OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A small-molecule inhibitor of SMAD3 attenuates resistance to anti-HER2 drugs in HER2-positive breast cancer cells
Author(s)	千原, 陽子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67125
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）千原　陽子

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	野口眞三郎
	副　査	大阪大学教授	石井　英一
	副　査	大阪大学教授	奥村　明之進

論文審査の結果の要旨

本研究はTGFβとその細胞内伝達を担うSMAD2/3タンパクが抗HER2薬耐性に関与するか検討したものである。HER2陽性乳癌細胞株であるSKBR3をTGFβで刺激すると、代表的な抗HER2薬であるtrastuzumab（Tzm）及びlapatinib（Lap）耐性化が生じるのと同時にSMAD3の強いリン酸化と乳癌幹細胞の増加が認められた。SMAD3の低分子阻害薬によりSMAD3の核内移行の阻害、SMAD3の標的遺伝子発現の抑制、乳癌幹細胞の減少が認められた。SMAD3の低分子阻害薬により抗HER2薬耐性化が阻止され、既にTzm耐性を獲得している細胞株のTzm感受性も回復した。またSMAD3は複数のTzm耐性関連遺伝子の発現を制御することによりTzm耐性化を引き起こすことを見出した。術前化学療法が施行されたHER2陽性乳癌患者の治療前生検検体を用いたSMAD3染色では、核内SMAD3陰性とTzm併用術前化学療法の病理学的完全奏功に有意な相関が認められた。以上より抗HER2薬耐性化にSMAD3が関与することを明らかにし、SMAD3阻害が抗HER2薬耐性克服の有望な手段になる可能性を見出したことより、学位の授与に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	千原　陽子
論文題名 Title	A small-molecule inhibitor of SMAD3 attenuates resistance to anti-HER2 drugs in HER2-positive breast cancer cells （SMAD3の低分子阻害剤はHER2陽性乳癌細胞株における抗HER2薬耐性化を抑制する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

HER2（ERBB2/neu）は受容体型チロシンキナーゼの一つであり、15－20%の浸潤性乳癌において過剰発現を認める。HER2に対する分子標的薬である抗HER2薬の臨床応用によりHER2陽性乳癌の予後は改善したが、今なお抗HER2薬の耐性化は克服すべき課題である。近年、サイトカインの一つであるtransforming growth factor β（TGFβ）が薬剤の耐性化に関与することが明らかとなってきた。乳癌細胞において、TGFβは上皮間葉転換や癌幹細胞化を促進し乳癌の悪性化に寄与する。しかし現時点では、TGFβと抗HER2薬に対する耐性との関連はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、TGFβとその細胞内伝達を担うSMAD2/3タンパクが抗HER2薬の耐性に関与するかどうかを検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

HER2陽性乳癌細胞株であるSKBR3細胞をTGFβで14日間刺激したものと刺激しなかったものについて、代表的な抗HER2薬であるtrastuzumab（Tzm）またはlapatinib（Lap）に対する薬剤感受性試験を行ったところ、TGFβによってTzm及びLapに対する耐性化が生じることが分かった。TGFβはその受容体を介してSMAD2およびSMAD3をリン酸化する。リン酸化SMADは核内に移行して転写調節因子として機能し、乳癌細胞の幹細胞化を引き起こすとされる。そこで、本実験系でこれらの反応が生じているかを検討した。TGFβの刺激がSMAD3の強いリン酸化を誘導すること、および乳癌幹細胞マーカーであるCD44陽性CD24陰性細胞分画も増加することを見出し、抗HER2薬に耐性化したSKBR3細胞ではTGFβ-SMAD3経路が強く活性化されていることが示唆された。

SMAD3の低分子阻害薬であるSIS3が抗HER2薬に対する耐性化を阻止できるかどうかを検討した。TGFβでSKBR3細胞を刺激する間の後半7日間にSIS3を添加したものと溶媒のみを加えたもので比較した。すると、SIS3によってTzmおよびLapの両者に対する耐性化が完全に阻止された。次にSIS3がSMAD3の活性化に与える影響を検討した。TGFβで誘導されるSMAD3の核内移行がSIS3によって阻害される一方、SMAD2の核内移行は阻害されなかった。SMAD3の直接の標的遺伝子であるSMAD6、SMAD7、LTBP3のmRNAの発現はSIS3によって抑制され、CD44陽性CD24陰性細胞分画の誘導もSIS3によって抑制された。従って、SMAD3を阻害することによりSIS3は抗HER2薬の耐性化を阻止すると考えられた。既にTzmに耐性を獲得している細胞株を用い、SIS3によってTzmに対する感受性が回復するかどうかを検討した。TGFβを添加しなくてもSMAD3のリン酸化が亢進しているTzm耐性SKBR3細胞およびJIMT-1細胞では、SIS3によってTzmに対する感受性が回復した。一方、SMAD3のリン酸化の亢進のないMDA-MB-361細胞ではSIS3によるTzmへの感受性の回復は認められなかった。

SMAD3による抗HER2薬の耐性化の機序を検討した。SMAD3結合部位を持ち、かつTzm耐性に関連する遺伝子のmRNA発現を評価したところ、抗HER2薬の耐性化を促進するMMP9、MMP13、LEF1、および抗HER2薬の耐性化を抑制するZFP36の発現をSMAD3が正および負に制御することにより耐性化が引き起こされることを見出した。

当院で術前化学療法（paclitaxel 12コース及びFEC 4コース）が施行されたHER2陽性乳癌患者の治療前生検検体を用い、核内SMAD3と治療効果の関連を検討した。核内のSMAD3が染色される細胞が10%未満を陰性、10%以上を陽性とした。Tzm併用群37例において、閉経後（$P = 0.029$）、ホルモン受容体陰性（$P = 0.035$）、核内SMAD3陰性（$P = 0.036$）が、術前化学療法の病理学的完全奏功と有意な相関を示し、SMAD3の活性化が臨床的にも重要であることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究は抗HER2薬の耐性化にSMAD3が関与することを明らかにした。SMAD3は活性化されると抗HER2薬耐性に関連する複数の遺伝子を制御しその耐性化を誘導する。従って、SMAD3の阻害は抗HER2薬耐性を克服するための有望な手段になりうると考える。