胞マーカーであるID3やMMP2のupregulation及びPRRX1のdownregulationを示した(下図B)。さらにmammosphere形成能も著明に増強していた(下図C)。このことから、TGFβの刺激により癌幹細胞形質が誘導され、Tzm/Lap耐性を示した可能性が考えられた。



(3) Tzm/Lap耐性化におけるSMAD3の役割

TGFβはTGFβ受容体と結合するとSMAD2/3をリン酸化する。その結果、SMAD2/3はSMAD4と結合して核内に移行し種々の遺伝子の転写活性を調節する。そこで、TGFβ刺激によるSMAD2/3の活性化とTzm/Lap耐性化との関連を調べた。SKBR3においてTGFβの刺激はSMAD3の強いリン酸化を誘導したが、

SMAD2 のリン酸化の誘導はわずかであった(下図 A)。他の 3 つの HER2 陽性乳癌細胞株を用いて TGFβ による抗 HER2 薬耐性化の誘導とリン酸化 SMAD3 の関連を調べたところ、SKBR3 以外の細胞株では TGFβ 刺激によっても耐性化は生じず、SMAD3 のリン酸化はわずかに誘導されるのみであった(下図 B)。また、CD44+CD24- の癌幹細胞分画も全く増加しなかった。したがって、TGFβ 刺激による Tzm/Lap 耐性化には SMAD3 の活性化が関与している可能性が考えられた。次に SMAD3 の低分子阻害薬である SIS3 を用い、SMAD3 阻害と Tzm 耐性との関連を検討した。SIS3 による SMAD3 のリン酸化の抑制は明らかでなかったが、SIS3 は SMAD3 の核内移行を阻害した(下図 C)。また、TGFβ 刺激による CD44+CD24- 画分の増加を抑制すると同時に Tzm/Lap への耐性化を完全に阻止した(下図 D, E)。以上より、TGFβ による Tzm/Lap 耐性の誘導には SMAD3 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



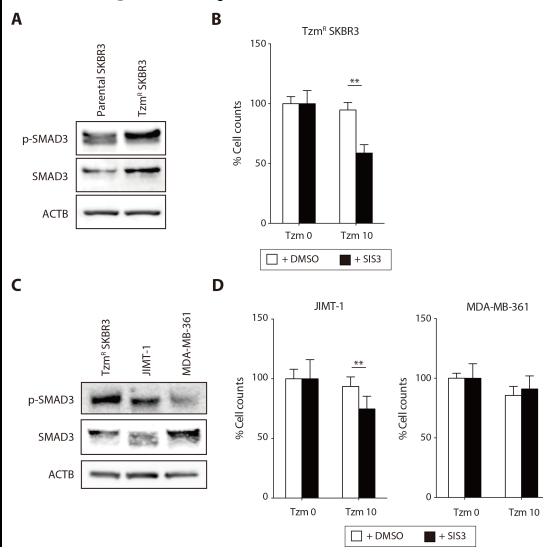
(4) 核内 SMAD3 と術前化学療法の病理学的奏功との関連

上記の結果から、TGFβ による SMAD3 の活性化、中でも SMAD3 の核内移行が Tzm/Lap に対する耐性化に重要な役割を果たしていることが判明した。そこでこの in vitro の結果が臨床的に当てはまるかどうかを検証するために、HER2 陽性乳癌で Tzm を含む術前化学療法を施行された患者群を対象として、治療前の乳癌における核内 SMAD3 の発現が術前治療の効果と相関するかどうかを調べた。方法欄で述べた通り、61 例で核内 SMAD3 の発現を調べたところ、35 例が核内 SMAD3 陰性、26 例が陽性であった。核内 SMAD3 の発現と臨床病理学的因子との関連を検討したところ、過去の報告に一致して核内 SMAD3 陽性と低い組織学的グレードが有意に関連していた($P = 0.042$)。Tzm 併用術前化学療法を施行された 37 例のうち、病理学的完全奏功が得られた(pCR)のは 25 例、得られなかった(non-pCR)のは 12 例であった。pCR と臨床病理学的因子及び核内 SMAD3 との間の関連を検討したところ、pCR と関連していたのは閉経($P = 0.029$)、ホルモン受容体陰性($P = 0.035$)、及び核内 SMAD3 陰性($P = 0.036$)であった。

また、同様の解析を Tzm 非併用群 24 例で行なったところ、症例数が少ないためいずれの因子とも関連は認められなかった。以上より、核内 SMAD3 が Tzm 併用化学療法の効果と相関することから、HER2 陽性乳癌に対する Tzm の薬効を果たす上で、SMAD3 の活性化の有無が重要であることが明らかとなった。

(5) SIS3 による Tzm 耐性の解除

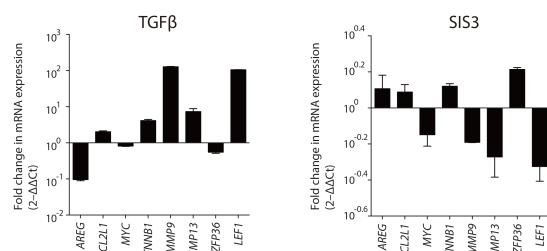
SIS3 によって Tzm 耐性細胞の感受性が回復するかどうかを検討した。まず、SKBR3 細胞を Tzm 存在下で半年以上培養し、Tzm 耐性 SKBR3 細胞を作成した。Tzm 耐性株では親株に比してリン酸化 SMAD3 の増加を認めた(下図 A)。そこで、SIS3 を Tzm 耐性株に 3 日間作用させたのちに Tzm 感受性を検討したところ、SIS3 で前培養したものでは有意に感受性の回復が認められた(下図 B)。また、Tzm 耐性であることが報告されている JIMT-1 細胞株及び MDA-MB-361 細胞株における SIS3 の効果を検討した。JIMT-1 はリン酸化 SMAD3 が Tzm 耐性 SKBR3 と同程度あるのに対し、MDA-MB-361 ではリン酸化 SMAD3 がほとんど認められなかった(下図 C)。これらの細胞株を SIS3 で 3 日間前培養すると、JIMT-1 においては感受性の回復が認められ、MDA-MB-361 では認められなかった(下図 D)。以上より、SIS3 によって SMAD3 の機能を阻害すると、Tzm に対する感受性が回復することが明らかとなった。したがって、Tzm 耐性化の維持にも SMAD3 の活性化が重要であることが示された。



(6) SMAD3 による Tzm 耐性関連遺伝子の発現制御

SMAD3 は核内で SMAD binding element (SBE) と呼ばれる特定の DNA 配列に結合し、各種遺伝子の発現を制御する。そこで、SMAD3 による Tzm 耐性化の機序の一端を明らかにするために、SBE を持っていて Tzm 耐性・感受性との関連が報告されている 9 遺伝子の発現が SMAD3 で調節されているかどうか

かを定量的 RT-PCR にて検討した。9 遺伝子のうち、定量が可能であった 8 遺伝子が TGFβ 刺激や SIS3 によりどのように発現が変動しているかを検討した。Tzm 耐性との関連が報告されている *MMP9*、*MMP13* 及び *LEF1* は TGFβ によって発現が上昇し、SIS3 によって発現が低下した。Tzm 感受性の維持との関連が報告されている *ZFP36* は前 3 遺伝子とは逆の発現変動を示した(下図)。したがって、SMAD3 は Tzm 耐性・感受性に関連する複数の遺伝子の発現制御を行うことにより、Tzm に対する耐性化を引き起こしていることが示唆された。



(7) 考察と展望

本研究により、TGFβ-SMAD3 経路が Tzm/Lap の耐性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TGFβ は乳癌組織中に存在することが過去の研究で示されており、TGFβ が乳癌を含む腫瘍の進展に関与することが種々の基礎的・臨床的研究により明らかになってきた。TGFβ の細胞内シグナル経路で中心的な働きをするのが SMAD2/3 である。SMAD2/3 の HER2 陽性乳癌における意義は今まで明らかでなかったが、本研究により SMAD3 が種々の Tzm/Lap 耐性化・感受性維持に関与する遺伝子の発現を促進・抑制し、これらの薬剤の効果を減弱させることが示唆された。現在まで抗腫瘍効果を狙って TGFβ 経路を抑制する薬剤の開発が行われてきたが、それらの薬剤の標的分子は TGFβ または TGFβ 受容体のみであった。しかし、本研究により SMAD3 が新たな治療標的となりうる可能性が示され、今後の薬剤開発が期待されることである。また、HER2 陽性乳癌細胞で Tzm に対する耐性を獲得した細胞株を用い、次世代シーケンサーによる発現解析を行っている。パスウェイ解析では TGFβ 経路が上位に位置しており、本研究の結果を支持するものである。今後、gene signature を作成して、Tzm 感受性を遺伝子発現解析で予測することも計画している。

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)

[学会発表](計 2 件)

千原 陽子 他、TGFβ-SMAD3 経路の持続的活性化による抗 HER2 薬に対する耐性化の誘導、第 24 回日本乳癌学会学術総会、2016 年 6 月 17 日、東京都

Masafumi Shimoda, et al., Importance of TGFβ-SMAD3 axis in resistance to anti-HER2 drugs. San Antonio Breast Cancer Symposium, December 10, 2015, Texas, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

下田 雅史 (SHIMODA, Masafumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30644455

(2)研究分担者

直居 靖人 (NAOI, Yasuto)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30646211

(3)研究協力者

千原 陽子 (CHIHARA, Yoko)