

論文の内容の要旨

論文題目 トリプルネガティブ乳がんにおける TGF- β シグナル抑制を介した polyI:C の抗腫瘍効果のメカニズム

氏名 田村 佑介

背景と目的

トリプルネガティブ乳がんは、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の発現していない、乳がんの臨床上のサブタイプの 1 つであり、特に予後不良であると報告されている。トリプルネガティブ乳がんに対する薬物治療では、細胞障害性の抗がん剤以外の選択肢が限られており、トリプルネガティブ乳がんに対する新たな治療法の開発やそのメカニズムの提案は切迫した課題であると考えられる。そのような背景の中、現在提案されている新規治療法の 1 つに、細胞内に double-stranded RNA (dsRNA) を導入し、retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) を介したシグナルをがん細胞内で活性化する手法がある。特に、トリプルネガティブ乳がんに対しては RLRs に含まれる MDA5 や RIG-I の遺伝子の変異や欠失の頻度が少ないことから、治療に対して有効である可能性が報告されており、RLRs を介したシグナルの活性化により、がん細胞には細胞死がもたらされることが期待されている。一方、TGF- β シグナルはがんに対して腫瘍抑制的な面と腫瘍促進的な面の 2 面性があることが報告されているものの、トリプルネガティブ乳がんにおいては、腫瘍促進的なシグナルの報告が多く、腫瘍内在的な TGF- β シグナルを阻害することがトリプルネガティブ乳がんの治療戦略上重要であると考えられている。

他の例にもれず、RLR シグナルは他のシグナルに対しても影響を与えるが、がんにおける

RLR シグナルの活性化が示す腫瘍抑制作用に対して、他のシグナルへの影響がどの程度寄与しているのかは明らかではない。そこでここでは、過去に報告された、RLR シグナルと TGF- β シグナルの相互作用に着目した。RLR アゴニストにより下流でリン酸化される interferon regulatory factor 3 (IRF3) が、TGF- β シグナルの下流因子である Smad3 に結合し、Smad3 の TGF- β 受容体への集積を妨げ、TGF- β シグナルを減弱させることがあると報告されていた。RLR シグナルを標的とした治療を考える上で、がん細胞で同様に TGF- β シグナルの抑制が認められるのか、また、認められた場合、どのような治療上のメリットがあるかを考察することは重要なことであると考えられる。そこで、本研究では、RLR アゴニストとしてトランスフェクションによる腫瘍内投与で治験が進んでいる polyI:C を使用して、polyI:C が示す腫瘍抑制作用に対して TGF- β シグナルがどのような役割を果たすのかを明らかにすることを目的とした。

方法と結果

まず初めに、トリプルネガティブ乳がん細胞において、polyI:C のトランスフェクションが TGF- β シグナルを抑制するかどうか検討したところ、Hs578T 細胞において、polyI:C のトランスフェクションにより TGF- β シグナルの下流因子である Smad3 のリン酸化・活性化が減弱し、TGF- β によって誘導される標的遺伝子である *ZEB1* 等の発現誘導の減弱が確認された。更に MDA5、RIG-I の遺伝子不活化によって、観察されていた Smad3 のリン酸化の抑制は解除された。以上の結果から、polyI:C は MDA5、RIG-I を介して TGF- β シグナルを抑制する可能性が示唆された。

次に、polyI:C による Smad3 の活性化抑制により TGF- β シグナルを抑制することが、細胞の生死に対して与える影響を確認したところ、恒常活性型 Smad3 (caSmad3) の Hs578T 細胞における過剰発現により、polyI:C トランスフェクションによって上昇する AnnexinV 陽性 PI 陽性の細胞の割合が減少した。このことから、polyI:C による TGF- β シグナルの抑制により、

TGF- β シグナルの持つ生存促進作用を抑制している可能性が示唆された。

次に、polyI:C により起こる細胞死をより詳細に解析したところ、polyI:C による細胞死は、汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK によってほぼ完全に抑制され、更に、polyI:C によって、細胞内容物の放出や、細胞の泡沫化も確認された。また、polyI:C のトランスフェクションに伴って、gasdermin E (GSDME) の N 末端の切断断片が確認された。以上のことから、polyI:C のトランスフェクションによってパイロトーシスが起きている可能性が示唆された。

さらに、GSDME はカスパーゼ 3 によって切断を受けることが報告されていることから、カスパーゼ 3 特異的阻害剤である Z-DEVD-FMK を用いたところ、Z-VAD-FMK の時と同様、polyI:C によって細胞死を起こした細胞は大きく減少した。そこで、caSmad3 の発現の有無でのカスパーゼ 3 の活性を評価したところ、caSmad3 の過剰発現によって polyI:C によって上昇するカスパーゼ 3/7 の活性が抑制された。また、polyI:C による細胞内容物の放出や GSDME の切断も caSmad3 の過剰発現により減弱し、これらの結果から、polyI:C はトリプルネガティブ乳がんにおいて、TGF- β シグナルを抑制することで、TGF- β シグナルの持つカスパーゼ 3 の活性化抑制作用を減弱させることで、GSDME の切断を伴うパイロトーシスを起こしやすくしていることが示唆された。また、Hs578T 細胞を用いて観察された現象は別のトリプルネガティブ乳がん細胞株である BT-549 細胞でも確認され、更に、caSmad3 の過剰発現が polyI:C による細胞死を抑制するメカニズムの 1 つとして BH3-only protein の 1 つである Noxa が同定された。

最後に、トリプルネガティブ乳がん細胞として広く使用されている 4T1 細胞を使用し、マウスモデルにおける polyI:C による治療に対する TGF- β シグナルの関与を検討したところ、まず *in vitro* にて、polyI:C トランスフェクションによる TGF- β シグナルの抑制と、caSmad3 の過剰発現による、細胞死の部分的な解除が確認された。そこで治験薬と同様に、4T1 細胞を移植した Balb/c マウスの腫瘍内に polyI:C をトランスフェクションすることによ

り、治療実験を試みたところ、polyI:C をトランスフェクションした群において、腫瘍重量が優位に減少し、腫瘍内の pSmad3 のシグナルが polyI:C 治療群で減弱していた。以上のことから、*in vivo* においても、polyI:C トランスフェクションによる腫瘍抑制作用に TGF- β シグナルの抑制が一部関与している可能性が示唆された。

結論・考察

本研究を通じて、トリプルネガティブ乳がんでは、TGF- β シグナルは polyI:C のトランスフェクションによって抑制され、それは MDA5 と RIG-I を介することが示唆された。また、polyI:C は TGF- β シグナルを抑制することにより、TGF- β シグナルの持つカスパーゼ 3 の活性の抑制を介した生存促進作用を減弱させることが示唆された。更に、polyI:C のトランスフェクションは GSDME の切断を伴うパイロトーシスを引き起こし、これは TGF- β シグナルを抑制することにより、増強されることも考察された。以上の結果から、トリプルネガティブ乳がんにおける、TGF- β シグナルの抑制を介した polyI:C の治療有効性が示唆されたと考えており、本研究がトリプルネガティブ乳がんの患者に対する新たな治療の選択肢を提示することにつながることを強く期待する。