

博士論文

ホルモン受容体陽性乳癌における  
Palbociclib の Activin-SMAD シグナルへの影響

原田 真悠水

論文題目： ホルモン受容体陽性乳癌における Palbociclib の  
Activin-SMAD シグナルへの影響

所属： 外科学専攻

指導教員： 瀬戸 泰之 教授

申請者： 原田 真悠水

## 目次

略語一覧 .....	2
要旨 .....	3
1. 序文 .....	4
1.1. 乳癌のサブタイプ分類.....	4
1.2. CDK4/6 阻害薬.....	6
1.3. Activin-SMAD シグナル.....	8
1.4. 研究の目的.....	12
2. 材料と方法 .....	13
3. 結果 .....	24
3.1. Palbociclib は Activin と相加的に細胞増殖を抑制する.....	24
3.2. Palbociclib が SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化を阻害する ...	30
3.3. ホルモン受容体陽性乳癌 T47D 細胞株において Palbociclib は SMAD2 の ゲノム上への結合を増強する .....	33
3.4. Palbociclib が Activin-SMAD シグナルを増強させる .....	38
3.5. Palbociclib 及び Activin は SMAD2 の標的遺伝子として CCNG2 を誘導し 細胞増殖を抑制する .....	48
3.6. トリプルネガティブ乳癌 Hs578T 細胞株において Palbociclib は SMAD2 のゲノム上への結合を増強する .....	55
4. 考察 .....	64
5. 結論 .....	69
6. 引用文献.....	71
7. 補遺 .....	75
8. 謝辞 .....	77

## 略語一覧

CDK (cyclin dependent kinase) : サイクリン依存性キナーゼ

HR (hormone receptor) : ホルモン受容体

HER (human epidermal growth factor receptor) 2 : ヒト上皮増殖因子受容体 2

ER (estrogen receptor) : エストロゲン受容体

PgR (progesterone receptor) : プロゲステロン受容体

PFS (progression free survival) : 無増悪生存期間

TGF (transforming growth factor)-  $\beta$  : トランスフォーミング増殖因子  $\beta$

EMT (epithelial-mesenchymal transition) : 上皮間葉転換

OS (overall survival) : 全生存期間

## 要旨

Palbociclib は HR 陽性、HER2 陰性乳癌の治療薬として注目されている薬剤である。主な作用機序は CDK4/6 を阻害することで Rb-E2F 経路を抑制し細胞増殖を抑制する。本研究では Palbociclib が第二の作用機序として Activin-SMAD シグナルを増強することで細胞増殖を抑制することを明らかにした。その機序は SMAD2 のリンカーリン酸化を阻害することにより SMAD2 のゲノムへの結合を強化するものと考えられる。また、Palbociclib が Activin の細胞増殖抑制作用を増強するうえで CCNG2 が重要であることを見出した。

## 1. 序文

### 1.1. 乳癌のサブタイプ分類

乳癌は、Perou らによる遺伝子発現プロファイリングに基づき luminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-like、normal breast-like の intrinsic subtype に分類される[1]。現在の乳癌診療では、intrinsic subtype を病理組織学検査で得られる免疫組織化学的方法によって代替的に定義し、ER、PgR の発現と程度、HER2 タンパクの発現の有無、Ki-67 の発現程度により luminal A-like、luminal B-like (HER2 陰性)、luminal B-like (HER2 陽性)、HER2 陽性 (非 luminal)、triple negative に分類し、治療方針を決定している[2]。サブタイプによる治療方針は下記表 1 の通りである。

Intrinsic subtype	臨床病理学的代替定義	推奨療法
luminal A	luminal A-like ER 陽性かつ PgR 陽性 HER2 陰性 Ki-67 低値	内分泌療法
luminal B	luminal B-like (HER2 陰性) ER 陽性かつ HER2 陰性 PgR 低値または陰性 Ki-67 高値	内分泌療法 化学療法
	luminal B-like (HER2 陽性) ER 陽性かつ HER2 陽性	化学療法 抗 HER2 療法 内分泌療法
erb-B2 過剰発現	HER2 陽性 (非 luminal) HER2 陽性 ER 陰性かつ PgR 陰性	化学療法 抗 HER2 療法
basal-like	triple negative (ductal) HER2 陰性 ER 陰性かつ PgR 陰性	化学療法

表 1. 乳癌のサブタイプ分類（乳癌診療ガイドラインより引用）

## 1.2. CDK4/6 阻害薬

HR 陽性、HER2 陰性乳癌における新規治療薬として CDK4/6 阻害薬が注目されている。現在、CDK4/6 阻害薬として Palbociclib、Abemaciclib、Libociclib の 3 剤が米国で承認されており[3]、本邦では 2017 年 9 月に Palbociclib が内分泌療法との併用で HR 陽性、HER2 陰性手術不能または再発乳癌を対象に承認された。

これまでの臨床試験では、PALOMA-2 試験（国際共同第Ⅲ相試験）において HR 陽性、HER2 陰性の閉経後進行乳癌患者を対象に、1 次治療として CDK4/6 阻害薬 Palbociclib とレトロゾールの併用群がレトロゾール単独群と比較して有意な PFS の延長を認めた[4]。また、PALOMA-3 試験（国際共同第Ⅲ相試験）では、内分泌療法抵抗性の HR 陽性 HER2 陰性進行乳癌患者を対象に、Palbociclib とフルベストラント併用群がフルベストラント単独群と比較して有意な PFS の延長を認めた[5]。これらの結果から、2015 年 2 月、乳癌治療薬として米国食品医薬品局（FDA）に迅速承認され、2016 年 11 月には欧州医薬品庁（EMA）に承認された[6]。現在米国をはじめ多くの国で使用され、本邦では 2017 年 12 月に使用が可能となった。

がん細胞増殖における CDK4/6 の役割は、サイクリン D1 と結合し Rb タンパクをリン酸化する。Rb タンパクのリン酸化によって転写因子 E2F が活性化され、



E2F が細胞周期 G1/S 期への移行を促進する。Palbociclib の主な作用機序として、CDK4/6 を選択的に阻害することによって Rb タンパクのリン酸化を阻害し、E2F が不活性化され細胞増殖を抑制することが知られている (図 1) [7]。さらに内分泌療法と併用することでエストロゲン受容体からのシグナル経路が遮断され、抗腫瘍効果が増強することから、現在 Palbociclib は内分泌療法と併用して使用されている。

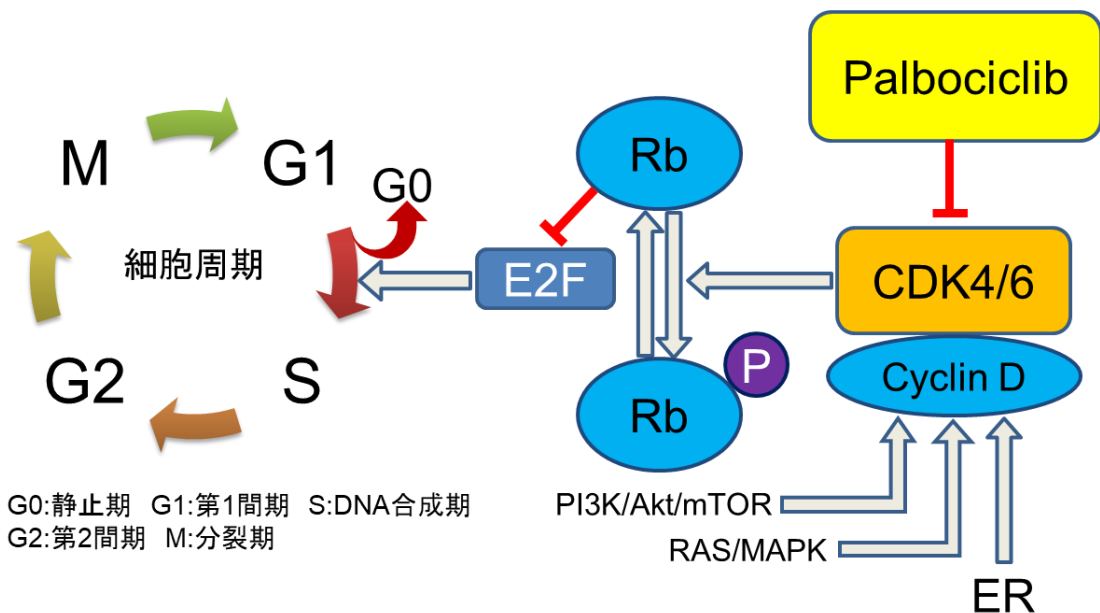


図 1. CDK4/6 阻害薬の作用機序

### 1.3. Activin-SMAD シグナル

Activin は下垂体前葉から卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促進するタンパク質ホルモンであり、TGF- $\beta$  ファミリーに属するサイトカインの一つである [8], [9]。TGF- $\beta$  ファミリーには Activin の他、TGF- $\beta$ 、Nodal、BMP (bone morphogenetic protein) が含まれ、その生理作用は細胞増殖、分化、運動、アポトーシスの誘導、免疫調節など多岐に及ぶ。Activin は性腺機能、胚発生、乳腺の発達、膵機能、骨形成等で重要な役割を果たす。Activin は 2 種類の受容体に結合し、細胞内の SMAD タンパクを介してシグナル伝達を行う。Activin は II 型受容体に結合し、I 型受容体をリン酸化する。リン酸化された I 型受容体が SMAD2 と SMAD3 (以下 SMAD2/3) の C 末端をリン酸化することによって SMAD4 と複合体を形成し、核内へ移行する。核内へ移行した SMAD 複合体が様々な転写因子・転写共役因子と結合して、標的遺伝子の転写調節領域に結合し、標的遺伝子の転写を制御する (図 2)。また、SMAD は構造上 MH1 ドメイン、MH2 ドメイン及びその間を結ぶリンカー領域によって構成される。リンカー領域は様々なシグナル経路によってリン酸化を受け、SMAD の機能に影響を与える [10]。これまで知られているものでは、CDK2/4 の他、CDK8/9、RAS-MAPK シグナル、ERK シグナルがリンカー領域のリン酸化に関与している [10], [11], [12]。リンカー領域のリン酸化が SMAD に与える影響は諸説あるが、SMAD の

分解を促進する、SMAD を核から細胞質へ移行させ機能を喪失させる等、転写活性の抑制にはたらくと考えられている[13], [14]。

Activin の作用はがん細胞によって異なるが、乳癌細胞では TGF- $\beta$  と同様、細胞増殖に対して抑制的にはたらくことが知られている[15], [16], [17]。一方で悪性度の高いがんでは、上皮細胞の運動能・浸潤能を亢進させ、EMT を促進するという報告がある (図 3、4) [18]。また、乳癌組織では非乳癌患者の正常乳腺組織と比較し Activin A (*INHBA*) の発現が高値であり、免疫化学染色で Activin A、pSMAD2、pSMAD3 の発現が高いという報告や[18]、乳癌骨転移症例において血清アクチビン値が高値であるという報告もあるが[19]、その機序は明らかではない。

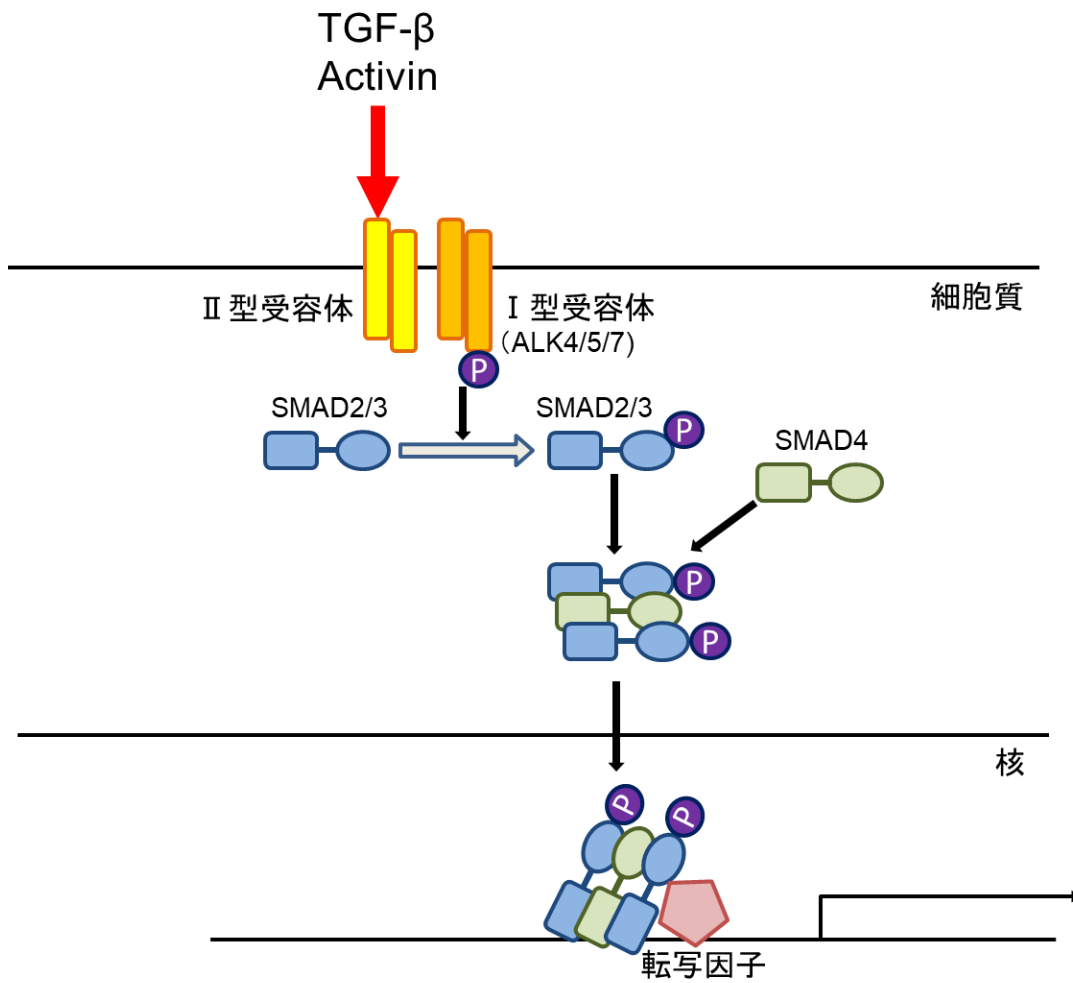


図 2. TGF-β/Activin シグナルの伝達経路

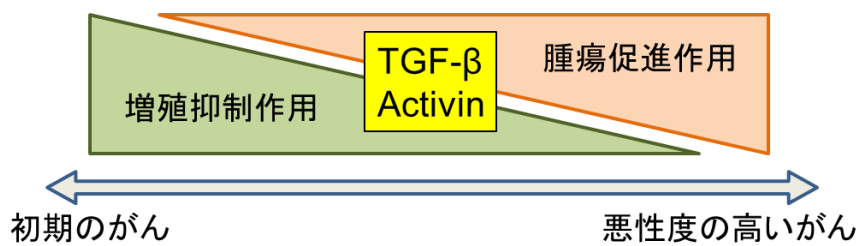


図 3. TGF-β/Activin の作用の二面性

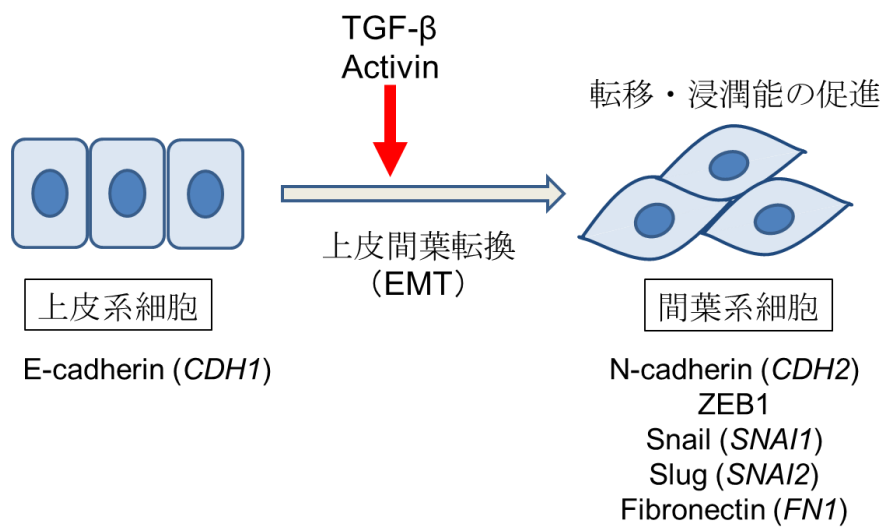


図 4. TGF-β/Activin による上皮間葉転換

#### 1.4. 研究の目的

本邦において、2017年12月よりCDK4/6阻害薬のひとつであるPalbociclibがHR陽性、HER2陰性手術不能または再発乳癌に対して内分泌療法と併用して使用されるようになった。CDK4/6阻害薬の主な作用機序は前述の通り、Rb-E2F経路の抑制による細胞増殖抑制であるが、その他の作用機序はほとんど知られていない。本研究では、サイクリン依存性キナーゼがSMADのリンカー領域をリン酸化するという既存の報告をもとに[20], [21]、PalbociclibがSMADの機能に何らかの影響を与えるものと予測した。そこで、HR陽性乳癌であるT47D細胞を用い、PalbociclibがActivin-SMADシグナルへ与える影響を解明することを目的とした。Activinの作用である増殖抑制作用への影響、またはEMT促進作用への影響を明らかにすることは、Palbociclibの新たな作用機序の解明につながる。さらに、トリプルネガティブ乳癌におけるPalbociclibのActivin-SMADシグナルへの影響をHR陽性乳癌細胞株と比較検討することとした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 細胞培養

下記の細胞株はすべて 37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

T47D 細胞 (HTB-133)、Hs578T 細胞 (HTB-126)、HEK293T 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。MCF7 細胞 (JCRB0134) は JCRB cell bank より購入した。HEK293FT 細胞は Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) より購入した。HaCaT 細胞はドイツ癌研究センターNorbert E. Fusenig 教授より譲渡を受けた。human mammary epithelial HMLE 細胞はカリフォルニア大学サンディエゴ校 Ting Yang 教授より譲渡を受けた。用いた乳癌細胞株の HR 及び HER2 発現状況とサブタイプを表 2 に示す。

T47D 細胞は ATCC の推奨に基づき、10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, GE Healthcare Life Sciences)、0.2 U/ml insulin (Gibco)、100 U/ml penicillin-streptomycin (Gibco) を含む RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) により培養した。Hs578T 細胞は ATCC の推奨に基づき、10% FBS、10 µg/ml insulin、100 U/ml penicillin-streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) により培養した。MCF7 細胞は JCRB の推奨に基づき 1% non-essential amid acids (NEAA) (Gibco)、1 mM sodium pyruvate (Gibco)、10% FBS、10 µg/ml insulin、100 U/ml penicillin-streptomycin を含む DMEM により培養した。HEK293T 細胞、

HEK293FT 細胞、HaCaT 細胞は 10% FBS、100 U/ml penicillin-streptomycin を含む DMEM により培養した。human mammary epithelial HMLE 細胞は 10  $\mu$ g/ml insulin、10 ng/ml EGF、0.5  $\mu$ g/ml hydrocortisone を含む Mammary Epithelial Cell Growth Basal Medium (MEBM) (Lonza) により培養した。

培養細胞株	HR、HER2 の発現状況	サブタイプ
T47D 細胞	ER+、PgR+、HER2-	luminal
MCF7 細胞	ER+、PgR+、HER2-	luminal
Hs578T 細胞	ER-、PgR-、HER2-	triple negative

表 2. 各培養細胞株の HR、HER2 の発現状況とサブタイプ

## 2.2. 試薬と抗体

Recombinant human activin A 及び TGF- $\beta$  は R&D Systems より購入した。

Palbociclib (PD0332991) 及び SB431542 は Sigma-Aldrich より購入した。抗体は下記を使用した。

anti-FLAG M2 (F3165; Sigma-Aldrich)、anti-tubulin (AC-15; Sigma-Aldrich)、anti-HDAC1 (clone 2E10, #05-100, Millipore, Merck)、anti-Smad2 (D43B4, Cell Signaling Technology) (免疫ブロッティングに使用)、anti-Smad2 (EP567Y, ab207451, Abcam) (ChIP に使用)、anti-Smad3 (C67H9, Cell Signaling Technology)、anti-phospho-Smad2 (Ser465/467) (clone A5S, #04-953, Millipore, Merck) (図 5、図



12 において pSMAD2C として記載)、anti-phospho-Smad3 (ab50923, Abcam, Cambridge, UK) (図 5 において pSMAD3C として記載)、anti-Smad2 + Smad3 (pT8) (ab63399, Abcam)、anti-Smad2+Smad3 (pT220/T179) (clone 1A1, #10385, IBL)、anti-Smad2 (pS250) (clone EPR2855(2); ab184557, Abcam)、anti-Smad2 (pS255) (clone EPR2856(N); ab188334, Abcam)、anti-phospho-Rb (S780) (#9307S, Cell Signaling Technology)、anti-E cadherin (#610182, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、anti N-cadherin (#610920, BD Biosciences)、anti-Fibronectin (#610077, BD Biosciences)

### 2.3. プラスミド、レンチウイルス作成

human SMAD2 (NM\_005901) のコンストラクトは既存の報告のものを用いた [22]。human CCNG2 (NM\_004354.2) のコーディング領域を PCR によって増幅させ pcDEF3 ベクター [23] にサブクローニングを行った。レンチウイルス発現ベクターは理研バイオリソース研究センター三好浩之博士（現所属：慶應義塾大学）より譲渡を受けた。fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) レンチウイルスベクター、pCS-EF-mAG-hGeminin (1-110) 及び pCS-EF-mKO2-hCdt1 (30-120) は理化学研究所の宮脇敦史博士より譲渡を受けた [24]。

HEK293T または HEK293FT 細胞に上記プラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。ウイルス液は Lenti-X Concentrator (Clontech, TaKaRa Bio) により濃縮した。

2.4. リアルタイム PCR (quantitative real-time reverse transcription-PCR ; qRT-PCR)

Total RNA の抽出に RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を使用し、cDNA の合成に PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いた。qRT-PCR は StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) を使用した。*GAPDH* で補正し、検量線法または  $\Delta \Delta Ct$  法により定量した。プライマー配列は表 3 に示した。

RT-PCR primer			
human	<i>CDH1</i> (E-cadherin)	Fwd	TGCACCAACCCTCATGAGTG
		Rev	GTCAGTATCAGCCGCTTTCAG
human	<i>CDH2</i> (N-cadherin)	Fwd	TTCCTTGCTTCTGACAATGG
		Rev	ATGTCATAATCAAGTGCTG
human	<i>ZEB1</i>	Fwd	CAATGATCAGCCTCAATCTGCA
		Rev	CCATTGGTGGTTGATCCCA
human	<i>SNAIL</i> (Snail)	Fwd	ACTGCAGCCGTGCCTTCG

		Rev	GTGCTTGTGGAGCAGGGACAT
human	<i>FNI</i> (Fibronectin)	Fwd	GACAGGAGGAAATAGCCC
		Rev	CATCGTGCAAGGCAACCAC
human	<i>PMEPA1</i>	Fwd	TGTCAGGCAACGGAATCCC
		Rev	CAGGTACGGATAGGTGGGC
human	<i>CDKN2B</i> (p15)	Fwd	GGATCCCAACGGAGTCAACC
		Rev	CATCATCATGACCTGGATCGC
human	<i>CCNG2</i>	Fwd	ACTTGGCAGGTCATGAAGGG
		Rev	CCGGGGTAGCCTCAATCAAA
human	<i>GAPDH</i>	Fwd	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
		Rev	GAAGATGGTGATGGGATTTC
ChIP primer			
human	<i>PMEPA1</i>	Fwd	CTAACCGGCCAATCCCAAGT
		Rev	ATTTAAAACCCACGCAGCCG
human	<i>CDKN2B</i> (p15)	Fwd	GTCGCGGAGTCCTCACTG
		Rev	CGGAATTCTTTGCCGGCTG
human	<i>CCNG2</i>	Fwd	CTTAGGGGCGGGACTCTTTT
		Rev	CCGAGCCCCTTGTTTTTGT
human	<i>SOBP</i>	Fwd	TCCCTTCCCTGAAGGAGCATGCA
		Rev	GGGCAAGACCTGAGGGCCCA

表 3. プライマー配列一覧

## 2.5. RNA シーケンシング (RNA-seq) 及び RNA-seq データ解析

cDNA ライブラリー作成に RNeasy Mini Kit with the On-Column DNase Digestion Set (Qiagen)、Dynabeads mRNA DIRECT Purification Kit、the Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific)を使用した。RNA シーケンシングには the Ion Proton sequencer (Thermo Fisher Scientific)を使用した。ヒトゲノムのレファレンス配列 (NCBI Build 37/hg19, February 2009)及び GTF アノテーションファイルは iGenomes ([http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/igenome.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html)) より入手した。遺伝子発現レベルは Tophat/Cufflinks (version 2.0.10 and 2.1.1, respectively) を使用し fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) を算出した。

## 2.6. 免疫ブロッティング

すべての培養細胞は 50 mM Tris/HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate を含む RIPA Buffer に protease inhibitor cocktail (cOmplete, EDTA-free, Roche Applied Science) を加えて溶解した。細胞成分分画には NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific) を使用し、手順通りに行った。サンプルは SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Pall) に転写した。luminescence image analyzer

(LAS-4000; Fujifilm) にて化学発光を検出した。

## 2.7. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーでは Cell Sorter SH800S (Sony Corporation) を使用し、解析に FlowJo software を使用した。

T47D-Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) の樹立にあたり、まず S/G2/M 期に発現する Geminin に monomeric Azami-Green 1 蛍光タンパクを融合した mAG-hGeminin と G1 期に発現する Cdt1 に Kusabira-Orange 2 蛍光タンパクを融合した mKO2-hCdt1 をレンチウイルスベクターを用いて T47D 細胞に導入することで細胞周期を可視化した[24]。次に、mAG-hGeminin 発現レンチウイルス非感染細胞を除去するため mAG 陽性細胞のみ選別した細胞を 1 週間以上培養した。T47D-Fucci 細胞に Palbociclib 50 nM 投与、非投与及び Activin A (ActA) 50 ng/ml 刺激、無刺激の 4 条件で 24 時間経過後、解析を行った。

## 2.8. BrdU、EdU 細胞増殖アッセイ

BrdU 細胞増殖アッセイでは Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Sigma-Aldrich) を使用し BrdU 取り込みに対する化学発光を検出することで細胞増殖を評価した。

T47D 細胞は 500 cells/well、Hs578T 細胞は 500-1000 cells/well を播種した。

Palbociclib 50 nM 投与、非投与及び ActA 50 ng/ml 刺激、無刺激の 4 条件で 24 時間経過後、10  $\mu$ M BrdU (Roche) を加え一晩静置した。細胞固定後、anti-BrdU peroxygenase antibody を 1.5 時間反応させ、peroxygenase の発光強度をルミノメーターMithras LB940FP (Berthold technologies) を用いて測定した。

EdU 細胞増殖アッセイでは、Click -iT EdU Imaging Kits (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 及び Cell Sorter SH800S (Sony Corporation) を使用した。上記 4 条件で 24 時間経過後、10  $\mu$ M EdU を加え 1.5 時間静置した。EdU に Alexa Fluor 488-picolyl azide を結合させ、推奨されたプロトコールに従って Cell Sorter SH800S で測定した。

## 2.9. ルシフェラーゼアッセイ

T47D 細胞を 24-well plates に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種し、9 $\times$ CAGA luciferase vector (1  $\mu$ g) 及び pGL4.74-TK-Renilla (10 ng) を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションより 24 時間後、Palbociclib 1  $\mu$ M 投与し、4–6 時間後に ActA 50 ng/ml 刺激した。ActA 刺激より 24 時間後に測定した。非投与、Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml、及び Palbociclib 投与後 ActA 刺激の 4 条件でルミノメーターMithras LB940FP を用いて測定した。Hs578T 細胞ではトランスフェクション効率のばらつきが大きかつ

たため、レンチウイルスを用いて 9×CAGA-Luc 及び CMV-Renilla の安定発現株を作成し、T47D 細胞と同条件で測定した。

## 2.10. GSEA (Gene set enrichment analysis) 解析

GSEA 解析は GSEA ソフトウェア (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) を使用した。

2 条件間での発現比 ( $\log_2$  FC) を計算し、Molecular Signatures Database v6.1 (MSigDB, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp>) の C6 (oncogenic signatures) に含まれる遺伝子群の変動を解析した。p-value < 5%かつ FDR q-value < 25%を有意差ありと設定した。

## 2.11. ChIP 及び ChIP シーケンシング解析

T47D 細胞及び Hs578T 細胞を 10 cm プレートで培養し、1 条件あたり  $5-10 \times 10^6$  細胞を使用した。1%ホルムアルデヒドにより 10 分間常温で振盪させ細胞固定した後、125 mM グリシンを加えて 5 分後振盪させ、冷却した PBS で洗浄した。細胞を回収し、50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS、cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) を含む lysis buffer 1ml で氷冷しながら懸濁した。続いて、DNA 断片が約 200-500 bp となるように、ク

ロマチンを Bioruptor sonicator を用いて 30 秒間隔 3 サイクルで超音波処理した。細胞抽出液を ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA、1% Triton X-100、150 mM NaCl、cOmplete EDTA-free) で 10 倍希釈した。予め Anti-SMAD2 抗体 5-10  $\mu$ g を 2 時間以上結合させた Protein A Dynabeads (30  $\mu$ l; Invitrogen Life Technologies) を加え、4°C 下で 4-8 時間反応させた。Dynabeads を RIPA buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.0、0.5 M LiCl、1 mM EDTA、0.7% deoxycholate、1% NP-40) で 5 回、TE buffer (pH 8.0) で 1 回洗浄した後、elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA、1% SDS) に溶出し、65°C で一晩静置し、脱クロスリンクさせた。ゲノム DNA は QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて抽出した。

ChIP シーケンシング解析にあたり、IonXpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてライブラリーを作成した。アダプターライゲーションしたサンプルを PCR 15 サイクルで増幅させ、E-Gel SizeSelect (Thermo Fisher Scientific) にて精製した。シーケンシングには Ion Proton sequencer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。ヒトゲノムのレファレンス配列 (NCBI Build 37/hg19, February 2009) 及び GTF アノテーションファイルは iGenomes ([http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/igenome.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html)) より入手した。ChIP データはすべて 50 bp に縮小し、Bowtie (version 1.0.0) (Langmead et al,



2009) を利用してマッピングした。MACS2 software (Model based analysis of ChIP-seq) (version 2.0.9) で q 値 0.05 未満を標準として SMAD2 の結合領域を同定した。結合部位モチーフの解析に MEME-ChIP (MEME-ChIP version 4.12; <http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme-chip.cgi>) を使用した。SMAD2 の結合領域におけるリード数をカウントするにあたり、Picard MarkDuplicates (version 1.103) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を使用し重複リードを除外した。bedtools multicov tool (version 2.17.0) で計算したリード数を reads per million reads (RPM) を単位として表示した。

## 2.12. 統計解析

GraphPad Prism 6 を使用して統計解析を行った。2 群間比較では Welch's t-test を行い、多群間比較は analysis of variance (ANOVA) 検定のうえで Tukey-Kramer post hoc test を用いて解析した。(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ )

## 2.13. データ利用

RNA-seq 及び ChIP-seq の生データは NCBI GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) にて公表されている (識別子 GSE117502)。

### 3. 結果

#### 3.1. Palbociclib は Activin と相加的に細胞増殖を抑制する

まず ER 陽性ヒト乳癌細胞株 T47D 細胞、MCF7 細胞を使用し、TGF- $\beta$ /Activin シグナル活性を評価した。Activin A (ActA) は TGF- $\beta$  と同様、CDK inhibitor である p21 や p27 を誘導し、SMAD 経路を介して細胞周期停滞を起こすと考えられている。ActA では T47D 細胞、MCF7 細胞いずれにおいても SMAD2、SMAD3 の C 末端がリン酸化されるのに対し、TGF- $\beta$  では T47D 細胞においてリン酸化されないことがわかった。この結果より本研究において ActA をリガンドとして使用することとした。また MCF7 細胞では ActA によって SMAD2、SMAD3 の C 末端いずれもリン酸化を受けるのに対し、T47D 細胞では主に SMAD2 の C 末端がリン酸化していることがわかった (図 5)。次に、T47D 細胞において BrdU、EdU 細胞増殖アッセイ及び Fucci システムを利用し、Palbociclib 及び ActA の細胞周期への影響を評価した。Palbociclib は両細胞において感受性が高く、T47D 細胞の IC<sub>50</sub> 値が 127 nM、MCF7 の IC<sub>50</sub> 値は 148 nM という報告がある[25]。BrdU 細胞増殖アッセイでは、コントロールに対し Palbociclib (50 nM)、ActA (50 ng/ml) を投与した 24 時間後に、BrdU を投与しルミノメーターで測定したところ、それぞれ BrdU の取り込みが減少し、細胞の増殖が抑制されていることがわかった。さらに Palbociclib 及び ActA を併用すると相加的に細胞周期を停滞させることが

示された(図 6、図 7)。次に EdU incorporation assay を行った。Palbociclib (50 nM)、ActA (50 ng/ml) を投与した 24 時間後に、EdU を投与した。EdU 取り込み細胞に Alexa Fluor 488-picolyl azide (AF-488) を結合させ、AF-488 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで測定することによって細胞増殖能を評価した。Palbociclib 及び ActA が相加的に細胞増殖を抑制し、BrdU incorporation assay と同様の傾向が得られた (図 8、図 9)。

さらに、Fucci システムによるフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。T47D 細胞に S/G2/M 期に発現する mAG-hGeminin と G1 期に発現する mKO2-hCdt1 による Fucci システムを導入した。コントロールに対し Palbociclib (50 nM) 及び ActA (50 ng/ml) を投与すると、mAG 陽性細胞 (S/G2/M 期) の割合が減少し、mKO2 陽性細胞 (G1 期) が増加した。さらに両者の併用により相加的に mAG 陽性細胞が減少し、細胞周期を停滞させた (図 10)。独立した 7 回の実験において mAG 陽性かつ mKO2 陰性細胞の割合を見ると (図 11)、Palbociclib と ActA が相加的に細胞増殖を抑制させることがわかった。

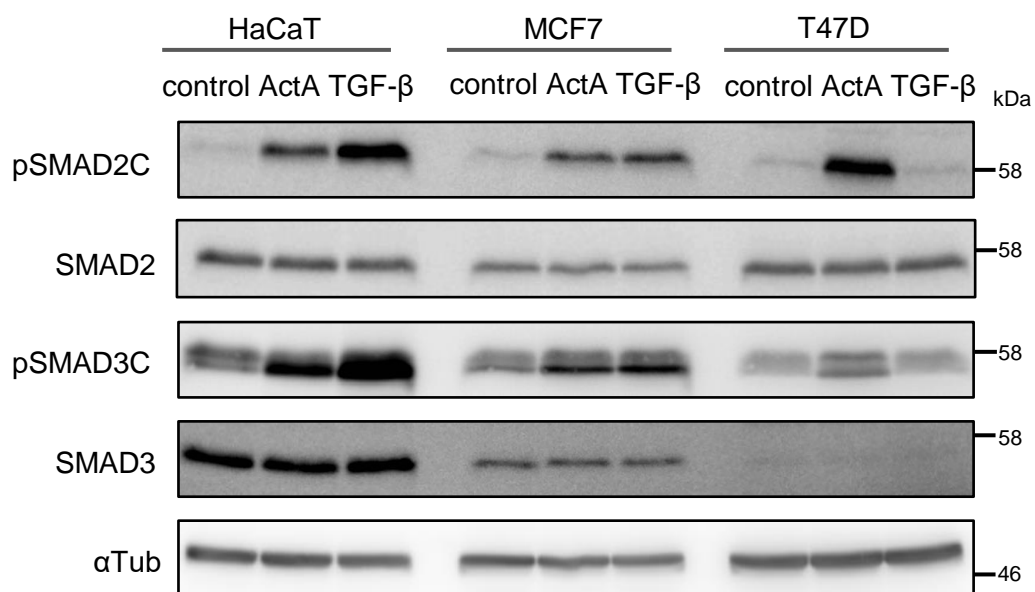


図 5. 免疫ブロット法によるリン酸化 SMAD2 及び SMAD3 の検出  
 ホルモン陽性乳癌細胞 MCF7, T47D 及びヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞で  
 TGF-β 1 ng/ml または ActA 50 ng/ml を 1.5 時間刺激した。

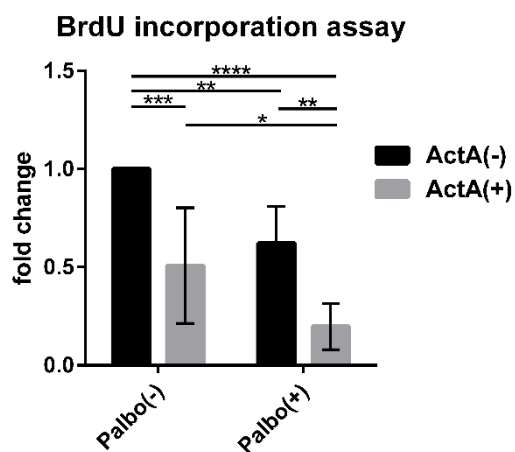


図 6. BrdU 細胞増殖アッセイ

T47D 細胞に Palbociclib 50 nM 及び ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後、BrdU を加え一晩静置した。抗 BrdU 抗体を 1.5 時間刺激後、アッセイを行った。独立した 6 回の実験の平均値を示した。

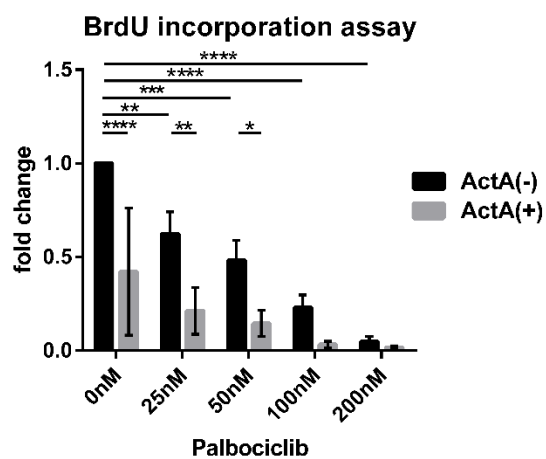


図 7. BrdU 細胞増殖アッセイ

T47D 細胞に Palbociclib 0-200 nM 及び ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後、BrdU を加え一晩静置した。抗 BrdU 抗体を 1.5 時間刺激後、アッセイを行った。独立した 4 回の実験の平均値を示した。

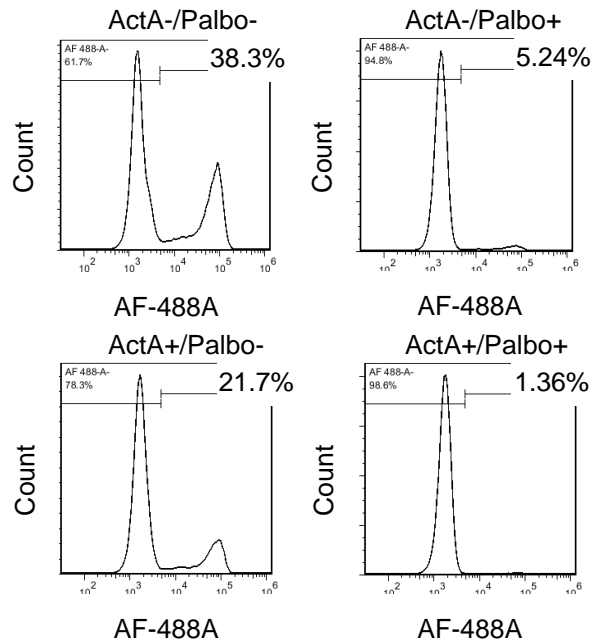


図 8. EdU 細胞増殖アッセイ

T47D 細胞に Palbociclib 50 nM 及び ActA 50 ng/ml を投与し 24 時間後、EdU を加え 1.5 時間後にフローサイトメトリーにて測定した。独立した 2 回の実験における 5 回の biological replicates より代表的な結果を示した。

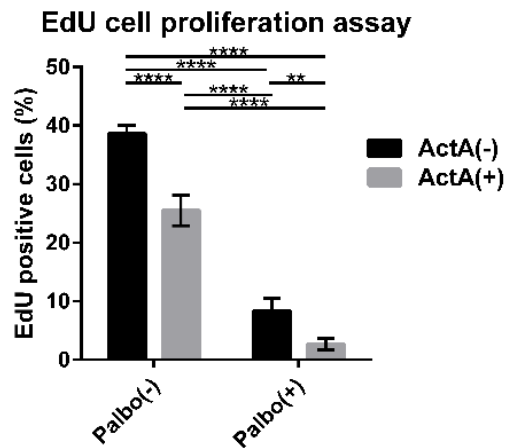


図 9. EdU 細胞増殖アッセイ

T47D 細胞に Palbociclib 50 nM 及び ActA 50 ng/ml を投与し 24 時間後、EdU を加え 1.5 時間後にフローサイトメトリーにて測定した。5 回の biological replicates における Alexa Fluor 488-picolyl azide (AF-488) 陽性 (S/G2/M 期) 細胞の割合の平均値を示した。

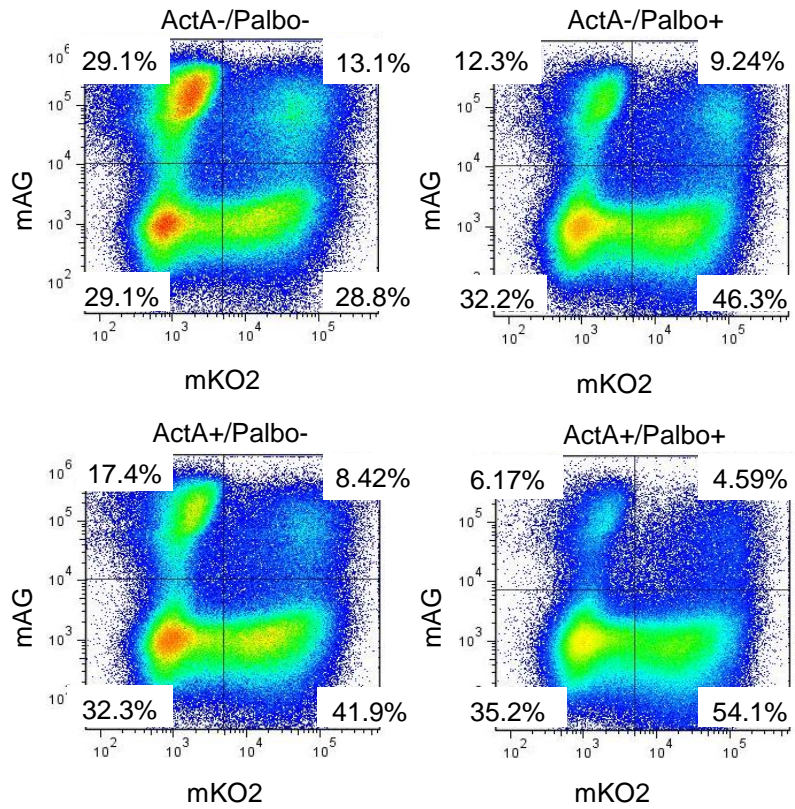


図 10. Fucci システムによる細胞増殖アッセイ

T47D 細胞に Palbociclib 50 nM, ActA 50 ng/ml を投与し、24 時間後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を行った。独立した 7 回の実験より代表的な結果を示した。

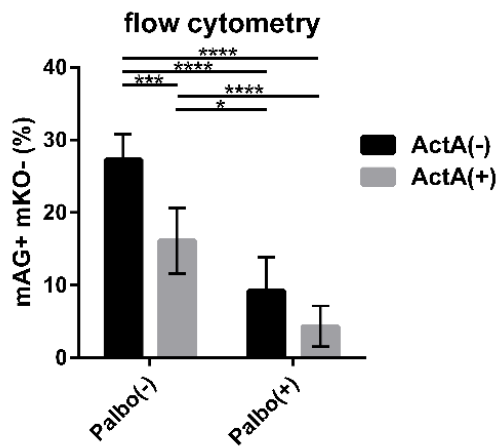


図 11. Fucci システムによる細胞増殖アッセイ

図 10 参照。独立した 7 回の実験における mAG 陽性かつ mKO2 陰性(S/G2/M 期) 細胞の割合の平均値を示した。

### 3.2. Palbociclib が SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化を阻害する

これまでに、CDK4 が SMAD3 の Thr8、Thr220、SMAD2 の Ser255 をリン酸化しているという報告がある[20],[21]。そこで本研究では T47D 細胞において CDK4/6 がリン酸化する SMAD2 のリン酸化アミノ酸残基について検証した。T47D 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M 投与し 1.5 時間後、SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化が阻害されていることがわかった。その他、既存の報告があるものでは SMAD2/SMAD3 の MH1 ドメイン領域の Thr8 のリン酸化がわずかに阻害されるのみであった(図 12)。また、Palbociclib の投与濃度を 0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M として濃度毎にリン酸化の程度を観察した。Palbociclib 250 nM の投与濃度で SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化の阻害効果が得られ、これは Rb Ser780 のリン酸化阻害効果と同程度であった(図 13)。

次に、SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化を阻害することによる核内移行への影響を検証するため核/細胞質分画キットを使用し免疫ブロットを行った。T47D 細胞で無刺激、ActA 刺激 1.5 時間、Palbociclib 1  $\mu$ M 投与し 24 時間培養後 ActA 刺激 1.5 時間の 3 条件で行った。Palbociclib を投与することによって SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化を阻害したが、Palbociclib 非投与と比較し SMAD2 の核内移行を促進することはなかった(図 14)。



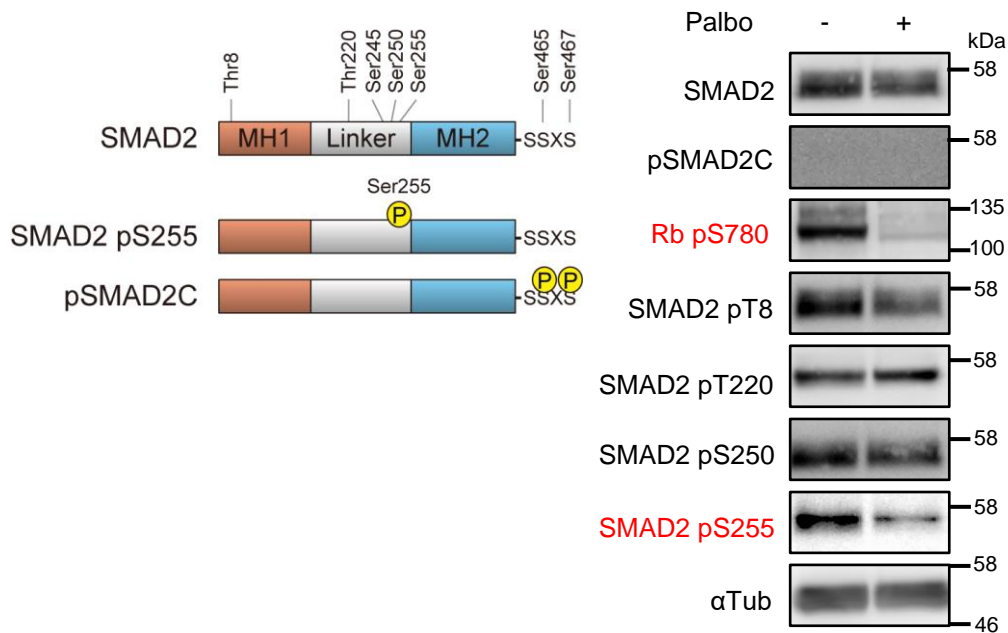


図 12. SMAD2 リンカー領域に対する免疫ブロッティング  
 T47D 細胞において Palbociclib 1  $\mu$ M で 24 時間刺激した後、上記抗体により  
 検出した。

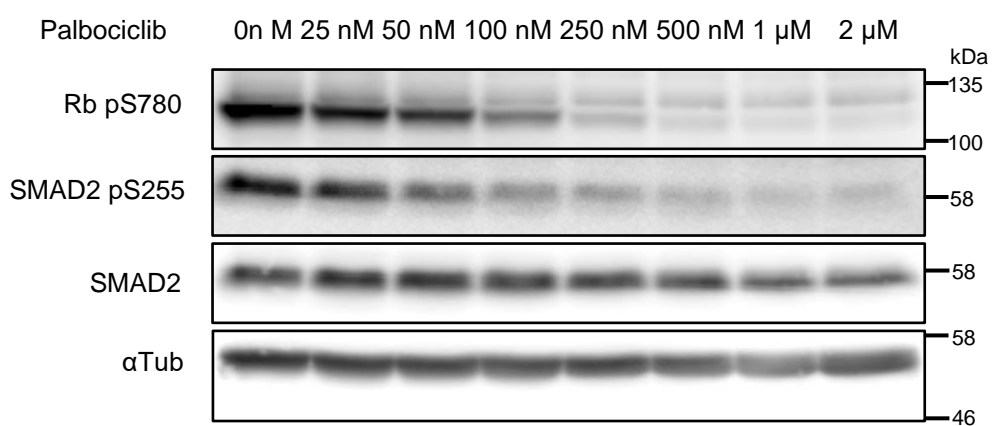


図 13. SMAD2 S255 及び Rb のリン酸化に対する Palbociclib の濃度の影響  
 T47D 細胞において Palbociclib を濃度毎 (0 nM-2  $\mu$ M) に 24 時間刺激した  
 後、上記抗体にて検出した。

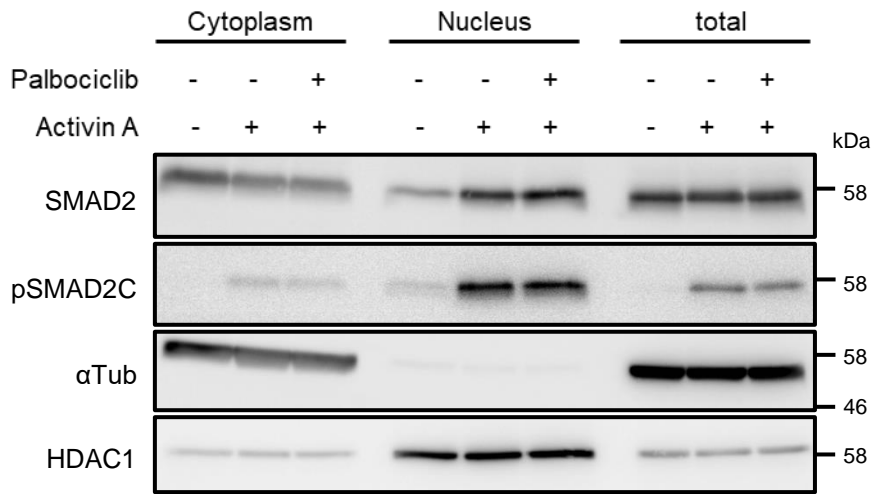


図 14. 細胞分画法を用いた免疫ブロッティング

T47D 細胞において Palbociclib 1  $\mu$ M 投与 24 時間後、ActA 50 ng/ml で 1.5 時間刺激し、上記抗体にて検出した。

### 3.3. ホルモン受容体陽性乳癌 T47D 細胞株において Palbociclib は SMAD2 のゲノム上への結合を増強する

Palbociclib が Activin-SMAD 経路へどのような影響を与えるかを検討するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) によって SMAD2 結合領域の網羅的解析を行った。T47D 細胞を使用し、Palbociclib 非投与の細胞と Palbociclib 1  $\mu$ M 投与下で 24 時間培養した細胞において、ActA 1.5 時間刺激した後、SMAD2 抗体を用いて ChIP を行った。ChIP は同条件で 2 回繰り返し、それぞれ 2 回分の共通領域を選択し、解析することとした。Palbociclib 投与下と非投与下の共通の結合箇所に対し、SMAD2 の結合量の増減を散布図で示した (図 15)。Palbociclib 投与下では非投与下と比較し結合量が増加しており、Palbociclib を投与することによって SMAD2 のゲノム上への結合を増強すると考えられた。Activin-SMAD の標的遺伝子として代表的な *PMEPA1* や *CDKN2B* に着目すると、いずれも Palbociclib を投与することによって結合量が増加した (図 16)。ChIP-qPCR においても *PMEPA1* 及び *CDKN2B* の fold enrichment の値は有意に上昇した (図 17)。結合箇所による検討では、Palbociclib 非投与下での SMAD2 の結合箇所 36457 箇所に対し、Palbociclib 投与下では 44671 箇所と結合箇所の増加を認めた。また、両者の共通領域は 29539 箇所であり、Palbociclib 非投与下における結合箇所の 81% が共通していた (図 18)。続いて、motif enrichment analysis によって結合箇所のモチー

フ解析を行った。Palbociclib 投与下・非投与下いずれにおいても FOX ファミリーの転写因子が上位にあがった (図 19)。特に FOXA1 は ER 陽性乳癌においてクロマチン制御に関わるパイオニア転写因子と考えられており、エストロゲン標的遺伝子の転写調節因子の一つである[26], [27]。ER 陽性乳癌において FOXA1 が結合するエンハンサー領域に SMAD 複合体が結合している可能性が考えられた。また、SMAD2 はゲノム上に直接結合しないことが知られているが、SMAD2 結合箇所のうち、Palbociclib 非投与下では 36.5% (13324/36475) 、Palbociclib 投与下では 39.8% (17785/44671) 、共通領域では 37.4% (11039/29539) に SMAD モチーフが存在していることから SMAD2 が SMAD3 または SMAD4 と複合体を形成してゲノム上に結合していることが想定される。上記 ChIP シーケンシングの結果から Palbociclib は SMAD2 のゲノム上への結合を増強する一方で、結合部位の変化への影響は少ないものと考えられた。

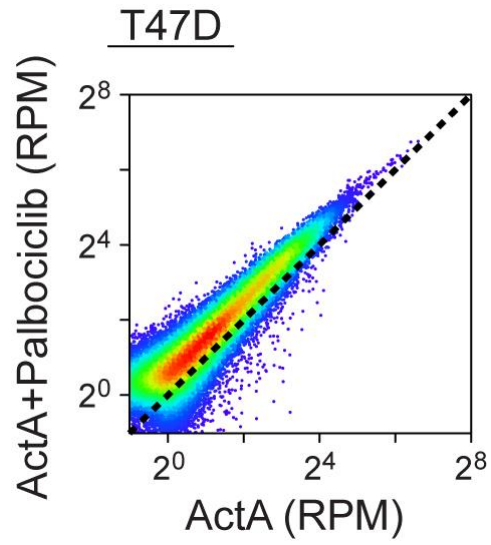
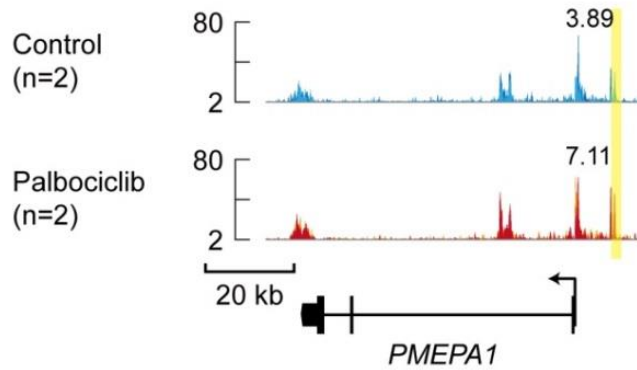


図 15. T47D 細胞における Palbociclib の SMAD2 ゲノム結合強度への影響  
Palbociclib 1  $\mu$ M 24 時間投与と非投与の T47D 細胞に Act A 50 ng/ml で 1.5 時間刺激し、SMAD2 結合領域におけるそれぞれの結合量を散布図で示した。

**SMAD2 ChIP-seq, T47D+ActA**



**SMAD2 ChIP-seq, T47D+ActA**

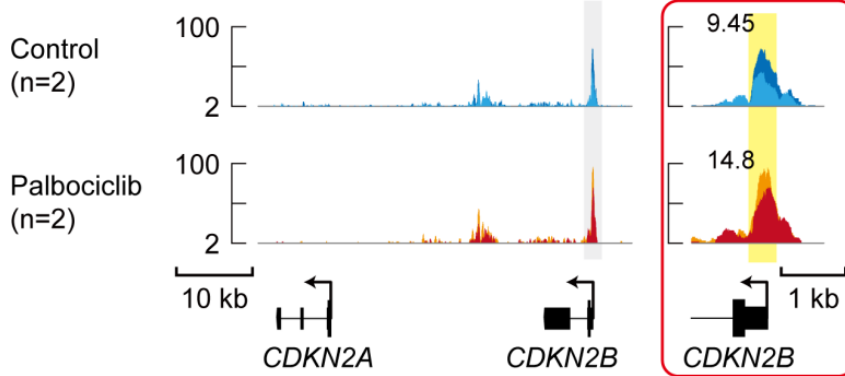


図 16. 遺伝子座

T47D 細胞で SMAD2 の標的遺伝子 *PMEPA1*, *CDKN2B* における結合量を示した。

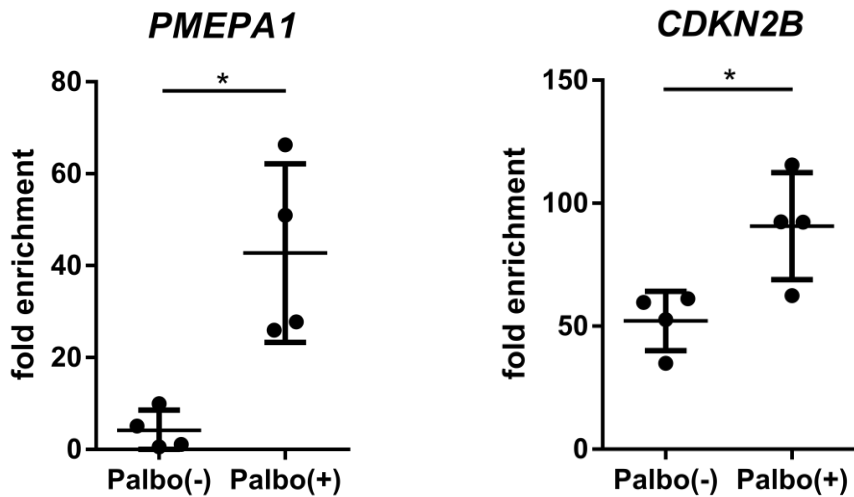


図 17. ChIP-qPCR による fold enrichment

独立した 4 回の実験より *PMEPA1*, *CDKN2B* における fold enrichment を示した。*SOBP* を negative control とした。

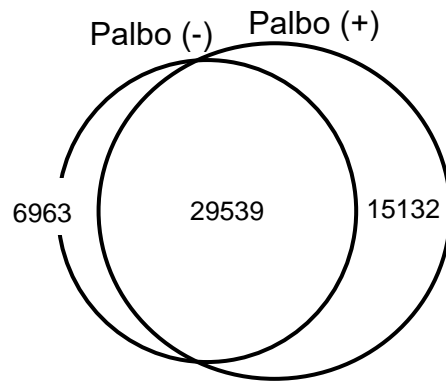


図 18. SMAD2 の結合領域

Palbociclib 投与、非投与下で ActA 1.5 時間刺激し、それぞれの SMAD2 結合領域の数を示した。

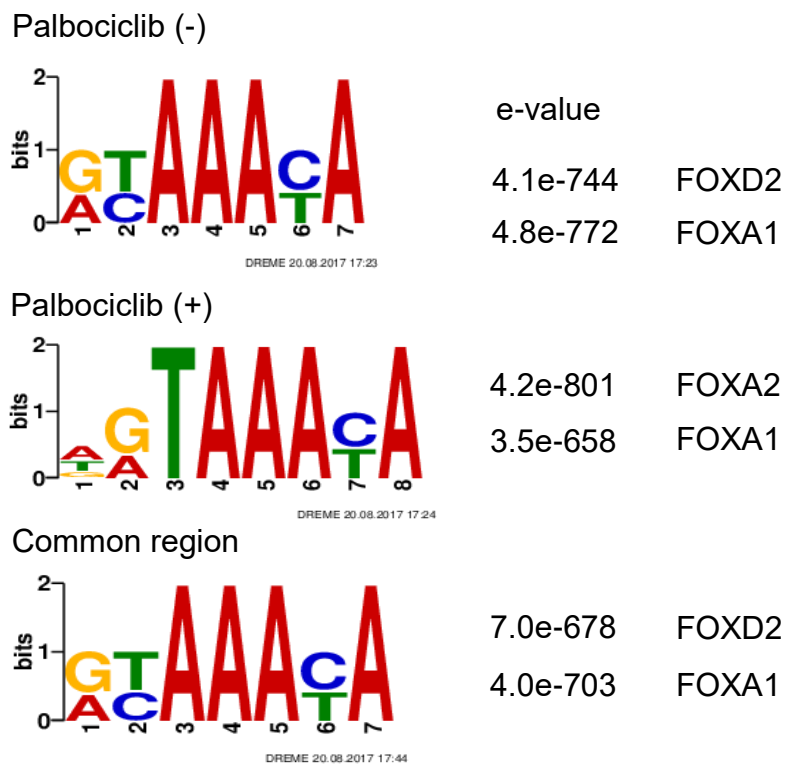


図 19. モチーフ解析

SMAD2 結合領域に対してモチーフ解析の結果を示した。

### 3.4. Palbociclib が Activin-SMAD シグナルを増強させる

続いて、T47D 細胞において RNA-シーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析は次世代シーケンサーを使用し、Palbociclib 非投与下と Palbociclib 1  $\mu$ M 投与下で 24 時間培養した後、それぞれ ActA 50 ng/ml を 24 時間刺激・無刺激の 4 条件下で行った。Gene set enrichment analysis 解析ソフトを使用し、the oncogenic signature (C6, MSigDB) にて解析した。NOM p-value<0.05 かつ FDR q-value<0.25 を有意とし、各条件において有意に濃縮した遺伝子群を図 20 に示した。Palbociclib を投与することによって RB\_P107\_DN.V1\_UP (RB1 または RBL1 をノックアウトすることにより上昇する遺伝子群) [28] が濃縮しており、この解析の妥当性が確認できた (図 20b、20f)。ActA 刺激・無刺激いずれの場合でも Palbociclib を投与することで TGFB\_UP.V1\_UP [29] が有意に濃縮し (図 20a、20e)、さらに ActA 刺激した方が有意であった。また、Palbociclib 非投与下において ActA 刺激をした細胞では TGFB\_UP.V1\_UP が有意ではなかったが (図 21c)、Palbociclib を投与した条件では ActA 刺激によって TGFB\_UP.V1\_UP が有意に濃縮した (図 21g)。さらに、ChIP シーケンシングにおける SMAD2 の結合領域に限定した遺伝子発現解析でも同様に、ActA 刺激下で Palbociclib を投与した方が TGFB\_UP.V1\_UP が有意に濃縮した (図 22)。この結果より Palbociclib と ActA が相加的に TGF- $\beta$ /Activin



シグナルを増強し、CDK4/6 経路及び Activin-SMAD 経路がクロストークしている可能性が示唆された。次に、9×CAGA ルシフェーラーゼレポータープラスミドを使用したレポーターアッセイによって Palbociclib の Activin-SMAD シグナルへの影響を評価した。Palbociclib 投与 4-6 時間後に Activin 刺激をしたものでは、Palbociclib 非投与下で Activin 刺激したものに対し Activin-SMAD シグナル活性が有意に上昇した (図 23)。

Activin-SMAD の標的遺伝子として前述の *PMEPA1*、*CDKN2B* の発現変化を RT-PCR で評価したところ、Palbociclib と ActA を投与することで相加的な発現上昇がみられた (図 24)。これに対し、DMSO 0.1%または ALK4/5/7 阻害薬 SB431542 10  $\mu$ M を投与 24 時間後、それぞれ無刺激、Palbociclib 1  $\mu$ M 24 時間、ActA 50 ng/ml 24 時間、ActA 50 ng/ml +Palbociclib 1  $\mu$ M 24 時間刺激した計 8 条件で観察したところ、SB431542 によって Activin-SMAD 経路を遮断させた条件で *PMEPA1*、*CDKN2B* の発現は有意に抑えられた (図 25)。

次に、TGF- $\beta$ /Activin の作用の一つである腫瘍促進作用への影響を検討した。EMT や浸潤能に関連する代表的な遺伝子群について、RT-PCR 及び免疫ブロット法により発現変化を評価した。RT-PCR では Palbociclib を投与することで *CDH1* (E-cadherin) がわずかに上昇したが、その他 *CDH2* (N-cadherin)、*ZEB1*、*FNI* (Fibronectin) 等は明らかな上昇を認めなかった (図 26)。この結果は、RNA-Seq

の発現データと同様であり、*CDH1* でわずかに上昇したほか、間葉系マーカーとして代表的な遺伝子 *CDH2*、*ZEB1*、*FN1*、*SNAIL*、*SNAI2* についてはほとんど発現していなかった（表 4）。免疫ブロット法では E-cadherin は明らかな変化を認めず、N-cadherin、Fibronectin はほとんど発現していなかった（図 27）。以上より、T47D 細胞において Palbociclib は Activin-SMAD シグナルを増強することによって細胞増殖抑制作用を増強する一方で、腫瘍促進作用への影響は明らかではなかった。

Palbo+/- without  
ActA

(a) Palbo+ enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
LEF1_UP.V1_DN	2.02	0.000	0.007
RAF_UP.V1_DN	1.96	0.000	0.010
IL15_UP.V1_DN	1.89	0.004	0.017
STK33_UP	1.85	0.000	0.019
PRC2_EZH2_UP.V1_DN	1.79	0.000	0.029
BRCA1_DN.V1_UP	1.75	0.005	0.033
STK33_NOMO_UP	1.68	0.000	0.057
STK33_SKM_UP	1.64	0.005	0.069
EGFR_UP.V1_UP	1.64	0.000	0.064
ESC_J1_UP_LATE.V1_UP	1.63	0.000	0.060
MEL18_DN.V1_DN	1.61	0.008	0.064
PTEN_DN.V2_UP	1.60	0.000	0.064
TGFB_UP.V1_UP	1.59	0.000	0.063
PRC2_EED_UP.V1_UP	1.56	0.000	0.075
KRAS.PROSTATE_UP.V1_DN	1.54	0.035	0.079
RB_P130_DN.V1_DN	1.53	0.000	0.083
BMI1_DN.V1_DN	1.49	0.008	0.103
VEGF_A_UP.V1_UP	1.48	0.005	0.108
KRAS.KIDNEY_UP.V1_UP	1.48	0.026	0.103
LTE2_UP.V1_UP	1.48	0.000	0.098

(n=9,261 genes, Comparison of Palbo +/- in cells without ActA)

(b) Palbo- enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
PRC2_EZH2_UP.V1_UP	-2.49	0.000	0.000
RB_P107_DN.V1_UP	-2.48	0.000	0.000
E2F3_UP.V1_UP	-2.39	0.000	0.000
CSR_LATE_UP.V1_UP	-2.33	0.000	0.000
RPS14_DN.V1_DN	-2.32	0.000	0.000
PRC2_EED_UP.V1_DN	-2.20	0.000	0.000
E2F1_UP.V1_UP	-2.15	0.000	0.000
RB_P130_DN.V1_UP	-2.07	0.000	0.000
GCNP_SHH_UP_LATE.V1_UP	-2.00	0.000	0.000
RB_DN.V1_UP	-1.98	0.000	0.001
VEGF_A_UP.V1_DN	-1.96	0.000	0.001
P53_DN.V2_DN	-1.93	0.000	0.001
HOXA9_DN.V1_DN	-1.90	0.000	0.001
ATF2_UP.V1_UP	-1.87	0.000	0.001
PIGF_UP.V1_DN	-1.75	0.001	0.007
MTOR_UP.V1_UP	-1.70	0.001	0.013
MYC_UP.V1_UP	-1.67	0.001	0.018
GCNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP	-1.67	0.001	0.018
ATF2_S_UP.V1_UP	-1.66	0.004	0.018
CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE	-1.65	0.006	0.020

(n=9,261 genes, Comparison of Palbo +/- in cells without ActA)

ActA+/- without  
Palbo

(c) ActA+ enrichment

(no enrichment)

(d) ActA- enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
E2F3_UP.V1_UP	-1.84	0.000	0.043
IL15_UP.V1_UP	-1.81	0.001	0.035
CYCLIN_D1_UP.V1_UP	-1.74	0.000	0.060
CRX_NRL_DN.V1_UP	-1.70	0.001	0.073
ESC_J1_UP_EARLY.V1_DN	-1.70	0.001	0.064
PIGF_UP.V1_DN	-1.70	0.001	0.053
P53_DN.V2_UP	-1.69	0.006	0.048
KRAS.AMP.LUNG_UP.V1_DN	-1.68	0.003	0.055
RELA_DN.V1_DN	-1.65	0.009	0.064
PTEN_DN.V2_DN	-1.65	0.006	0.061
IL2_UP.V1_UP	-1.63	0.003	0.065
PRC2_EED_UP.V1_DN	-1.61	0.000	0.074
ATF2_UP.V1_UP	-1.58	0.005	0.093
RB_P130_DN.V1_UP	-1.58	0.004	0.092
ESC_V6.5_UP_EARLY.V1_DN	-1.56	0.012	0.096
KRAS.300_UP.V1_DN	-1.54	0.020	0.115
CYCLIN_D1_KE_V1_UP	-1.51	0.005	0.149
RAPA_EARLY_UP.V1_DN	-1.49	0.010	0.162
P53_DN.V2_DN	-1.44	0.045	0.246
GCNP_SHH_UP_LATE.V1_DN	-1.44	0.027	0.237

(n=9,261 genes, Comparison of ActA +/- in cells without Palbo)

Palbo+/- with  
ActA

(e) Palbo+ enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
ESC_V6.5_UP_EARLY.V1_DN	2.11	0.000	0.003
BCAT_BILD_ET_AL_UP	1.97	0.005	0.009
KRAS.300_UP.V1_DN	1.95	0.000	0.008
ESC_J1_UP_LATE.V1_UP	1.93	0.000	0.008
TGFB_UP.V1_UP	1.92	0.000	0.008
KRAS.600_UP.V1_DN	1.91	0.000	0.007
KRAS.LUNG_UP.V1_DN	1.85	0.000	0.015
VEGF_A_UP.V1_UP	1.82	0.000	0.019
BCAT.100_UP.V1_UP	1.78	0.008	0.022
IL15_UP.V1_DN	1.76	0.000	0.024
PRC2_EZH2_UP.V1_DN	1.75	0.000	0.024
KRAS.PROSTATE_UP.V1_DN	1.73	0.006	0.028
STK33_UP	1.71	0.000	0.031
SNF5_DN.V1_DN	1.70	0.004	0.031
E2F1_UP.V1_DN	1.70	0.000	0.029
PRC2_EED_UP.V1_UP	1.69	0.000	0.031
RELA_DN.V1_DN	1.67	0.017	0.037
STK33_NOMO_UP	1.66	0.000	0.035
KRAS.LUNG.BREAST_UP.V1_UP	1.65	0.026	0.038
PTEN_DN.V2_UP	1.64	0.004	0.038

(n=9,261 genes, Comparison of Palbo +/- in cells with ActA)

(f) Palbo- enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
RB_P107_DN.V1_UP	-2.70	0.000	0.000
PRC2_EZH2_UP.V1_UP	-2.65	0.000	0.000
CSR_LATE_UP.V1_UP	-2.48	0.000	0.000
RPS14_DN.V1_DN	-2.39	0.000	0.000
VEGF_A_UP.V1_DN	-2.34	0.000	0.000
GKNP_SHH_UP_LATE.V1_UP	-2.29	0.000	0.000
E2F1_UP.V1_UP	-2.29	0.000	0.000
E2F3_UP.V1_UP	-2.20	0.000	0.000
HOXA9_DN.V1_DN	-2.19	0.000	0.000
RB_DN.V1_UP	-2.01	0.000	0.000
PRC2_EED_UP.V1_DN	-2.00	0.000	0.000
RB_P130_DN.V1_UP	-1.92	0.000	0.000
CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE	-1.88	0.000	0.001
GKNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP	-1.88	0.000	0.001
SIRNA_EIF4GI_DN	-1.79	0.000	0.003
MTOR_UP.V1_UP	-1.79	0.000	0.003
ATF2_UP.V1_UP	-1.74	0.000	0.005
NFE2L2.V2	-1.71	0.000	0.007
P53_DN.V2_DN	-1.71	0.003	0.007
ATF2_S_UP.V1_UP	-1.67	0.004	0.012

(n=9,261 genes, Comparison of Palbo +/- in cells with ActA)

ActA+/- with  
Palbo

(g) ActA+ enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
E2F3_UP.V1_DN	1.90	0.000	0.089
ATM_DN.V1_UP	1.87	0.003	0.057
TGFB_UP.V1_UP	1.72	0.000	0.165
PRC1_BMI_UP.V1_DN	1.64	0.018	0.246

(n=9,261 genes, Comparison of ActA +/- in cells with Palbo)

(h) ActA- enrichment

oncogenic signatures (C6, MSigDB)	NES	NOM p-value	FDR q-value
VEGF_A_UP.V1_DN	-2.36	0.000	0.000
PIGF_UP.V1_UP	-2.12	0.000	0.000
ERB2_UP.V1_DN	-2.08	0.000	0.001
PRC2_EZH2_UP.V1_UP	-1.96	0.000	0.002
RB_P107_DN.V1_UP	-1.94	0.000	0.003
HOXA9_DN.V1_DN	-1.91	0.000	0.006
GKNP_SHH_UP_LATE.V1_UP	-1.80	0.000	0.022
GKNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP	-1.78	0.000	0.024
TBK1_DF_DN	-1.69	0.000	0.052
EGFR_UP.V1_DN	-1.61	0.004	0.108
RPS14_DN.V1_DN	-1.60	0.006	0.106
ATF2_S_UP.V1_UP	-1.54	0.021	0.161
SIRNA_EIF4GI_DN	-1.49	0.022	0.215
LTE2_UP.V1_UP	-1.49	0.014	0.200
E2F3_UP.V1_UP	-1.47	0.040	0.234
CSR_LATE_UP.V1_UP	-1.46	0.019	0.230
EIF4E_DN	-1.46	0.049	0.217

(n=9,261 genes, Comparison of ActA +/- in cells with Palbo)

図 20. 遺伝子発現解析 (Gene set enrichment analysis :GSEA)

Palbociclib 1  $\mu$ M 48 時間投与、ActA 50 ng/ml 24 時間投与後の T47D 細胞で遺伝子発現解析を行い、有意に濃縮した遺伝子群を示した (p-value<0.05 かつ FDR q-value<0.25 を有意とした)。

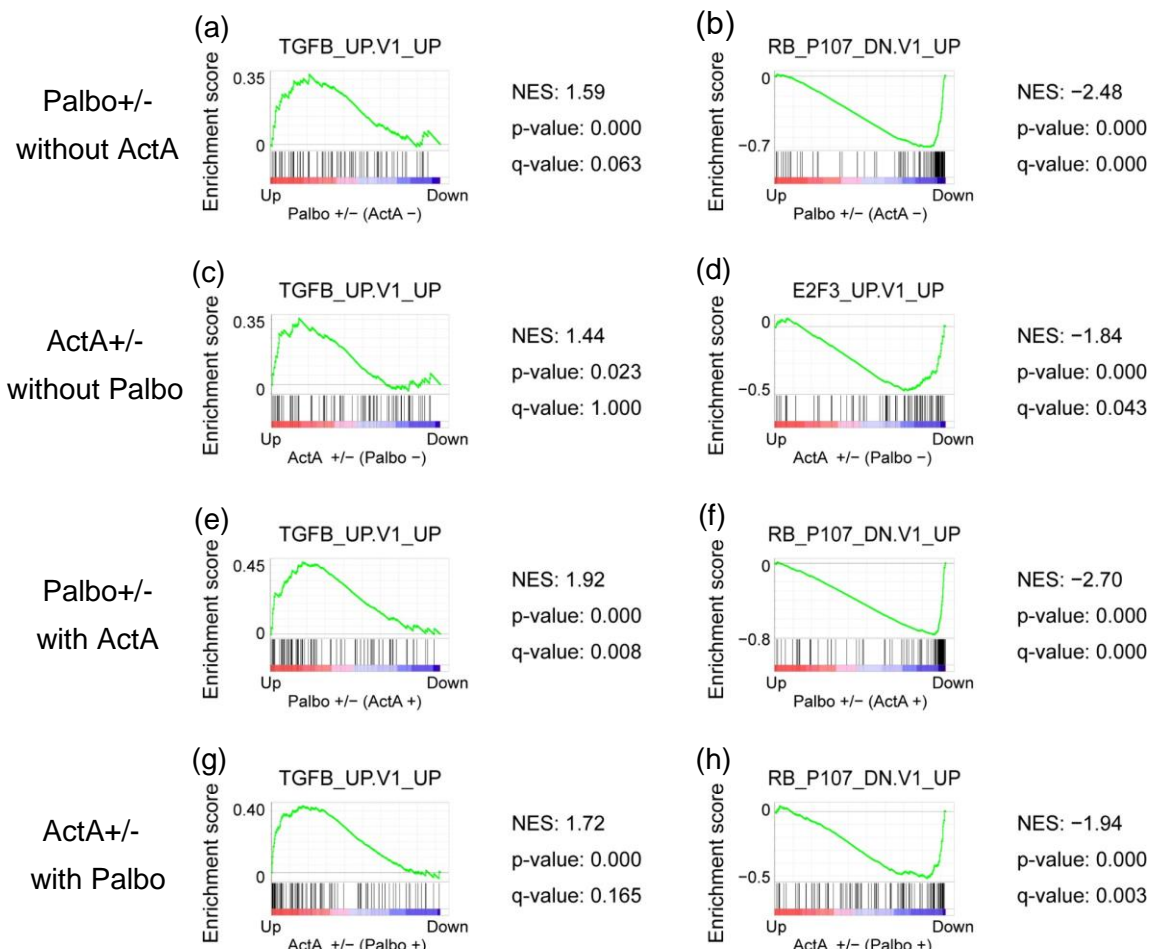


図 21. GSEA 解析

図 20 より TGFB\_UP.V1\_UP 及び RB\_P107\_DN.V1\_UP (一部 E2F3\_UP.V1\_UP) の遺伝子群に注目した。

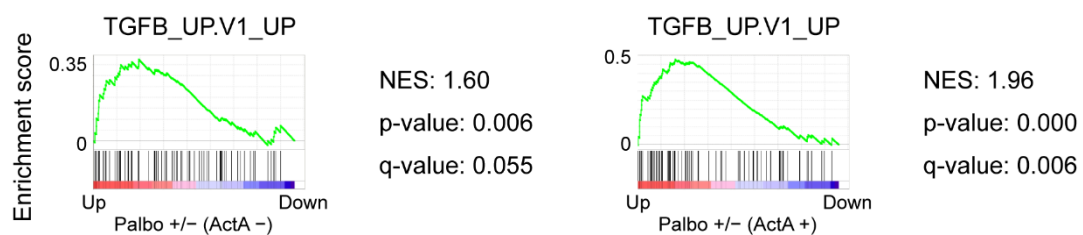


図 22. SMAD2 結合領域における GSEA 解析

SMAD2 結合領域に限定し、Palbociclib 投与、非投与での遺伝子発現解析結果を示した。

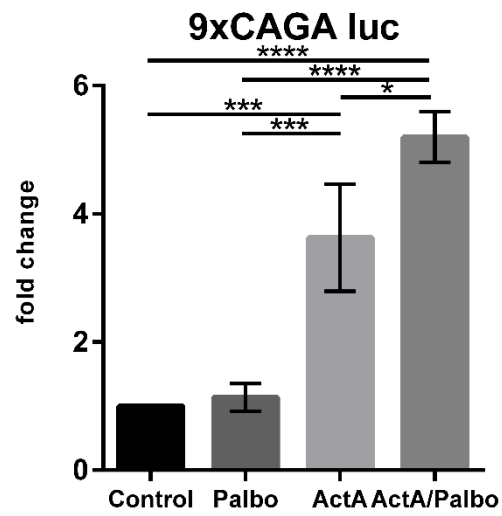


図 23. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

T47D 細胞において Palbociclib 1  $\mu$ M 投与した 4-6 時間後に、ActA 50 ng/ml を 24 時間刺激した。9×CAGA プラスミドを使用し Activin-SMAD シグナル活性を評価した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。

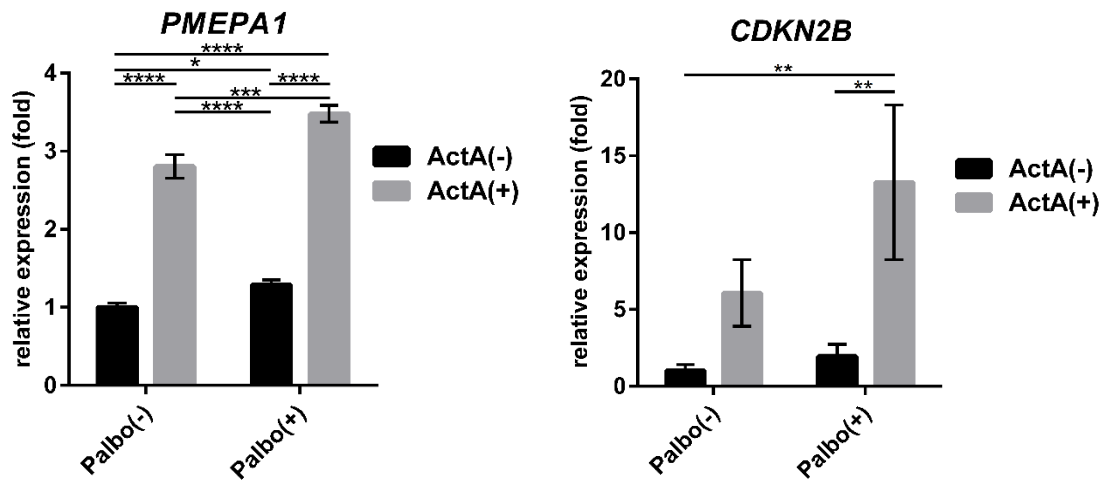


図 24. RNA の発現変化

T47D 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後に RT-PCR で *PMEPA1*、*CDKN2B* の RNA 発現変化を示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。

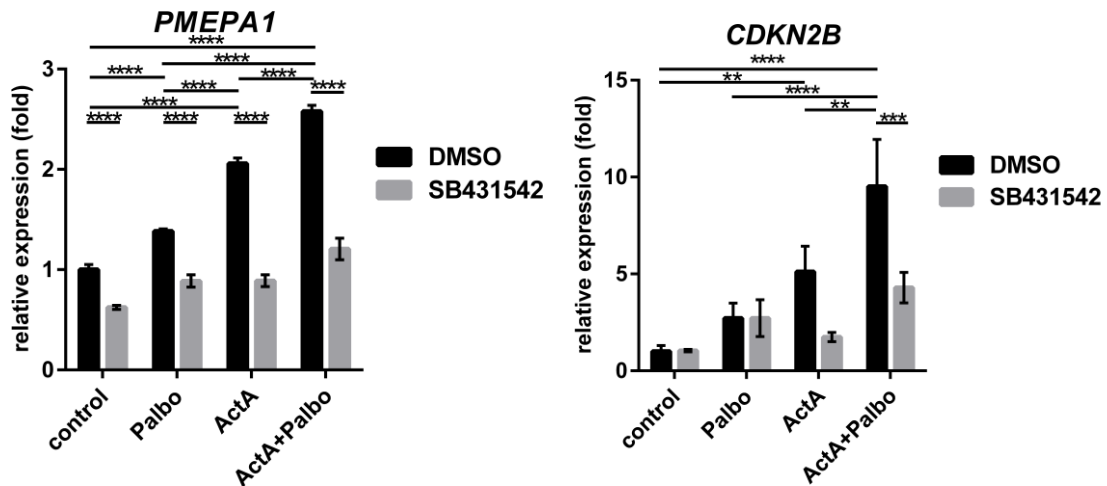


図 25. ALK4/5/7 阻害薬併用による RNA 発現変化

T47D 細胞に ALK4/5/7 阻害薬 (SB431542) 10  $\mu$ M または DMSO を投与した 24 時間後に、Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与した。さらに 24 時間後、RT-PCR で *PMEPA1*、*CDKN2B* の RNA 発現変化を示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。

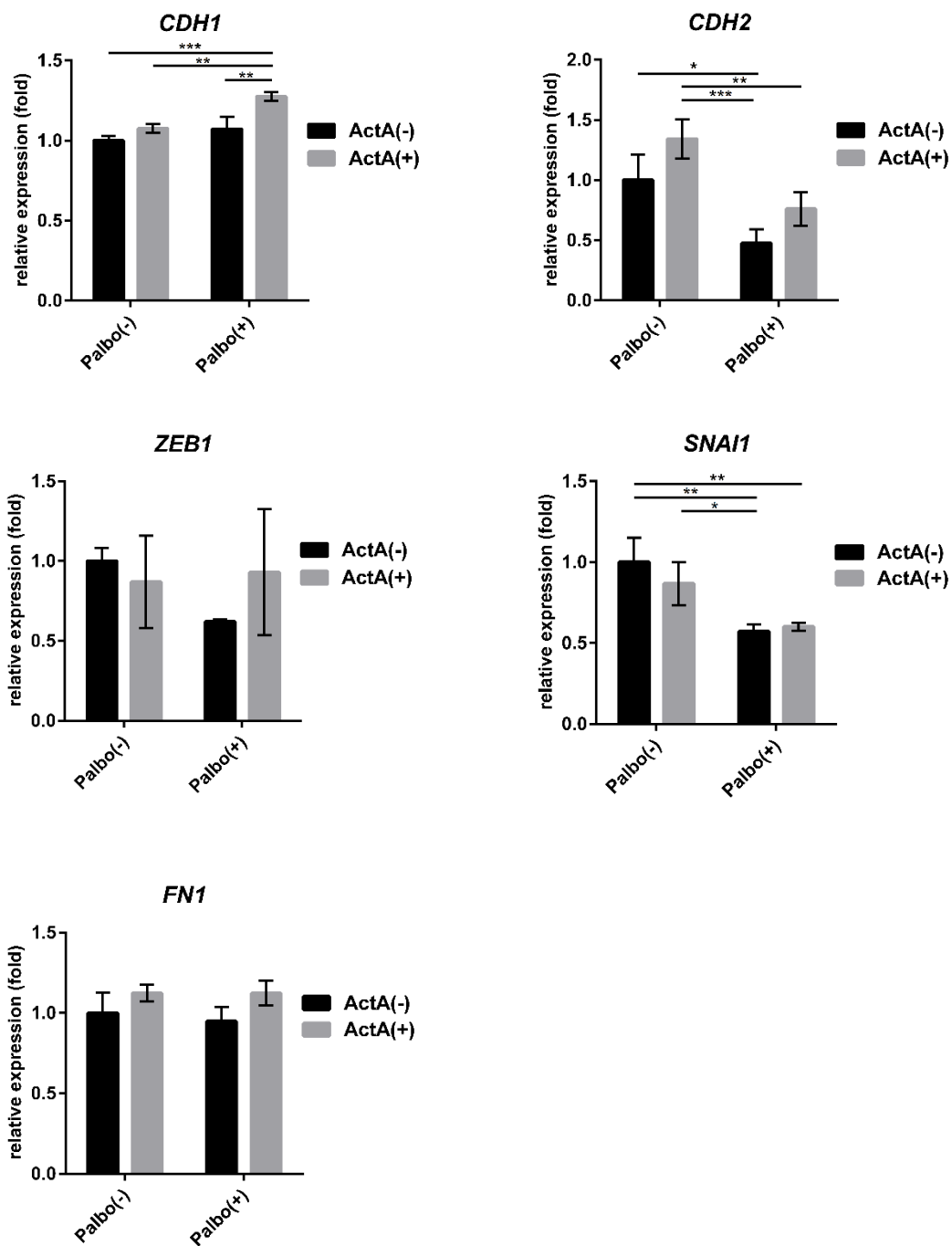


図 26. EMT 関連遺伝子の RNA 発現変化

T47D 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M, ActA 50 ng/ml 投与し、24 時間後に RT-PCR で RNA 発現変化を示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。



	control	Palbo	ActA	ActA/Palbo
<i>CDH1</i>	165.80	190.37	150.20	197.08
<i>CDH2</i>	0.06	0.06	0.14	0.11
<i>ZEB1</i>	0.02	0.00	0.03	0.01
<i>SNAI1</i>	1.45	1.08	1.66	0.88
<i>SNAI2</i>	0.00	0.04	0.02	0.04
<i>FNI</i>	4.90	4.25	6.51	5.62

表 4. RNA-Seq データ

RNA-Seq データにおける代表的な EMT 関連遺伝子の RNA 発現変化を示した。

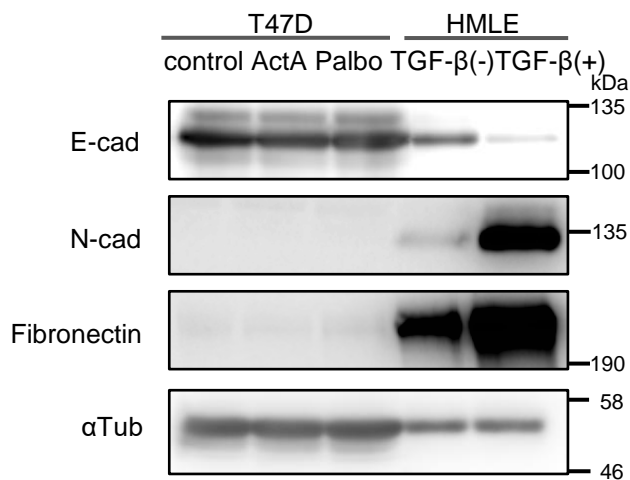


図 27. EMT 関連遺伝子蛋白に対する免疫ブロッティング

T47D 細胞に ActA 50 ng/ml、Palbociclib 1  $\mu$ M 24 時間刺激し、EMT 関連遺伝子蛋白の発現変化を示した。HMLE 細胞に TGF- $\beta$  1 ng/ml を 18 日間刺激したものを positive control として使用した。

### 3.5. Palbociclib 及び Activin は SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* を誘導し細胞増殖を抑制する

これまでの結果から Palbociclib は Rb-E2F 経路に加え、Activin-SMAD 経路を介して細胞増殖抑制作用を増強している可能性が示唆された。そこで、ChIP シーケンシングデータより Palbociclib を投与することで SMAD2 の結合が増強する領域を特定し、RNA シーケンシングによる遺伝子発現プロファイリングデータを組み合わせて解析した。まず、ChIP シーケンシングデータより Palbociclib 投与によって SMAD2 の結合強度が 2 倍以上に増加するものは 3345 遺伝子であった。mRNA 発現プロファイリングデータでは Palbociclib 投与によって mRNA 発現が 2 倍以上に増加するものは 171 遺伝子、ActA 刺激によって 2 倍以上に増加するものは 134 遺伝子であった (図 28)。すべての条件を満たすものは 12 遺伝子であり、代表的な遺伝子オントロジーを表 5 に示した。さらに、これらの 12 遺伝子を METABRIC (the Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) [30]による患者データで解析したところ、12 遺伝子の中から *CCNG2*、*CLIC3*、*H3F3A* の 3 遺伝子が ER 陽性乳癌の全生存期間 (OS) において予後良好な因子であった (図 29)。この中で細胞周期に関連する Activin-SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* (サイクリン G2) に着目した[31]。ChIP シーケンシングの結果から *CCNG2* の転写開始点付近に SMAD2 が結合し、Palbociclib によ

て結合が増強していることを示した (図 30)。また ChIP-qPCR でも Palbociclib によって fold enrichment の値が有意に上昇することを確認した (図 31)。RT-PCR では ActA、Palbociclib によって相加的に mRNA の発現レベルが上昇していることがわかった (図 32)。続いて、CCNG2 が細胞周期へ与える影響を評価するため、T47D 細胞に CCNG2 を強制発現させ、BrdU 取り込みアッセイを行った。CCNG2 発現株ではコントロールと比較し、BrdU の取り込みを有意に減少させ、CCNG2 は細胞周期の停滞を誘導すると考えられた (図 33)。これらの結果から Palbociclib が Activin-SMAD シグナルを介して CCNG2 を誘導し細胞増殖抑制に関与している可能性が示唆された。また、ホルモン受容体陽性乳癌において CCNG2 は臨床的にも重要な遺伝子であると考えられた。

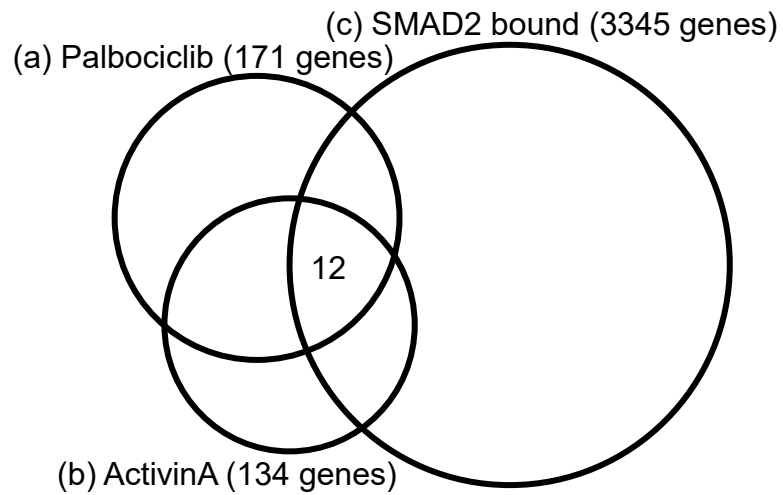


図 28. Palbociclib、Activin A による RNA 発現変化及び SMAD2 結合量に関するベン図

(a) RNA-Seq データより Palbociclib 投与によって RNA の発現が 2 倍以上に上昇する遺伝子 (171 遺伝子)、(b) Activin A 刺激によって RNA の発現が 2 倍以上の上昇する遺伝子 (134 遺伝子)、(c) ChIP-Seq データより Palbociclib 投与によって SMAD2 の結合量が 2 倍以上に増加する遺伝子 (3345 遺伝子) の関係をベン図で示した。

	gene name	Function
(a)	<i>CCNG2</i>	regulation of cell cycle
(b)	<i>CLIC3</i>	chloride transport, signal transduction
(c)	<i>FAM127B/RTL8A</i>	Unknown
(d)	<i>FAM25A</i>	Unknown
(e)	<i>GGT7</i>	glutathione biosynthetic process, negative regulation of response to oxidative stress
(f)	<i>H3F3A</i>	DNA replication-independent nucleosome assembly, positive regulation of cell growth, telomere organization
(g)	<i>KRTCAP2</i>	protein N-linked glycosylation via arginine
(h)	<i>NDUFS6</i>	mitochondrial electron transport, fatty acid metabolic process
(i)	<i>S100A11</i>	signal transduction, negative regulation of DNA replication
(j)	<i>SELM</i>	hormone metabolic process
(k)	<i>TMSB10</i>	regulation of cell migration, sequestering of actin monomers
(l)	<i>TRAPPC2L</i>	protein complex oligomerization

表 5. 遺伝子オントロジー

Figure 5A (a) (b) (c)すべてに共通する 12 遺伝子の代表的な遺伝子の機能を示した。

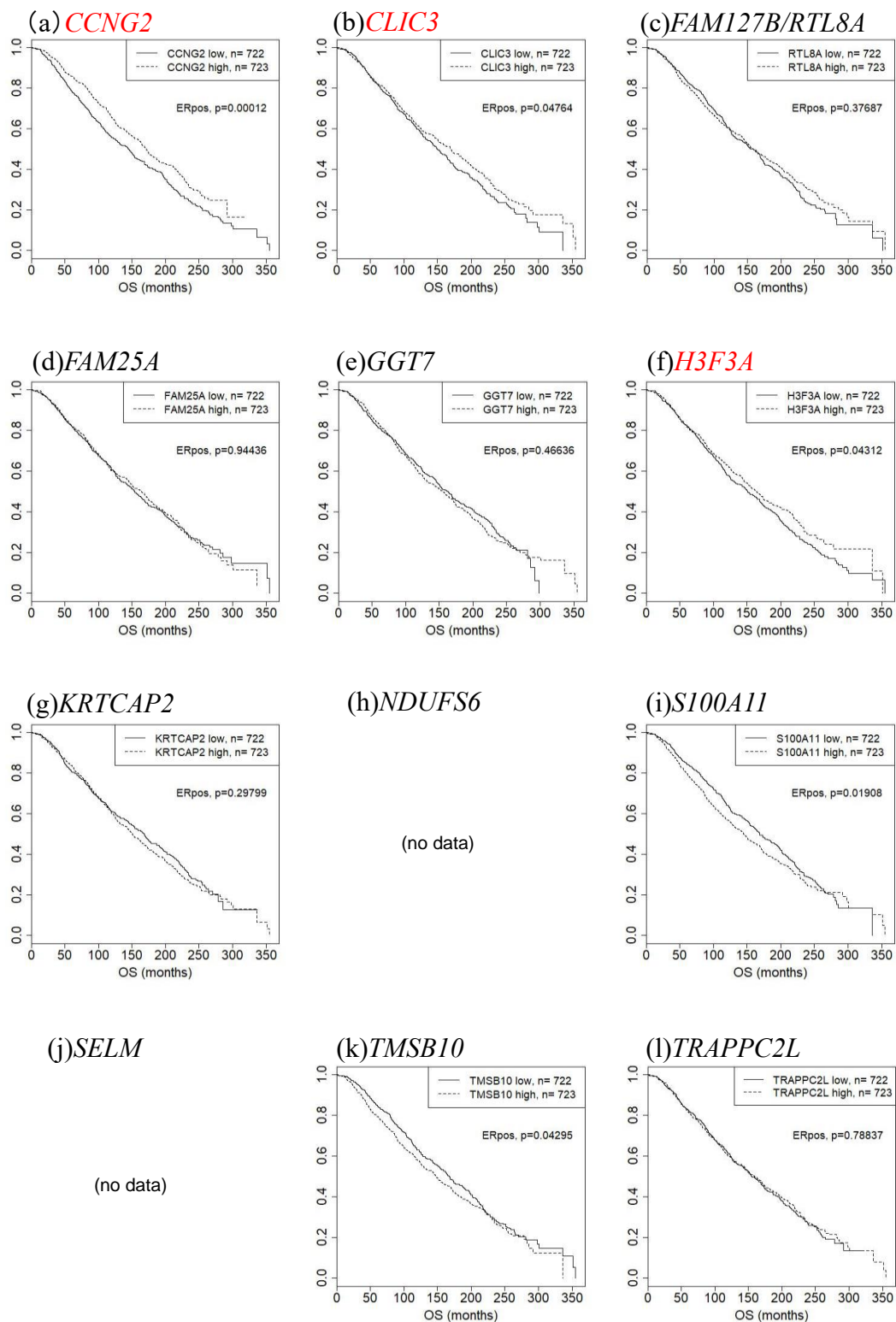


図 29. Kaplan-Meier 生存曲線

ER 陽性乳癌において、12 遺伝子の発現状況による全生存期間 (overall survival :OS) を Kaplan-Meier 曲線で示した。(Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium :METABRIC より)

### SMAD2 ChIP-seq, T47D+ActA

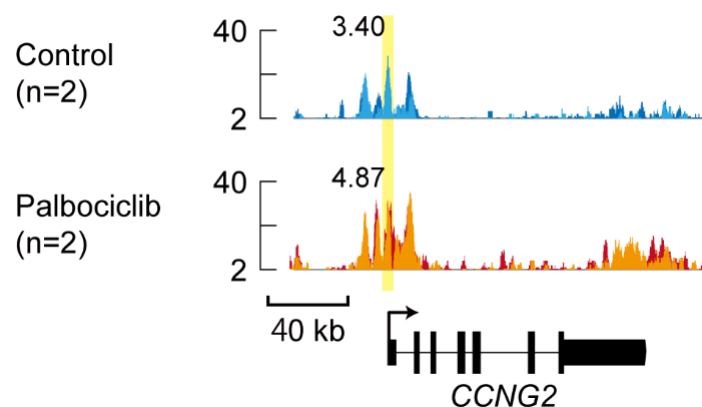


図 30. 遺伝子座

ChIP-Seq データより *CCNG2* における SMAD2 の結合量を示した。

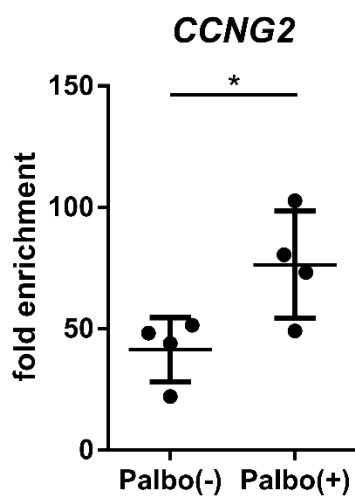


図 31. ChIP-qPCR による fold enrichment

独立した 4 回の実験より *CCNG2* における fold enrichment を示した。

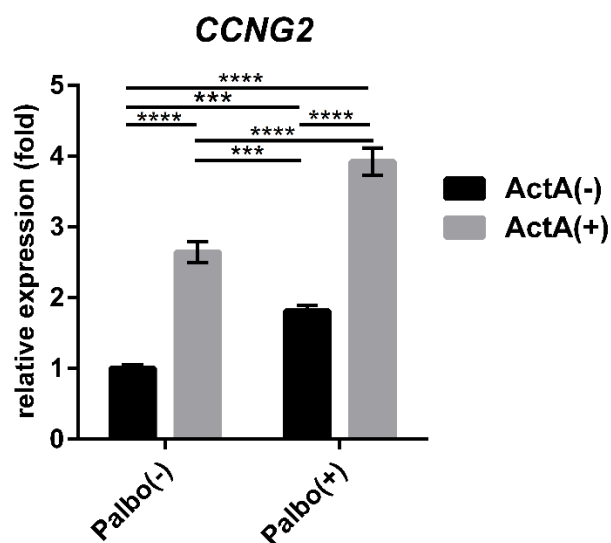


図 32. RNA の発現変化

T47D 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後に *CCNG2* の RNA 発現変化を RT-PCR で示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。

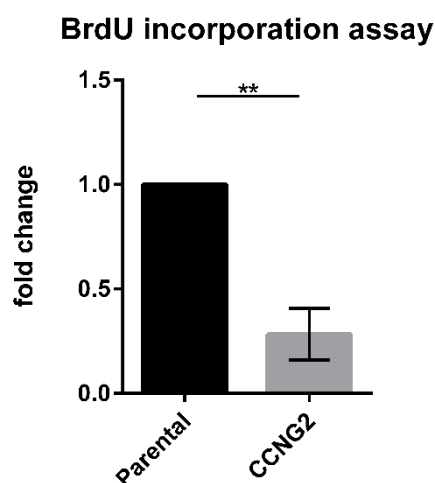


図 33. BrdU 細胞増殖アッセイ

*CCNG2* 発現株と親株で細胞増殖を比較した。Palbociclib 50 nM 及び ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後、BrdU を加え一晩静置した。抗 BrdU 抗体を 1.5 時間刺激後、BrdU アッセイを行った。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。



### 3.6. トリプルネガティブ乳癌 Hs578T 細胞株において Palbociclib は SMAD2 の ゲノム上への結合を増強する

TGF- $\beta$ /Activin の作用として増殖抑制作用がある一方で、悪性度の高いがんでは浸潤・転移促進作用をもつことが知られている。そこで Palbociclib が高悪性度の乳癌において腫瘍促進作用を示すのではないかと推測し、トリプルネガティブ乳癌 Hs578T 細胞における Palbociclib の Activin-SMAD シグナルへの影響を T47D 細胞と比較し検討した。これまでの報告から Hs578T 細胞は EMT 転写因子の発現が高く、E-cadherin の発現が低いと知られている[32]。また、Rb proficient 株であり、Palbociclib に対する感受性は IC<sub>50</sub> 値 524 nM という報告がある[25]。TGF- $\beta$ /Activin シグナル活性では T47D 細胞と同様に、ActA によって主に SMAD2 の C 末端がリン酸化されることがわかった (図 34)。Hs578T 細胞において BrdU 細胞増殖アッセイを行った。コントロールに対し ActA (50 ng/ml) 投与したものでは BrdU の取り込みが減少したが、Palbociclib (50 nM) 投与では明らかな差は認めなかった (図 35)。また、Palbociclib を 0 nM-5  $\mu$ M の濃度毎に投与すると、濃度依存的に Rb Ser780 及び SMAD2 Ser255 のリン酸化が阻害されたが、T47D 細胞と比較すると阻害効果が低かった (図 36)。続いて、T47D 細胞と同条件 (Palbociclib 非投与の細胞と Palbociclib 1  $\mu$ M 投与下で 24 時間培養した細胞において、ActA 50 ng/ml 1.5 時間刺激) の下、SMAD2 抗体を用いて ChIP を 2 回行い、

それぞれ 2 回分の共通領域を選択して解析した。Hs578T 細胞における SMAD2 の結合箇所に対し、Palbociclib 投与による結合量の増減を散布図で示した (図 37)。T47D 細胞と同様に、Palbociclib 投与下では非投与下と比較し結合量が増加しており、一般的に Palbociclib を投与することによって SMAD2 のゲノム上への結合を増強するものと考えられた。また、Activin-SMAD の代表的な標的遺伝子 *PMEPA1* において、Palbociclib を投与することによって SMAD2 の結合量の増加を認めたが (図 38)、Palbociclib による mRNA の発現上昇は認めなかった (図 39)。さらに、Activin-SMAD シグナル活性の評価として、Hs578T 細胞で 9×CAGALシフューラーゼレポータープラスミドを使用しレポーターアッセイを行った。Palbociclib 投与 4-6 時間後に Activin 刺激をしたものでは、Palbociclib 非投与下で Activin 刺激したものに対し Activin-SMAD シグナル活性が有意に上昇し、Hs578T 細胞でも Palbociclib を投与することによって Activin-SMAD シグナル活性が増強することが示された (図 40)。続いて、ChIP シーケンシングの結果から腫瘍促進作用について検討した。EMT に関連する代表的な遺伝子では、T47D 細胞と同様、Hs578T 細胞でも *ZEB1*、*SNAIL* で SMAD2 の結合を認め、Palbociclib 投与によって結合量の増加を認めた (図 41)。しかし、*ZEB1*、*SNAIL* の mRNA の発現量は、ActA 刺激でわずかに上昇するものの、Palbociclib の投与による明らかな上昇は認めなかった (図 42)。T47D 細胞で注目した ActA/SMAD2 の標的遺伝

子 *CCNG2* についても ActA 刺激によって上昇を認めたが、Palbociclib 投与では有意な変化を認めなかった (図 43)。しかし、図の結果からも示されるように Hs578T 細胞において Palbociclib 1  $\mu$ M が Rb Ser780 及び SMAD2 Ser255 のリン酸化を十分に阻害できていないことから、Palbociclib が至適濃度に達していない可能性がある。その原因としてトリプルネガティブ乳癌では AKT-PI3K-mTOR シグナル経路によって CyclinD-CDK4/6 が亢進している可能性、他のサイクリン依存性キナーゼ (CDK2/8/9) や Ras-MAPK、ERK によって SMAD2 のリンカー領域をリン酸化している可能性など、他のシグナル経路の関与の可能性も考えられる。

以上より、サブタイプの異なる 2 細胞株において Palbociclib によって SMAD シグナルが増強することが示されたが、腫瘍促進作用への影響は明らかではなかった。

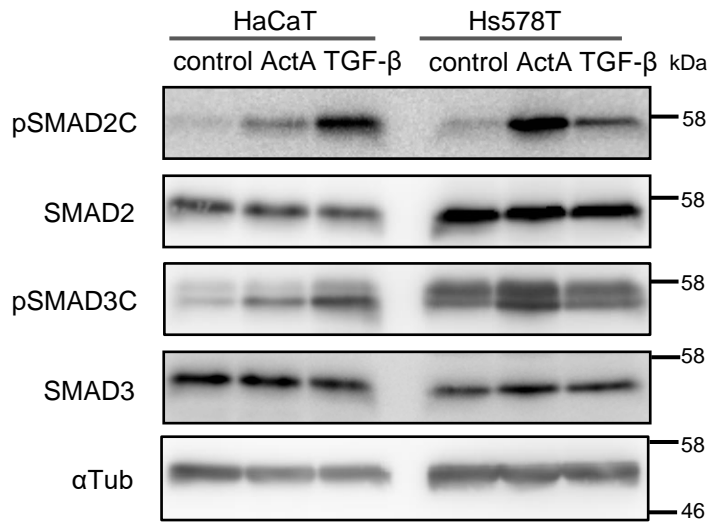


図 34. 免疫ブロット法によるリン酸化 SMAD2 及び SMAD3 の検出  
 トリプルネガティブ乳癌細胞 Hs578T 細胞及びヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞で TGF-β 1 ng/ml または ActA 50 ng/ml を 1.5 時間刺激した。

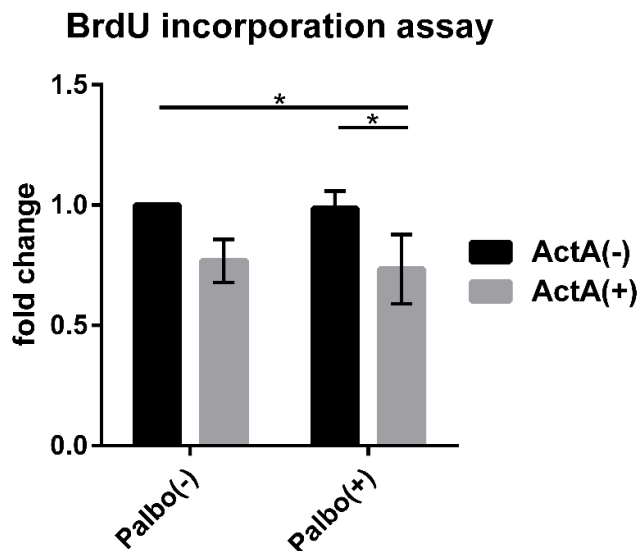


図 35. BrdU 細胞増殖アッセイ  
 Hs578T 細胞に Palbociclib 50 nM 及び ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後、BrdU を加え一晩静置した。抗 BrdU 抗体を投与し 1.5 時間後、ルミノメーターで測定した。独立した 3 回の実験の平均値を示した。

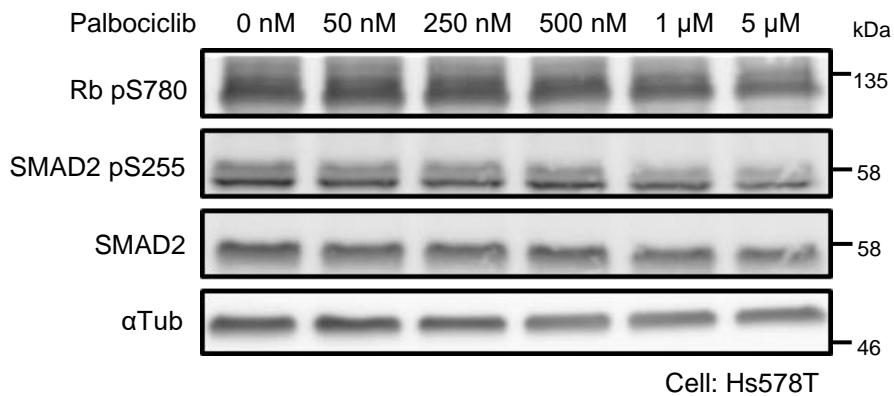


図 36. Palbociclib 濃度毎投与による免疫ブロッティング

Hs578T 細胞において Palbociclib を濃度毎 (0 nM-5 μM) に投与し 24 時間後に上記抗体にて検出した。

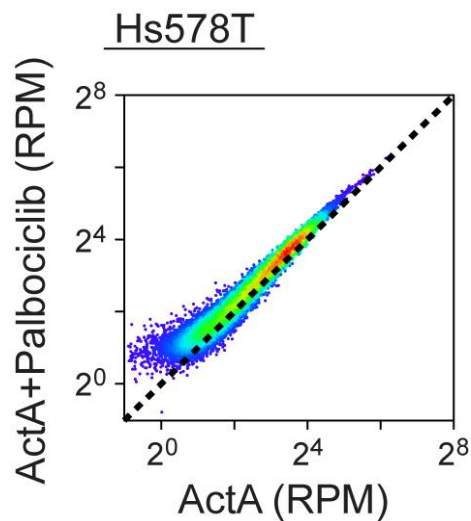


図 37. Hs578T 細胞における Palbociclib の SMAD2 ゲノム結合強度への影響

Palbociclib 1μM 24 時間投与と非投与の Hs578T 細胞に ActA 50 ng/ml 1.5 時間刺激し、SMAD2 結合領域におけるそれぞれの結合量を散布図で示した。

**SMAD2 ChIP-seq, Hs578T+ActA**

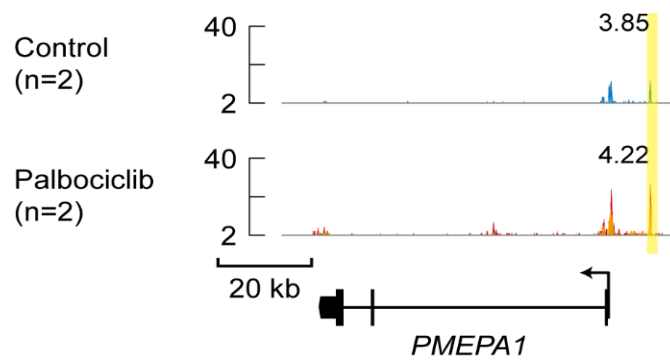


図 38. 遺伝子座

Hs578T 細胞で SMAD2 の標的遺伝子 *PMEPA1* における結合量を示した。

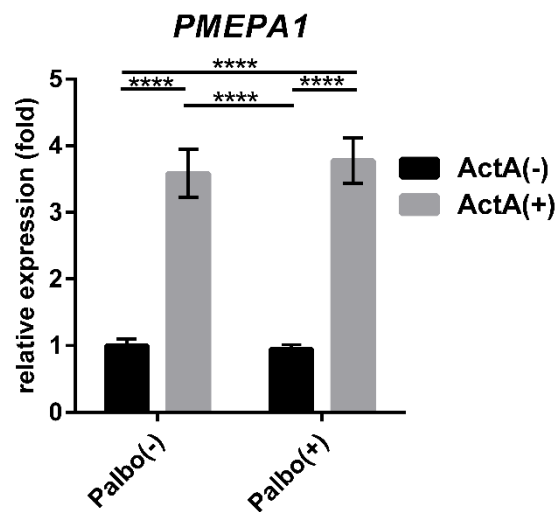


図 39. RNA 発現変化

Hs578T 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与し、*PMEPA1* の RNA 発現変化を RT-PCR で示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。

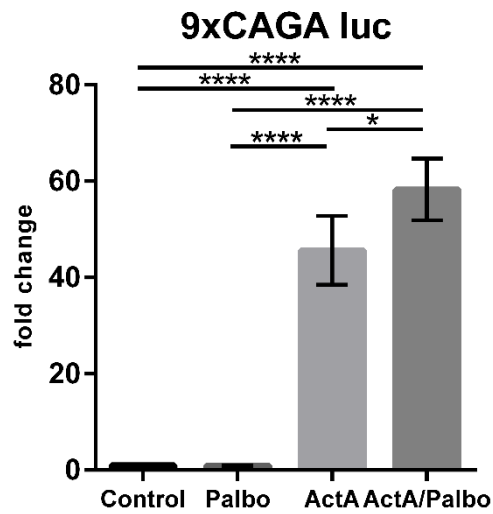


図 40. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Hs578T細胞においてPalbociclib 1  $\mu$ M投与した4-6時間後に、ActA 50 ng/ml 24時間刺激した。9×CAGAプラスミドを使用しActivin-SMADシグナル活性を評価した。上記は独立した4回の実験の平均値を示した。

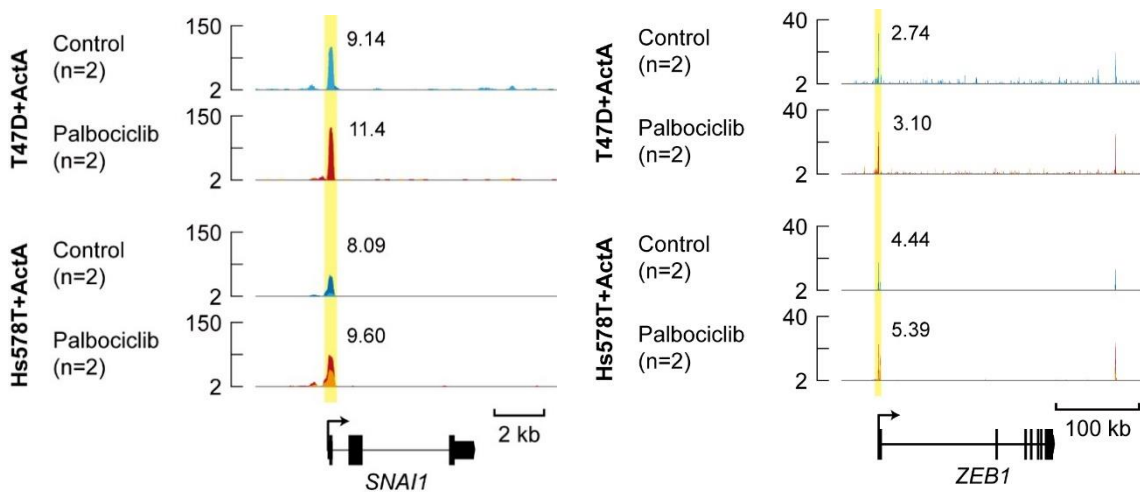


図 41. 遺伝子座

T47D細胞、Hs578T細胞でEMT関連遺伝子ZEB1, SNAI1におけるSMAD2の結合量を示した。

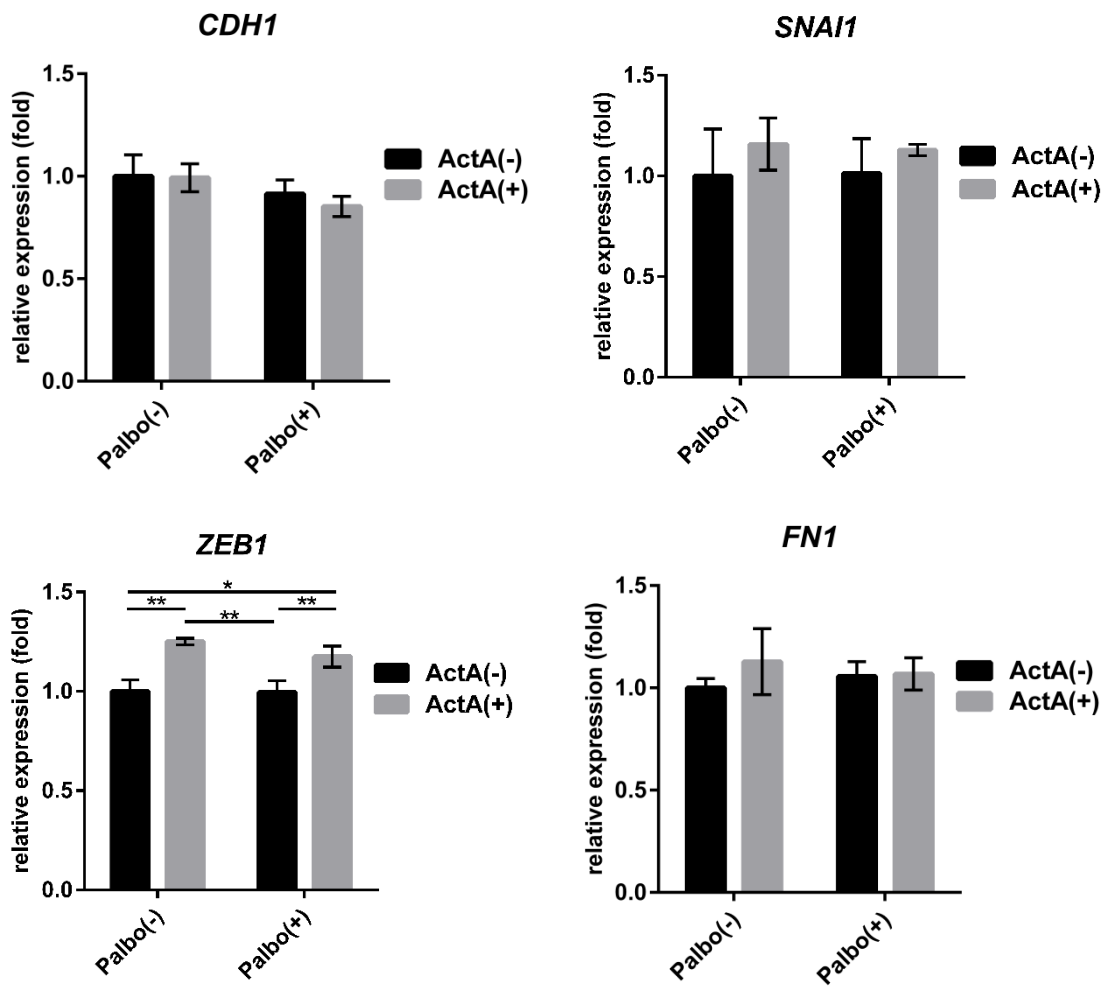


図 42. EMT 関連遺伝子の RNA 発現変化

Hs578T 細胞に Palbociclib 1 $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与し 24 時間後、RT-PCR で RNA の発現変化を示した。上記は独立した 3 回の実験の平均値を示した。



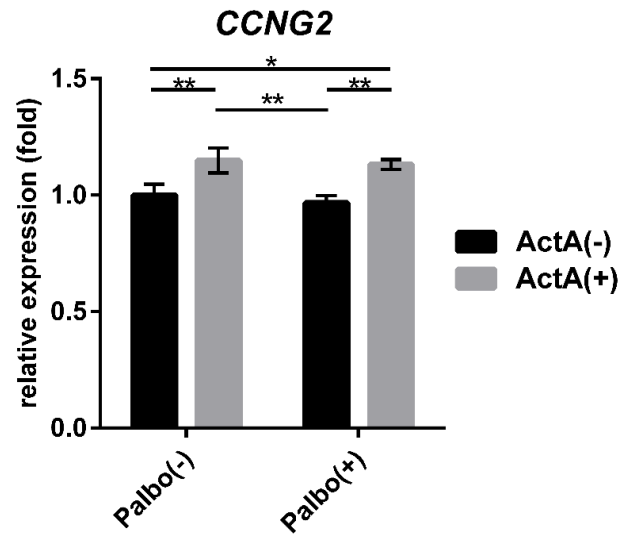


図 43. *CCNG2* の RNA 発現変化

Hs578T 細胞に Palbociclib 1  $\mu$ M、ActA 50 ng/ml 投与し、*CCNG2* の発現変化を RT-PCR で示した。独立した 3 回の実験の平均値を示した。

## 4. 考察

### 4.1. Palbociclib の適応症例への検討

Palbociclib は HR 陽性、HER2 陰性乳癌の新規治療薬として注目されており、本邦では 2017 年 12 月より HR 陽性、HER2 陰性の手術不能または再発乳癌を対象に内分泌療法と併用での使用が開始された。これまで HR 陽性、HER2 陰性の転移再発乳癌の治療選択として、Hortobagyi のアルゴリズムに基づき、閉経前ではタモキシフェンと LH-RH アゴニストの併用療法、閉経後ではアロマターゼ阻害薬による内分泌療法が推奨されてきた[33]。ただし生命を脅かす転移、例えば広範な肝転移・肺転移・癌性リンパ管症などを認めた場合は化学療法を選択すべきとされている。今回、転移再発乳癌の治療選択として内分泌療法単独に加え、内分泌療法と Palbociclib を併用するという選択肢が広がったことにより化学療法開始までの期間を延長する可能性が期待される。しかし、どのような転移再発の状況において Palbociclib を併用すべきかという指標は今後の検討課題である。

本研究では、Palbociclib の投与によって SMAD2 のゲノム上への結合を強め、Activin-SMAD シグナルを増強し、T47D 細胞で相加的に細胞増殖を抑制することを示した。一方で、Palbociclib 投与による EMT への影響は明らかではなかったが、悪性度の高い細胞株では腫瘍促進作用を増強する可能性も考えられた。

乳癌組織では非乳癌患者の正常乳腺組織と比較し Activin A (*INHBA*) の発現が高値であるとされている[18]。また、乳癌骨転移症例において血清アクチビン値が高値であるという報告がある[19]。Activin A 高値例や骨転移を認める再発乳癌に対して内分泌療法と Palbociclib を併用することで腫瘍抑制効果を増強する可能性、もしくは Activin-SMAD シグナルを増強することでさらに骨転移を増悪させる可能性のいずれも考えられ、この点に関しては今後の臨床データにより検証が必要である。

#### 4.2. EMT への関与

がんにおける Activin A の生理作用は、TGF- $\beta$  同様、細胞増殖を抑制する作用がある一方、悪性度の高いがんでは腫瘍促進作用を示すと考えられている。また、乳癌においては Activin A が運動能・浸潤能を亢進させ、EMT を促進するという報告がある[18]。このことから Palbociclib が Activin-SMAD シグナルを増強した場合、EMT を促進する可能性が考えられる。これまでの文献では膀胱癌細胞において CDK4/6 阻害薬が TGF- $\beta$  シグナルを亢進させ、EMT を誘導したという報告があり[34]、本研究では乳癌細胞における Palbociclib の EMT への関与を検討した。RNA シーケンシングの結果（表 4）で示したように、T47D 細胞では間葉系マーカーで知られる *CDH2*、*ZEB1*、*SNAI1*、*SNAI2*、*FN* の発現は極めて低く、ま

た、Palbociclib 投与による EMT 関連遺伝子の RNA 発現、蛋白発現に有意な変化はみられなかった。同様に、トリプルネガティブ乳癌細胞株 Hs578T でも検討したが、RT-PCR において EMT 関連遺伝子の RNA 発現に有意な変化はみられなかった。しかし、T47D 細胞、Hs578T 細胞でルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて TGF- $\beta$ /Activin シグナルが増強しており、またいずれの細胞株でも ChIP シーケンシングのデータより Palbociclib 投与によって SMAD2 の DNA への結合を増強した。EMT 関連遺伝子では、*SNAIL*、*ZEB1* で SMAD2 の結合量が増加しており、EMT を促進させる可能性は否定できない。特に、Hs578T 細胞では、  
図 36 の結果から示されるように Palbociclib 1 $\mu$ M が Rb Ser780 及び SMAD2 Ser255 のリン酸化を十分に阻害できていないことから、Palbociclib に対し感受性が低いことがわかる。その原因としてトリプルネガティブ乳癌では AKT-PI3K-mTOR シグナル経路によって Cyclin D-CDK4/6 が亢進している可能性、Cyclin E-CDK2 など他のサイクリン依存性キナーゼによって細胞周期が促進されている可能性など他のシグナル経路が関与している可能性が示唆される。また、本研究では多くの実験で Palbociclib 投与から 24-48 時間で評価を行っているが、Palbociclib を長期間投与した場合に EMT にどのような影響を与えるか検討の余地がある。

#### 4.3. ALK4/5/7 阻害薬との併用について

本研究において ALK4/5/7 阻害薬として使用した SB431542 は、I 型受容体 (ALK4/5/7) のキナーゼに結合して TGF- $\beta$  及び Activin シグナルのみ抑制する特異性の高い化合物である。図 25 で示した通り、Activin の標的遺伝子である *PMEPA1*、*CDKN2B* の RNA の発現量が Activin A、Palbociclib によって相加的に増加したが、SB431542 を投与することで発現を抑制し、SB431542 が Activin シグナルを抑制した。この結果から、Activin による腫瘍促進作用が顕在化しているがんの場合には、Palbociclib と併用して ALK4/5/7 阻害薬を投与することで、Activin シグナルの腫瘍促進作用を抑制しつつ、腫瘍細胞の増殖を抑制する可能性が考えられ、臨床への応用に向けて今後検討すべき点と考えられる。

#### 4.4. *CCNG2* の意義

*CCNG2* はサイクリンファミリーの一つであるが、細胞周期を促進させる典型的なサイクリン A, B, D, E と異なり、細胞周期を停滞させ、腫瘍抑制の作用を示すことが知られている。これまでの文献では、卵巣癌において *CCNG2* が細胞増殖、遊走能、浸潤能を抑制したという報告や[35]、乳癌細胞では抗 HER2 薬、PI3K 阻害薬、mTOR 阻害薬投与によって *CCNG2* の発現が上昇したという報告もある[36]。細胞増殖に関連する様々なシグナル経路を抑制することで発現が上昇する

が、CDK4/6 阻害薬である Palbociclib を投与することでも Activin-SMAD シグナルを介して *CCNG2* を上昇させている可能性がある。また、Palbociclib の有効性に関して、Rb 欠損や *CCNE1* の増幅例で抵抗性を示す一方、*CCND1* の増幅、*CDKN2A* の低発現で PFS の延長を認めたと報告されているが、Palbociclib のバイオマーカーは特定されていない[37]。本研究では *CCNG2* が Palbociclib の有効性を予測するバイオマーカーとなりうるかという検討には至らなかったが、今後の更なる研究により新たなバイオマーカーとなる可能性が期待できる。

METABRIC からも ER 陽性乳癌において *CCNG2* 高発現は有意に全生存期間が延長しており、*CCNG2* は生命予後にも関係する重要な遺伝子と言える。

## 5. 結論

5.1. ホルモン受容体陽性乳癌において Palbociclib は Activin-SMAD シグナルの細胞増殖抑制作用を増強することを示した。

5.2. Palbociclib は SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化を阻害した。

5.3. 2 つの異なるサブタイプの乳癌細胞株において、Palbociclib は SMAD2 の DNA への結合を増強させた。

5.4. Palbociclib 及び Activin の増殖抑制作用において SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

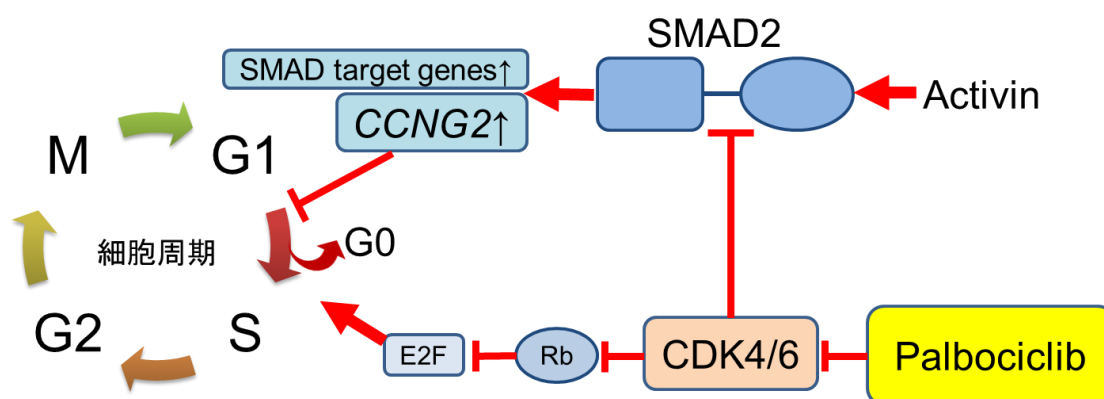


図 44. 推定される Palbociclib の Activin-SMAD シグナルへの影響

Palbociclib が SMAD2 のリンカー領域 S255 をリン酸化し Activin-SMAD シグナルを増強することで細胞抑制作用を増強させる。

## Limitations

・本研究で Palbociclib が Activin-SMAD シグナルの増殖抑制作用を増強することがわかったが、その機序が SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化阻害によるものとは断定できない。今後、変異 SMAD2 (S255A、S255D) を用いて Palbociclib の増殖抑制作用や DNA 結合能への影響を検討することでその因果関係が明らかになる可能性がある。

・ChIP シーケンシング、RNA シーケンシングの結果から Palbociclib が Activin-SMAD シグナルの増殖抑制作用を増強するうえで SMAD2 の標的遺伝子として CCNG2 が関与しているものと推測した。CCNG2 の Activin-SMAD 下流因子としての位置づけについては内因性 CCNG2 の loss of function 等による検討が今後必要と考える。



## 6. 引用文献

- [1] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406: 747-52, 2000.
- [2] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 22: 1736-47, 2011.
- [3] Klein ME, Kovatcheva M, Davis LE, Tap WD, Koff A. CDK4/6 inhibitors: the mechanism of action may not be as simple as once thought. *Cancer Cell*. 34: 9-20, 2018.
- [4] Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 375: 1925-36, 2016.
- [5] Turner NC, Ro J, Andre F, et al. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 373: 209-19, 2015.
- [6] de Groot AF, Kuijpers CJ, Kroep JR, et al. CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review. *Cancer Treat Rev*. 60: 130-38, 2017.
- [7] Murphy GC, Dickler MN. The Role of CDK4/6 inhibition in Breast Cancer. *Oncologist*. 20: 483-90, 2015.
- [8] Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*. 13: 328-41, 2013.
- [9] Namwanje M, Brown CW. Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8: a021881, 2016.
- [10] Xu P, Lin X, Feng XH. Posttranslational regulation of Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8: a022087, 2016.
- [11] Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*. 277: 41361-8, 2002.
- [12] Baughn LB, Di Liberto M, Niesvizky R, et al. CDK2 phosphorylation of Smad2 disrupts TGF- $\beta$  transcriptional regulation in resistant primary bone marrow myeloma cells. *J Immunol*. 182: 1810-7, 2009.

- [13] Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, et al. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*. 139: 757-69, 2009.
- [14] Aragon E, Goerner N, Zaromitidou AL, et al. A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev*. 25: 1275-88, 2011.
- [15] Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13: 616-30, 2012.
- [16] Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-β and the TGF-β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8: a021873, 2016.
- [17] Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. Intracellular and extracellular TGF-β signaling in cancer: some recent topics. *Front Med*. 12: 387-411, 2018.
- [18] Bashir M, Damineni S, Mukherjee G, Kondaiah P. Activin-A signaling promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastatic growth of breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 1: 15007, 2015.
- [19] Leto G, Incorvaia L, Badalamenti G, et al. Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 23: 117-22, 2006.
- [20] Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-β signal in later stages of human colorectal cancer. *Cancer Res*. 69: 5321-30, 2009.
- [21] Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 430: 226-31, 2004.
- [22] Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, et al. Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor β signaling. *Mol Cell Biol*. 29: 172-86, 2009.
- [23] Goldman LA, Cutrone EC, Kotenko SV, Krause CD, Langer JA. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and

expression. *Biotechniques*. 21: 1013-5, 1996.

[24] Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 132: 487-98, 2008.

[25] Finn RS, Dering J, Conklin D, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res*. 11: R77, 2009.

[26] Badve S, Turbin D, Thorat MA, et al. FOXA1 expression in breast cancer--correlation with luminal subtype A and survival. *Clin Cancer Res*. 13: 4415-21, 2007.

[27] Jozwik KM, Carroll JS. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nat Rev Cancer*. 12: 381-5, 2012.

[28] Lara MF, García-Escudero R, Ruiz S, et al. Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis. *Mol Carcinog*. 47: 209-21, 2008.

[29] Padua D, Zhang XH, Wang Q, et al. TGF $\beta$  primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 133: 66-77, 2008.

[30] Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 486: 346-52, 2012.

[31] Zimmermann M, Arachchige-Don AP, Donaldson MS, Patriarchi T, Horne MC. Cyclin G2 promotes cell cycle arrest in breast cancer cells responding to fulvestrant and metformin and correlates with patient survival. *Cell Cycle*. 15: 3278-95, 2016.

[32] Katsura A, Tamura Y, Hokari S, et al. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Mol Oncol*. 11: 1241-62, 2017.

[33] Gabriel N, Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 339: 974-84, 1998.

[34] Liu F, Korc M. Cdk4/6 Inhibition Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 11: 2138-48, 2012.

[35] Bernaudo S, Salem M, Qi X, et al. Cyclin G2 inhibits

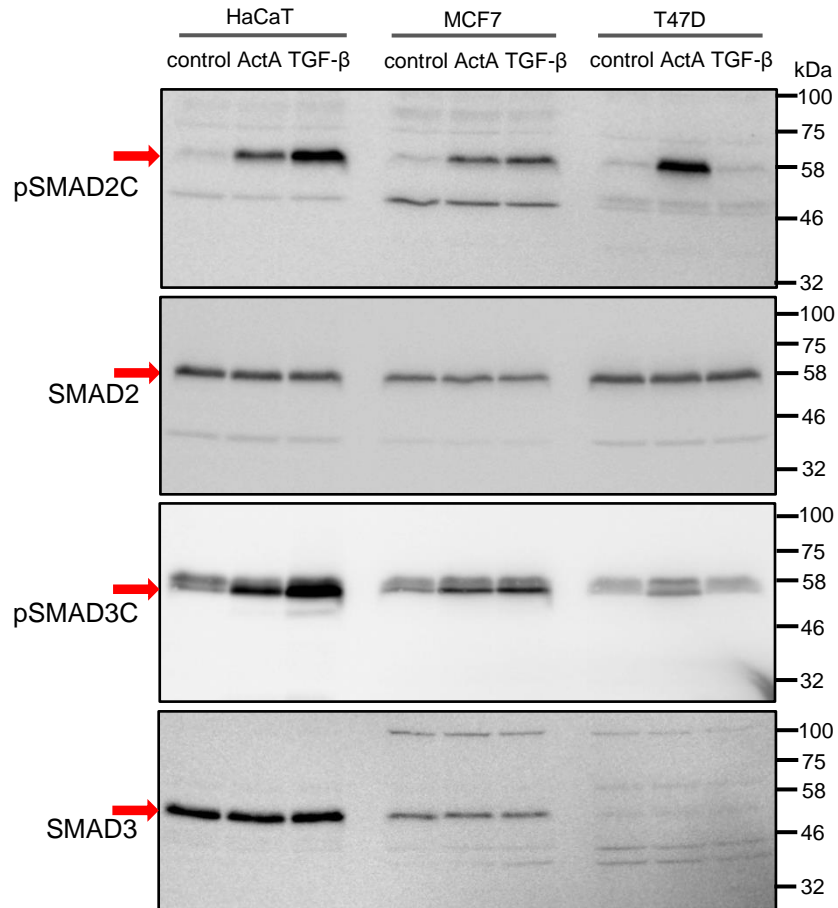
epithelial-to-mesenchymal transition by disrupting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Oncogene*. 35: 4816-27, 2016.

[36] Le XF, Arachchige-Don AS, Mao W, Horne MC, Bast RC, Jr. Roles of human epidermal growth factor receptor 2, c-jun NH2-terminal kinase, phosphoinositide 3-kinase, and p70 S6 kinase pathways in regulation of cyclin G2 expression in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 6: 2843-57, 2007.

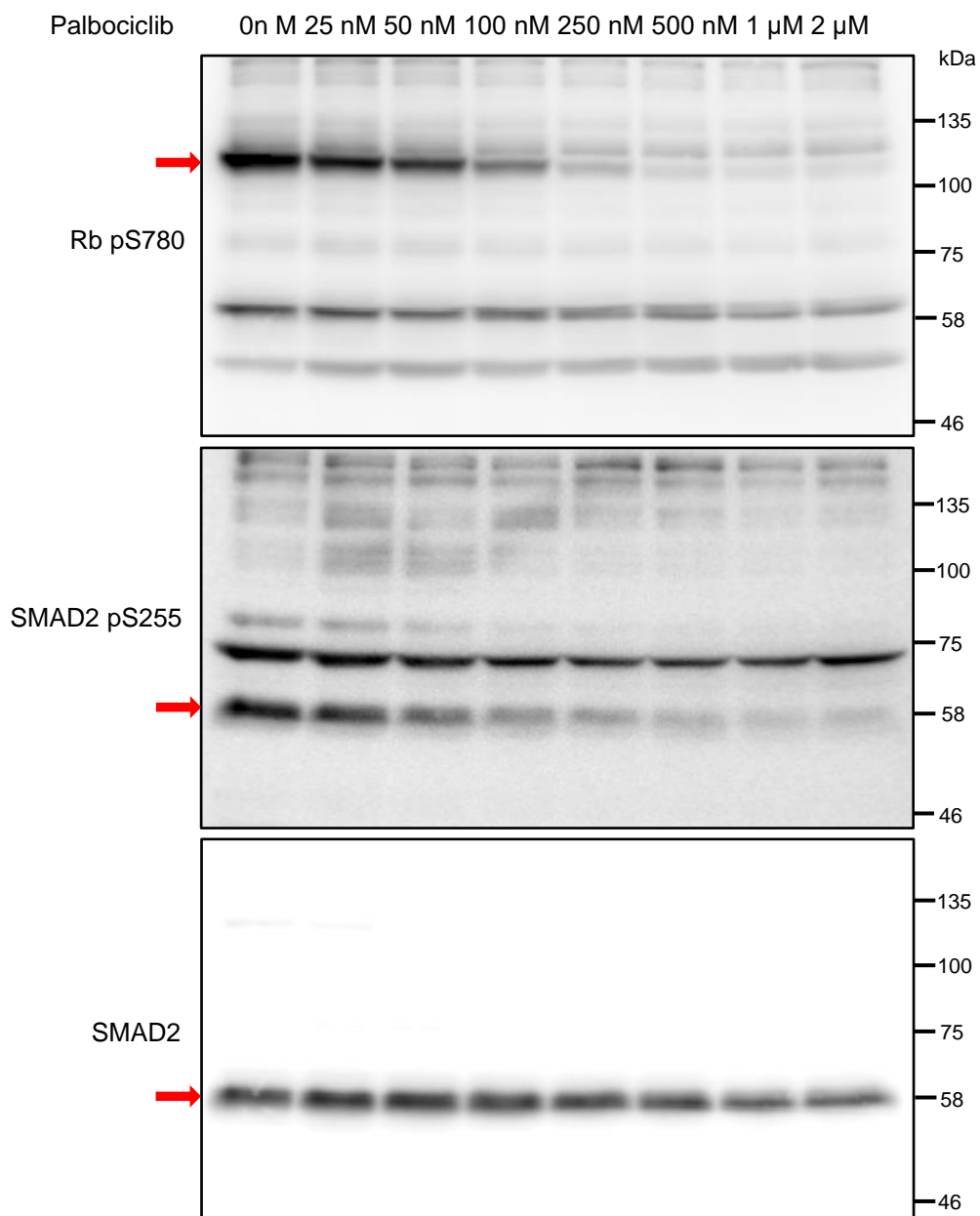
[37] Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 16: 25-35, 2015.

7. 補遺 (図 5、図 13 について免疫ブロッティングの全体像を以下に示す。)

図 5



☒ 13



## 謝辞

本研究の指導教官である東京大学胃食道・乳腺内分泌外科教授 瀬戸泰之先生、東京大学乳腺内分泌外科科長 田辺真彦先生、ならびに前任の多田敬一郎先生より多くのご指導・ご鞭撻を賜り、感謝申し上げます。

そして、本研究は主に東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻分子病理学分野で遂行されたものであり、快く研究の機会を与えて下さった分子病理学分野教授 宮園浩平先生をはじめ、准教授 鯉沼代造先生ならびに研究室の皆様より多大なご指導・ご支援を賜りましたこと、心より感謝致します。

また、今回の研究計画の立案・遂行から論文に至るまで分子病理学分野助教 森川真大先生より多大なご指導を頂きました。深く御礼を申し上げます。