The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Eph receptor A10 の乳がん標的としての検証
Author(s)	長野, 一也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52257
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　長野　一也　）	
論文題名	Eph receptor A10の乳がん標的としての検証

論文内容の要旨

乳がんは、女性が最も罹患する割合の高いがんであり、患者数は年々増加している。そのため現在では、生涯に乳がんを患う日本人女性は、14人に1人とも言われ、乳がんは女性であれば誰もが患う可能性のある疾患になりつつある。そのうえ、死亡者数も増加の一途を辿っており、乳がんに対する治療成績の向上が求められている。このような背景のもと、薬物療法においては、乳がん細胞の増殖に関わるHer2受容体やホルモン受容体（ER/PR)を標的とした治療薬(抗Her2抗体やER拮抗薬など)が数多く開発され、適用症例の予後が改善されている。しかし、これら薬剤が適用可能なHer2、またはER/PR陽性症例であっても、治療を続けるうちに、その2-3割に耐性が生じ、これら治療薬を使用できなくなることが問題となっている。また、Her2/ER/PRの発現が全て陰性のTriple Negative乳がん（TNBC)に至っては、これら薬剤を適用することさえできず、有効な治療薬が乏しい現状にある。そのため、上記の症例に対しては、新たな分子標的治療薬の創出に期待が寄せられており、その開発を推進するための治療標的の同定が求められている。

その点、当研究室ではこれまでに、治療標的の候補となる疾患関連蛋白質を効率よく探索可能な「抗体プロテオミクス技術」を開発してきた。そこで、乳がんの治療標的探索に本技術を適用したところ、正常乳腺組織では発現が認められず、乳がん組織でのみ発現している新規乳がん関連蛋白質を見いだすことに成功している。その中でも、特性が未解明であったEph receptor A10（EphA10)に着目して解析した結果、乳がんにおける病期の進行などにEphA10の発現が相関することをこれまでに明らかとし、EphA10は乳がんの悪性化に関与している可能性があることを示してきた。さらに、EphA10は、16種類のヒト正常組織において、精巣以外では発現が認められなかったことから、がん組織特異性の高い受容体であり、乳がんの有望な治療標的候補と考えられる。

しかし、分子標的治療薬の薬効と副作用が、標的分子の発現組織とその機能に依存することを考えれば、上述した発現特性に関する若干の知見のみでEphA10の治療標的としての適性を判定することは到底できない。したがって、EphA10を標的とした治療法の開発を進めるためには、EphA10の乳がん組織/正常組織での発現特性をより詳細に解析し、発現組織での機能を明らかにすることが必要である。

そこで本研究では、乳がんに対する新規分子標的治療薬の開発を目指し、EphA10の治療標的としての有用性を検証した。

まず始めに、EphA10が発現する乳がん症例の特徴を理解すべく、Her2/ER/PRの発現分布から分類された乳がんの各サブタイプ(Luminal A, Luminal B, Her2-enriched, TNBC)におけるEphA10の発現を解析した。その結果、EphA10は、いずれのサブタイプにおいても50-60％ほど発現していることが判明した。さらに、EphA10陽性症例を発現レベルによって3段階に分けて解析したところ、EphA10は特に、Her2-enrichedに高発現症例が多い傾向が認められた。また、症例数は少なかったものの、TNBC症例にも、高発現症例が認められた。したがってEphA10は、抗Her2抗体が無効な症例や、いまだ有効な治療薬のないTNBC症例に対する治療標的候補であることが示唆された。その一方で、安全性の高い分子標的治療薬を開発するためには、標的分子が、がん組織特異的に発現していることが重要である。その点、冒頭でも述べたように、当研究室ではこれまで、EphA10が16種類の正常組織の中で、精巣にしか発現していないことを明らかにしている。しかし、Eph receptorファミリーの中には、胸腺などの免疫組織や下垂体などの腺組織といった、これまでに検証していない正常組織で発現している分子も報告されており、EphA10もこれらの組織で発現していることが懸念される。そこで申請者は次に、免疫組織や腺組織など、20種類の正常組織を新たに加えて、EphA10の正常組織における発現分布を詳細に解析した。その結果、EphA10は、本試験においても精巣に発現が認められた一方で、その他の35種類の組織では発現が認められなかった。以上の結果から、EphA10の発現は、他のファミリー分子とは異なって、がん組織特異性が高い特徴を有しており、女性患者がほとんどの乳がんに対し、格好の治療標的候補であることが示唆された。

がんに対する分子標的治療薬の開発にあたっては、発現特性の理解が必要な一方で、治療標的のがんにおける機能を理解することも重要である。特に、治療標的候補がが細胞の増殖に関わる分子であれば、その機能を阻害するこ

とで抗腫瘍活性に繋がることが期待される。その点、Eph receptorファミリーの中には、がん細胞の増殖を促進させる機能をもつ分子が報告されており、EphA10も同様の役割を担っている可能性がある。そこで申請者は、がんにおけるEphA10の機能を解析すべく、がん細胞の増殖性に着目して解析を試みた。EphA10低発現のMDA-MB-435に、EphA10を安定発現させたMDA-MB-435^{EphA10}を樹立し、EphA10の結合因子として知られるEphrinA3,A4,A5で刺激することにより、両細胞の増殖性を比較した。その結果、いずれのEphrinを添加しても、MDA-MB-435^{EphA10}の細胞増殖活性が濃度依存的に促進された一方で、親株では違いは認められず、EphA10はリガンド刺激依存的にがん細胞を増殖させる機能を有していることが示された。また、細胞増殖に重要なシグナル経路であるMAPKに着目して、EphA10を介した細胞内シグナル伝達機構を解析したところ、リガンド刺激に伴って、MDA-MB-435^{EphA10}でのみp38のリン酸化が亢進する傾向が認められた。そこで、p38の阻害剤を用いて、細胞増殖との連関を解析した結果、阻害剤存在下では細胞増殖活性に有意な違いは認められず、EphA10による細胞増殖活性は、p38経路を介していることが示唆された。さらに、EphA10とリガンドとの相互作用機構を評価することを目的に、乳がん組織におけるEphA10と各リガンドの発現を評価した結果、乳がん組織には、EphA10のみならず、いずれのリガンドも発現しており、EphA10と共発現している症例も多く認められた。また、これら症例のEphA10とリガンドの発現分布が似ていたことから、EphA10とリガンドががん細胞上で相互作用していることが考えられた。そこで、本仮説を検証するため、いずれのリガンドも発現しているMDA-MB-435^{EphA10}とMDA-MB-435を利用して、細胞上に発現しているEphA10とリガンドを相互作用させた際の細胞増殖に与える影響を解析した。その結果、MDA-MB-435^{EphA10}を細胞間相互作用しやすい高密度条件下で培養したときのみ、細胞増殖活性が亢進したことから、EphA10は、リガンドとがん細胞上で相互作用することで、上記の活性を誘導している可能性が提示された。

以上の発現分布および機能解析の結果から、①EphA10が有するがん細胞の増殖機能を抑制すること、または②EphA10発現がん細胞を傷害することができれば、抗腫瘍効果に繋がることが推察されたため、EphA10を標的とした治療法の開発を前進させるため、次に、この創薬コンセプトの検証を試みた。本検証にあたって、モノクローナル抗体（mAb）は、受容体と結合することで、その機能を中和することが可能であるうえ、補体依存性細胞傷害活性(CDC)などによって、抗原発現細胞を殺傷させる活性も有するため、有用なツールと考えられた。そこで申請者は、EphA10の治療標的としてのさらなる有用性を評価すべく、抗EphA10抗体（Clone: LBR）を独自に樹立した。Clone: LBRの特性を評価した結果、本抗体はEphA10を介したがん細胞増殖活性を中和するうえ、EphA10発現がん細胞をCDC活性によって傷害しうることが示され、創薬コンセプトを検証するための有用なツールとなることが示唆された。また、蛍光標識したClone: LBRとコントロール抗体をそれぞれ、ゼノグラフトモデルマウスに投与したところ、Clone: LBRでのみ腫瘍組織に集積が認められた一方で、正常臓器には有意な分布は観察されなかった。この結果から、Clone: LBRを用いることで、EphA10発現腫瘍組織における治療効果が解析可能であることが示された。そこで実際に、ゼノグラフトモデルマウスに、Saline、コントロール抗体、Clone: LBRを投与し、経時的に腫瘍体積を評価したところ、Salineとコントロール抗体投与群に比較して、Clone: LBRを投与することで、腫瘍増殖が有意に抑制されることが示された。以上の結果から、EphA10が有する細胞増殖活性を抑制し、EphA10発現がん細胞を傷害することによって、実際に抗腫瘍効果が誘導されることが明らかとなり、EphA10が乳がんの治療標的として有用であることがゼノグラフトモデルマウスで示された。

また、EphA10の治療標的としての更なる可能性を追求するため、乳がん以外の9種類のがん種においても検証を試みた。その結果、EphA10は、乳がんの他にも、前立腺がんや大腸がん、胃がんなどにおいても発現上昇していることが明らかとなった。特に、前立腺がんでは、乳がんの発現レベルと同等であったことから、前立腺がんのゼノグラフトモデルマウスにおいても、Clone: LBRの効果を評価した。その結果、乳がんと同様に、前立腺がんのゼノグラフトモデルでも、コントロール抗体投与群に比較して、Clone: LBR投与群で有意な抗腫瘍効果が観察された。したがって、EphA10は、乳がんのみならず、前立腺がんの新たな治療標的候補としても、有望な受容体であることが示された。

さらに、EphA10の機能発現メカニズムの解明を目標に、その解析ツールとして有用な細胞内機能抗体(イントラボディ)を創製すべく、独自に構築したファージ抗体ライブラリから低分子化抗体(scFv)を単離し、細胞内での発現特性を評価した。取得したscFvを蛍光蛋白質Venusとの融合体として発現させた結果、Venus単独で発現させた場合と同様の蛍光が観察されたことから、本手法で単離したscFvは、細胞内で可能型に発現する可能性が示された。今後、本検討で得られた知見をもとに、イントラボディを用いたEphA10の細胞内領域の解析が推進され、機能発現機構が明らかになることが期待される。

以上、本研究では、EphA10の発現分布やがんにおける機能をもとに創薬コンセプトを構築・検証し、EphA10が乳がんや前立腺がんの治療標的として有用であることを示した。今後、これらの知見がもとになって、EphA10を標的とした治療法の開発に向けた研究の推進が期待される。また、本研究成果は、これまで特性が未解明であったEphA10に対し、がん細胞の増殖に関わることを明らかにした点で、医薬品開発といった応用研究のみならず、腫瘍生物学などの基礎研究の進展にも貢献しうるものと期待する。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　長野　一也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	堤　康央
	副 査　教授	高木　達也
	副 査　教授	辻川　和丈
	副 査　教授	小比賀　聡

論文審査の結果の要旨

本博士論文では、申請者のグループで同定した新規乳がん関連蛋白質EphA10に対する医薬品開発、特に、治療法の無いトリプルネガティブ乳がんに対する画期的抗がん剤の開発に資することを目指し、以下のような有用な知見を得た。

1. EphA10は、難治性のTNBC（トリプルネガティブ乳がん）症例を含む全てのサブタイプに対して、がん組織特異的に発現し、乳がんの予後決定因子であるリンパ節転移にも相関していることを最初に示した。

2. EphA10は、がん細胞上でリガンドと相互作用することでp38のリン酸化を亢進させ、細胞増殖を促進させる機能を有していることを初めて提示した。

3. 以上の1、2により推定された「EphA10の細胞増殖促進作用の抑制、またはEphA10発現がん細胞の傷害が抗腫瘍効果につながる」という創薬コンセプトをゼノグラフトモデルマウスで証明し、創薬プロセスの架け橋となる情報を得た。

4. EphA10は、乳がん以外のがん種（前立腺がん、大腸がん、胃がんなど)においても高発現しており、特に発現レベルの高かった前立腺がんにおいて、腫瘍増殖が有意に抑制されることが示され、今後の適応拡大を期待させた。

5. 独自に構築したファージscFv抗体ライブラリから、モデル抗原に対するscFvを単離し、細胞内環境下でも発現しうることが示唆され、scFv抗体を細胞内でのタンパク質機能解析ツールとして応用するためのあしがかりを得た。

このように、本研究は、EphA10の発現分布やがんにおける機能をもとに創薬コンセプトを構築・検証し、EphA10が乳がんの治療標的として有用であることを示したものである。今後、これらの知見がもとになって、EphA10を標的とした治療法の開発に向けた研究の推進が期待されるものである。また、本研究成果は、これまで特性が未解明であったEphA10に対し、がん細胞の増殖に関わることを明らかにした点で、医薬品開発といった応用研究のみならず、腫瘍生物学などの基礎研究の進展にも貢献しうるものであり、がんに対する基礎～臨床に至る広範な寄与が見込まれる。

以上より、今後の難治性がんの克服に向けた興味深い知見であり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。