

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：朱 婧
専攻分野：応用分子腫瘍学 指導教授：太田 智彦
主論文の題目： Alteration of Trop-2 Expression in Breast Cancer Cells by Clinically Used Therapeutic Agents and Acquired Tamoxifen Resistance (臨床で使用する治療薬ならびにタモキシフェン耐性獲得による乳がん細胞におけるTrop-2の発現変化)
共著者： Wenwen Wu, Yukiko Togashi, Naoe Taira Nihira, Yoshikazu Johmura, Dajiang Zhu, Makoto Nakanishi, Yasuo Miyoshi, Tomohiko Ohta

### 緒言

加水分解性に抗がん剤が放出される抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate: ADC) は、高い bystander 効果による殺細胞作用を有し、がん治療のゲームチェンジャーとして期待されている。 Sacituzumab Govitecan (SG) は抗 Trop-2 抗体とイリノテカン (CPT-11) 活性代謝産物 SN-38 を加水分解性リンカーで結合させた ADC で、トリプルネガティブ乳がん (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC) に対して極めて良好な腫瘍縮小、予後改善効果を示したことから早急に FDA で承認された新治療薬で、治療抵抗性 Luminal 乳がんにも同等の効果が期待されている。 Trop-2 は多くのがんで発現が亢進する膜タンパク質で、SG の効果は Trop-2 の発現に依存するが、その発現制御に関する報告は少なく、特に臨床で用いられる治療による変化は全くわかっていない。そこで本研究では薬剤や放射線処理が Trop-2 の発現に及ぼす影響を明らかにし、SG の効果に干渉しうる可

能性を検討した。

## 方法・対象

1) 以下の細胞株を用いた。乳がん細胞：MCF-7、T47D、ZR-75-1、BT474、HCC1500、HCC1937、MDA-MB-361、MDA-MB-231、正常乳腺細胞：MCF10A、胎児腎細胞：HEK293T、子宮頸がん細胞：HeLa。2) タモキシフェン (Tamoxifen, TAM) 耐性細胞株は MCF-7, T47D, ZR-75-1 細胞を IC<sub>90</sub> で 24 時間、IC<sub>50</sub> で 1 ヶ月ないし 3 ヶ月 TAM 処理した後に安定的に増殖する細胞を選別した。3) 薬剤としては各種ホルモンおよび成長因子、キナーゼ阻害剤、化学療法剤、TAM を、放射線は X 線を用いた。4) 遺伝子発現抑制は siRNA にて行った。5) タンパク質発現はウェスタンブロット、mRNA 発現は定量 RT-PCR にて解析した。6) Trop-2 の転写活性は Trop-2 遺伝子のプロモーター領域 (-838~-1) をクローニングし、ルシフェラーゼレポーター-pGL10.4 にサブクローニングしたものを HEK293T 細胞にトランスフェクションして解析した。遺伝子変異は Site-directed mutagenesis 法を用いた。7) 統計処理は Student's t-test と ANOVA 解析を用い p<0.05 を有意とした。

## 結果

1) 乳がん細胞における Trop-2 の発現レベルは Intrinsic Subtype にかかわらず多様で、タンパク質の安定性ではなく、mRNA 発現レベルでの違いによるものと考えられた。2) エストロゲンおよび各種成長因子では Trop-2 発現に変化は認められなかったが、CPT-11 以外の各種化学療法剤および放射線では発現が低下した。キナーゼ阻害剤では AKT 阻害剤 MK2206、RSK 阻害剤 BI-D1870 および p38 MAPK 阻害剤 SB202190 で発現の低下が認められた。一方、CPT-11 処理した細胞のうち T47D と HCC1500 細胞で Trop-2 の発現が増加した。特に重要な変化として、解析した全ての Luminal 細胞株、MCF7、T47D、ZR-75-1 および HCC1500 細胞において、TAM 添加後 24 時間および 48 時間で Trop-2 の発現はタンパク質および mRNA レベルにおいて有意に増加した。3) さらに、TAM 耐性を獲得した MCF7、T47D および ZR-75-1 においても Trop-2 の発現は 2 倍から 3 倍程度に有意に増加していた。この作用は TAM 添加による一過性の効果ではなく、TAM を除去した後もこれらの耐性獲得細胞では Trop-2 の発現増加が持続していた。4)

TAMによるTrop-2の発現増加のメカニズムとして、Trop-2のプロモーター領域にはE-box配列が存在することに着目した。E-boxに結合するオートファジーの主要転写因子であるTFEBがTAMによって脱リン酸化し、活性化型となる独自の事前の知見から、TFEBがTAMによるTrop-2発現を担う転写因子と考えた。そこでTFEBをsiRNAにて発現抑制したところ、Trop-2の発現は抑制され、TAMによる増強も完全にブロックされた。5) さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイによってTFEBによるTrop-2の転写誘導はプロモーター領域のタンデムなE-boxモチーフによることを明らかにした。このTFEBによる転写誘導はGSK3 $\beta$ によって抑制された。

### 考察

TNBCに対する第3相ランダム化比較試験においてSGは著効を示したが、Trop-2低発現の群においても高い確率で奏効例が認められることから、感受性マーカーとしてのTrop-2については疑問が持たれている。この試験で用いた検体は初診時あるいは初回手術時の乳がん保存検体である。本研究の結果から、その後の治療を考慮してSGの治療戦略を考える必要があることが推察された。治療抵抗性Luminal乳がんにおいてもSGの有効性が示されているが、今後、既治療あるいは併用するTAMの効果を明らかにしていく必要がある。本研究ではTrop-2の発現がTFEBによって誘導されること、それをTAMが促進することを世界に先駆けて明らかとした。また、TFEBによるTrop-2の転写誘導はGSK3 $\beta$ によって抑制されること、AKT、RSKおよびp38MAPK阻害剤がTrop-2の発現を抑制すること、これらのキナーゼがGSK3 $\beta$ をリン酸化して抑制することから、これらのキナーゼ阻害剤がGSK3 $\beta$ の活性化、TFEBの抑制を介してTrop-2の発現を抑制することが示唆された。

### 結論

SGの治療効果に必要なTrop-2の発現は既治療および併用薬で左右されるため、保存検体の発現解析では感受性予測が不十分なこと、また、併用薬としてTAMが有効であることが示唆された。