

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	佐藤 七月
学位授与の日付	平成29年8月31日	
論文名	MEK and PI3K catalytic activity serves as a parameter for chemosensitivity prediction of molecularly targeting agents in triple-negative breast cancer (MEK 及び PI3K の酵素活性を用いたトリプルネガティブ乳癌に対する分子標的薬の感受性予測)	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	北村 進一
	副査	杉本 憲治

論文要旨

序章

コンパニオン診断 (**CDx**) は、特定の薬剤に対して薬効を示す患者と示さない患者、もしくは副作用を示す患者を分類することを目的とした個別化医療に必須の診断コンセプトである。既に、いくつかの **CDx** が実臨床に応用されており、患者の **QOL** 向上や医療経済に貢献している。**CDx** は分子標的薬の発展と共に進んできた。分子標的薬は、従来の術後治療に用いられてきた一般化学抗癌剤とは異なり、癌細胞の持つ特異的な性質を分子レベルで捉え、それを標的として効率よく作用する薬である。標的分子が決まっているため、正常細胞には比較的損傷を与えず、薬効の予測もし易い。この背景の中、**CDx** の確立を目指し、多くの研究者が網羅的遺伝子プロファイリングを中心にバイオマーカー探索を行ってきた。しかしながら、臨床的に有用なバイオマーカーの発見は多くなく、臨床研究段階では良い成績を残すものの、**CDx** として **FDA** に承認されるものは少ない。

分子標的薬による治療と **CDx** の研究が盛んな癌種の 1 つにトリプルネガティブ乳癌 (**TNBC**) がある。**TNBC** とは乳癌のサブタイプの 1 つで、病理学的には 3 つの受容体、即ちエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および **HER2** 受容体が欠損している特徴を持つ。治療標的となるべき上記受容体が欠損していることから、明確な治療方法が確立されておらず、新たな分子標的薬とその **CDx** の実臨床応用が待た

れる。

細胞内に存在するシグナル伝達経路において、**MAPK** 経路、及び **PI3K-AKT** 経路は、増殖因子受容体の下流に位置する主要で独立した経路であり、癌の増殖・生存に重要な役割を果たしている。これらの経路は、**TNBC** を含む様々な固形癌で増殖シグナルの伝達を担っており、分子標的薬に対する感受性や耐性を考える上で重要な分子群により構成されている。シグナル伝達経路に関する研究の多くは、分子標的薬に応答する分子の発現量やリン酸化状態の変化を解析するアプローチを用いている。しかしながら、私の知る限り経路を構成する分子（キナーゼ）の酵素活性を評価した研究は行われていない。そこで、**2** つの経路に含まれる代表的なキナーゼとして **mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)** と **phosphoinositide 3-kinase (PI3K)** を選択し、標的キナーゼの捕捉から酵素反応を行うための一連のアッセイを構築した。本研究では、**16** 種類の **TNBC** 乳癌細胞株に含まれる **MEK** および **PI3K** 活性（リン酸化活性）の測定を実施し、これら酵素の相対的な活性値が、**MEK** 阻害剤及び **PI3K** 阻害剤の効果予測になり得るかに関する検討を *in vitro* と *in vivo* 実験系において実施した。

第1章 MEK 及び PI3K の酵素活性測定方法の構築

最初に、細胞可溶化液中の **MEK** と **PI3K** 酵素活性測定を目的とし、アッセイの構築を試みた。酵素活性は **ATP** がキナーゼ反応によって変換される単位時間当たりの **ADP** 生成量とした。まず、**ADP** 量を検出すべく **HPLC** による分析を行った。過去の報告を参考に、**ODS** カラムを用いたステップワイズ溶出条件にて **ATP**、**AMP** から **ADP** を分離し、酵素反応から予想される **ADP** 産生量に応じた検出性能を確認した。次に、酵素反応速度を最適化すべく、リコンビナント酵素を用い、反応 **pH** と補因子である金属の種類を検証した。いずれのキナーゼにおいても、**pH 7.5**、**Mg²⁺**の添加によって反応速度が最大となることを確認した。最後に、各キナーゼを免疫沈降した後、基質と **ATP** を含むキナーゼ酵素反応試薬を反応させ産生した **ADP** を検出することで一連のアッセイのプロトコルの至適化を行った。ヒト急性 **T** 細胞性白血病細胞株である **Jurkat** 細胞を **1×10⁷** 細胞個まで培養し、界面活性剤を含む緩衝液にて処理し細胞可溶化液を得た。別途抗体を担持した磁性ビーズを作製し、可溶化液からキナーゼを捕捉、引き続きキナーゼ反応を行い **ADP** の検出を行った。抗体担持ビーズを用いた実験で得られた **ADP** シグナルは、担持していないものと比較して明らか高い結果となった (**MEK: S/N 6.44**、**PI3K: S/N 1.74**)。以上より、細胞可溶化液から **MEK**、**PI3K** の酵素活性を測定する一連のアッセイの確立が確認された。

第2章 トリプルネガティブ乳癌細胞株を用いた薬剤感受性とキナーゼ活性の関連性評価

TNBC 細胞株を用いて、**MEK** 阻害剤であるトラメチニブと、**PI3K** 阻害剤であるウオルトマンニンへの感受性とキナーゼ活性の関係性を調査した。最初に、**16** 種類の

TNBC をそれぞれの阻害剤共存下にて培養し、増殖阻害率を確認した。高濃度の阻害剤を添加した際、非特異的に薬剤効果が得られてしまう **off-target** 効果を観測したため、最も薬剤の効果が低かった細胞株の阻害率をバックグラウンドとして差し引くことで **off-target** 効果をキャンセルした。結果として、**16** 種の細胞株は感受性の異なる **4** パターン (**MsPr**; トラメチニブ感受性/ウォルトマンニン耐性、**MsPs**; 両薬剤感受性、**MrPs**; トラメチニブ耐性/ウォルトマンニン感受性、**MrPr**; 両薬剤耐性) の薬剤感受性グループに分類された。次に、細胞株可溶化液を用いて活性測定を行い、それぞれの細胞株の測定結果を **X** 軸に **MEK** 活性、**Y** 軸に **PI3K** 活性を示すグラフにプロットした。結果として、**MrPs** の細胞株において **MEK** 活性値と **PI3K** 活性値が高い相関性を示すことが明らかとなった。($R = 0.951$, $P = 0.000991$)。この相関関係は以下の式 1 により表される (式 1 : $Y = 0.084X + 0.40$)。その他の細胞株の **PI3K** 測定値は、**MEK** 活性値から式 1 により与えられる計算値を超えないことが観察された。この結果から、**PI3K** と **MEK** の活性値が薬剤感受性を予測するパラメーターになると考え、相対活性を基にしたパラメーターを作製した (**PI3K:CAR** = 実測 **PI3K** 活性値/実測 **MEK** 活性値から計算される **PI3K** 活性値)。次に、この **PI3K:CAR** の値を用い、薬剤感受性グループとの群間比較を行った。**MrPs** 細胞株における **PI3K:CAR** は、**MsPr** と **MsPs** 細胞株を合わせた群より有意に高い結果となった ($P = 0.0060$)。これらの結果より、**PI3K:CAR** は、ウォルトマンニンのみに感受性を示す細胞株を選択し、広義には **2** 種の経路を代表するキナーゼの相対活性値が、薬剤感受性を予測する指標になる可能性を強く示した。

次に、変異状態とキナーゼ活性との比較検証を行うために、**2** つの経路に関連した分子の変異状態を調べた。変異状態のステータスを同様の相関図上に示すと、**MEK** 経路の活性化に関連する **BRAF** 変異を持つ **2** 種の細胞株は、酵素活性から得られた相関図のプロットと同等の傾向を示した。しかし、**PI3K** 経路の活性化に関連する **PI3K** 変異や、**PTEN** フレームシフト変異に関しては活性と同一傾向を示さなかった。また、**PI3K:CAR** による分類は、いずれの変異も有さない **2** 種の野生型細胞株 (**HCC1806**、**HCC1937**) の感受性予測に成功していることが明らかとなった。感受性予測のためのカットオフを設定し全診断率を算出すると、**PI3K:CAR** 及び変異状態による分類は、それぞれ **69%**と **63%**となった。これらの結果から、キナーゼ活性測定に基づく **PI3K:CAR** による感受性予測は、変異による分類と同等以上であり、補完的な性能を有することが示唆された。

第3章 トリプルネガティブ乳癌細胞株より誘導した担癌マウスを用いた薬剤投与による抗腫瘍検証と腫瘍組織中の酵素活性による薬剤感受性予測

前章までに示したアッセイシステムが組織サンプルにも適応できるか確認すべく、**MDA-MB-231(MsPr)**と **SUM185PE(MrPs)**細胞株より担癌マウスモデルを作製し検討を行った。ヌードマウスの皮下に細胞を注入後、腫瘍体積が **300mm³**になるまで育成し、無作為にコントロール、トラメチニブ、ウォルトマンニン群に振り分け **14** 日間の経口投与と、毎日の腫瘍体積、及び体重変化の観測を行った。*In vitro* の結果から予想

されるように **MB231** マウスにおいてトラメチニブ投与群が有意に腫瘍成長抑制効果を示し ($P < 0.005$ vs control 群)、**SUM185PE** マウスではウォルトマンニンが効果を示した ($P < 0.05$ vs control 群)。また、投与実験とは別に腫瘍体積が 300mm^3 に成長した際、ヘパリン添加生理食塩水による血液灌流を行った後、腫瘍組織を摘出した。さらに、これらの組織可溶化液を用いて **MEK** および **PI3K** のキナーゼ活性測定を行い **PI3K:CAR** の値を得た。第 2 章で設定したカットオフに適応すると、**MB231** マウスはトラメチニブ感受性、**SUM185PE** マウスではウォルトマンニン感受性と分類され、薬剤投与による抗腫瘍効果の結果と一致した。これらの結果より、本アッセイは腫瘍組織に適用可能であることが示された。

第4章 経路間クロストークの観測及び同一経路中他キナーゼ阻害剤の感受性調査

経路間のクロストークを観測するために、複剤処置下（トラメチニブとウォルトマンニン）にて培養し、第 2 章と同様に増殖阻害アッセイを行った。単剤の阻害率の和と複剤での阻害率を比較すると、13 種の細胞株で相乗的效果を示し、3 種の細胞株では相加的や阻害的な効果を示した。これらの結果、本パネルの **TNBC** 細胞株は、密接なクロストークの状態にあり、単一分子の解析のみでは感受性予測は不十分であることが示唆された。最後に、経路中の他のキナーゼ阻害剤の感受性予測能を調査すべく、**PI3K:CAR** 値が低い **MDA-MB-231**、**DU4475** と高い **HCC70** を選択し、**BRAF**、**ERK**、**AKT**、**mTOR** 阻害剤に対する感受性の評価を行った。**MB231** では **BRAF**、**ERK** 阻害剤に耐性であったが、**mTOR** 阻害剤はトラメチニブと同等の阻害率を示した。一方、**DU4475** は **BRAF** 阻害剤と **mTOR** 阻害剤に感受的であった。**HCC70** では、**MAPK** 経路に関連する阻害剤と比べ、**PI3K-AKT** 経路に関連する阻害剤には強い感受性を示した。これらの結果より、**PI3K:CAR** は **PI3K-AKT** 経路に対する阻害剤の感受性予測に関して、網羅的なパラメーターであることが示唆された。

結論

細胞可溶化液および腫瘍組織可溶化液中の **MEK**、及び **PI3K** のキナーゼ活性を測定するアッセイを構築した。トリプルネガティブ乳癌用い、**MEK** 及び **PI3K** のキナーゼ活性値に基づく新たなパラメーター (**PI3K:CAR**) が、薬剤感受性予測に有効である可能性を示した。また、**PI3K:CAR** は、変異状態による分類では予測できなかった野生型細胞株の薬剤感受性を正しく分類したため、変異解析と酵素活性測定のコम्ビネーションによる診断効率の向上が見込まれた。本研究成果は、トリプルネガティブ乳癌に限定されず **MAPK** もしくは **PI3K-AKT** 経路の異常を有する他の癌種への適応が可能と考えられる。

審査結果の要旨

コンパニオン診断 (CDx) は、特定の分子標的薬に対して薬効を示す患者と示さない患者、あるいは副作用を示す患者を分類することを目的とした個別化医療に必須の診断コンセプトであり、既にいくつかの CDx は実臨床に応用されている。これまでに多くの研究者が CDx の確立を目指し、網羅的遺伝子プロファイリングを中心にバイオマーカーの探索を行ってきた。しかし、臨床的に有用なバイオマーカーの発見は困難であり、臨床研究段階では良い成績を残すものの、CDx としてアメリカ食品医薬品局 (FDA) に承認されるものは少ない。細胞内に存在するシグナル伝達経路において、MAPK 経路、及び PI3K-AKT 経路は、様々な固形癌における癌の増殖シグナルの伝達を担っており、分子標的薬に対する感受性や耐性を考える上で重要な分子群により構成されている。シグナル伝達経路に関する研究の多くは、分子標的薬に応答する分子の発現量やリン酸化状態の変化を解析するアプローチにより行われているが、経路を構成する酵素分子 (キナーゼ) の酵素活性を評価した研究は行われていない。そこで、学位申請者は上記 2 つの経路に含まれる代表的なキナーゼとして、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) に着目し、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) を癌モデルとして用い、酵素活性値が MEK 阻害剤、及び PI3K 阻害剤の抗腫瘍効果予測因子になり得るか否かの検討を行った。

第 1 章では、細胞可溶化液中の MEK と PI3K の酵素活性測定のアッセイ構築を試みた。酵素活性は、キナーゼ反応により生成する ADP を HPLC により定量した。酵素が最大反応速度を示すための pH と、補因子である金属の添加検討を行い、いずれのキナーゼにおいても、pH 7.5、 Mg^{2+} 添加条件が最適であることを確認した。次に、細胞可溶化液中の酵素活性を測定するために、抗体を担持した磁性ビーズによる各キナーゼの免疫沈降、基質と ATP を含むキナーゼ酵素反応試薬添加、及び産生 ADP の検出により、一連のアッセイプロトコールの至適化を行った。その結果、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株の可溶化液を用いた活性測定において、抗体担持ビーズにより得られた ADP シグナルは、担持していないものと比較して明らかに高い値を示した。以上より、学位申請者は細胞可溶化液から MEK、及び PI3K の酵素活性を測定する一連のアッセイ系を確立した。

第 2 章では、TNBC 細胞株における MEK 阻害剤 (トラメチニブ) と PI3K 阻害剤 (ウォルトマンニン) への感受性と、キナーゼ活性の関係性を調査した。16 種類の TNBC 細胞株の薬剤感受性の解析により、感受性の異なる 4 グループ (MsPr; トラメチニブ感受性/ウォルトマンニン耐性、MsPs; 両薬剤感受性、MrPs; トラメチニブ耐性/ウォルトマンニン感受性、MrPr; 両薬剤耐性) に分類することが出来た。次に、同細胞株における活性測定の結果、MrPs 細胞株においてのみ、MEK 活性と PI3K 活性間で高い相関性を有することが判明した。この相関関係により、PI3K と MEK の活性値が薬剤感受性を予測するパラメータになると考え、その相対活性より新規パラメータ (PI3K:CAR = 実測 PI3K 活性値/実測 MEK 活性値から計算される PI3K 活性値) を創出した。PI3K:CAR の値を用い、薬剤感受性グループの群間比較を行った結果、ウォル

トマンニンのみ感受性を示す細胞株を選択することができ、広義には 2 種の経路を代表するキナーゼの相対活性値が、薬剤感受性を予測する指標になりうる可能性を示した。また、経路の活性化に関連する変異状態とキナーゼ活性との比較検証を行った結果、PI3K:CAR による分類は、いずれの変異も有さない 2 種の野生型細胞株の感受性予測に一致していることが判明した。さらに、感受性予測のためのカットオフ値を設定し全診断率を算出すると、PI3K:CAR による感受性予測能は、変異による予測と同等以上であり、変異による予測を補完する性能を持つことが示唆された。

第 3 章では本アッセイシステムが組織サンプルにも適応できるか否かを確認すべく、MDA-MB-231 (MsPr) と SUM185PE (MrPs) 細胞株を用いた担癌マウスモデルを作製し、薬剤投与による抗腫瘍実験、及び酵素活性との比較検証を行った。MB231 担癌マウスでは、トラメチニブ投与群が有意に腫瘍成長抑制効果を示し、SUM185PE 担癌マウスでは、ウォルトマンニンが優れた効果を示した。また、投与前のマウスより摘出した腫瘍組織中の MEK、及び PI3K のキナーゼ活性測定を行い PI3K:CAR の値を得た。第 2 章で設定したカットオフ値に適応すると、MB231 担癌マウスはトラメチニブ感受性、SUM185PE 担癌マウスはウォルトマンニン感受性と分類され、薬剤投与による抗腫瘍効果の結果と一致した。以上より、本アッセイは腫瘍組織にも適用可能であることが示された。

第 4 章では、経路間のクロストークの観測、及び PI3K:CAR の同一経路中の他のキナーゼ阻害剤の感受性予測能を調査した。その結果、本パネルの TNBC 細胞株は、密接なクロストークの状態にあり、単一分子の解析のみでは感受性予測は不十分であることが示唆された。また、PI3K:CAR は、PI3K-AKT 経路に対する阻害剤の感受性予測に関して、網羅的なパラメータであることが示唆された。

本申請論文は、TNBC の薬剤感受性予測のために、2 種のシグナル伝達経路を代表する MEK、及び PI3K の相対酵素活性に着目し、細胞株を用いた評価やモデル動物を用いた実験により、酵素活性の優位性を見出した初めての論文である。本知見は、CDx の開発に向けたバイオマーカー候補の一つとしての可能性を示すことから、臨床検査学に貢献するとともに、その方法論において、腫瘍学、薬理学、及び酵素化学にも広く貢献するものである。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。