

# AI 耐性乳がんのがん幹細胞性形質と薬剤耐性の関係

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

【背景】 エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんの多くは、エストロゲンによって成長・増悪するため、エストロゲン合成酵素アロマターゼの阻害剤 (AI) を用いたエストロゲン枯渇治療が実施される。AI を用いた治療効果は非常に高いが、いったん治療耐性になると他の薬剤に対する耐性も獲得している症例が多く、その治療戦略は困難となってくる。我々は ER 陽性乳がん細胞株から樹立した AI 耐性乳がんモデル細胞株である長期エストロゲン枯渇耐性株 (LTED) を樹立して検討した結果、LTED では上皮間葉転換 (EMT) の亢進やがん幹細胞性形質の増加が確認された。近年、AI 耐性乳がんの分子生物学的な研究がすすめられ、mTOR 阻害剤 Everolimus (Eve) や CDK4/6 の阻害薬 Palbociclib (Palb) といった分子標的薬が有効であると明らかになった。

我々はこれまでに、AI 耐性乳がんモデル細胞株 (LTED) を 30 株樹立し、AI 耐性乳がんの分子機構について研究してきた。(T Hayashi al., Oncotarget. 2018)。樹立した細胞株の中には、初めから分子標的薬に抵抗性を持つ細胞が存在し、それらの細胞は分子標的薬によって上皮間葉転換 (EMT) が誘導されてしまう。(未発表データ) 実際には、Eve や Palb によって病態悪化を招く患者が居ると示唆されており、一部の AI 耐性乳がん患者にとって、分子標的薬が病態を増悪させる可能性がある。

【目的】 大規模な疫学調査から Eve や Palb といった分子標的薬が有効であるのは明らかだが、薬価が非常に高額である上、一部の患者に対しては不利益となる可能性がある。本研究では以下の①②の検討を通して、AI 耐性乳がんの持つ多剤耐性の分子機構解明と臨床検体を用いて検証する。

①樹立した細胞株を網羅的に解析し、分子標的薬の効果と関連する遺伝子を絞りこむ。

②薬剤の効果に関連する遺伝子の機能を解析する。

これらの研究を通じて将来的に新たな治療標的分子の発見を目標としている。

## 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 1 次抗体は 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。

## 3. 研究結果

① CDK4/6 阻害薬抵抗性を持つ細胞 3 株と感受性が強い細胞 3 種類に対して RNAseq を実施し, 27 種類の遺伝子で有意な差が得られた。その内, 発現量の差が大きな 6 種類を選び, 詳細に解析を行った。その結果, 低分子量 G タンパク質 Rab31 が Palb の感受性と相関するバイオマーカーである可能性を見出した。

② Rab31 をノックダウンさせることによりパルボシクリブの抵抗性を増加させられることを見出した。併せて, 分子生物学的な EMT の評価は, 上皮性マーカー (E-カドヘリン,

サイトケラチン, Claudin) と間葉性マーカー (N-カドヘリン, SNAI1/2, ZEB1, TWIST) の発現量も測定した。その結果, CDK4/6 阻害薬に対して抵抗性を持つ LTED では上皮性マーカーが低下し, 間葉性マーカーの内 ZEB 1 の mRNA およびタンパクの増加が確認できた。

また, Kapan Meier Plotters による解析を行った結果, Rab31 はエストロゲン受容体陽性乳がん患者においてのみ, 予後を改善する因子であり, HER2 陽性 ER 陰性乳がん患者にとって, Rab31 は予後不良因子であることが分かった。

#### 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 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 2020 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 1, 2) 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。

今回得られた研究成果は 2 報の英文論文とする予定であり, 現在 1 報が投稿中, もう 1 報が投稿準備中となっている。

#### 5. 文献

1. Chao-Tao Tang, Qian Liang, Li Yang, et al.,. RAB31 Targeted by MiR-30c-2-3p Regulates the G1I1 Signaling Pathway, Affecting Gastric Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Frontiers in Oncology*. 8: 554, 2018
2. 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