

博士(医学) 山出 美穂子

## 論文題目

Trastuzumab has opposing effects on SN-38-induced double-strand breaks and cytotoxicity in HER2-positive gastric cancer cells depending on administration sequence

(トラスツズマブは HER2 陽性胃癌細胞における SN-38 誘導二重鎖切断と細胞傷害において、投与順序に依存して相反する影響を与える)

## 論文の内容の要旨

上皮増殖因子 HER2 (ERBB2/neu) は胃癌の約 20% に発現している。HER2 阻害薬トラスツズマブ (Tmab) は、HER2 高発現胃癌において併用抗腫瘍薬の効果を増強することが示され、2011 年本邦でも臨床使用が開始された。一方、上皮増殖因子 EGFR シグナルの阻害は DNA 修復を減弱すると報告されており、Tmab が抗腫瘍薬誘導 DNA 傷害の修復を抑制することで、併用薬の効果を増強している可能性が考えられる。

HER2 シグナルは DNA の複製、転写、細胞増殖を促進し、Tmab はこれを阻害する。一方、多くの細胞傷害性抗腫瘍薬は、複製・転写の間に DNA 傷害を引き起こす。トポイソメラーゼ-1 (Top-1) 阻害薬 SN-38 は複製依存性に DNA 二重鎖切断 (DSB) を誘導する。ゆえに Tmab は SN-38 による Top-1 - DNA 複合体と複製フォークの衝突する DNA 傷害発生の機会を減ずると考えられる。

HER2 発現の異なるヒト胃癌細胞において、Top-1 阻害薬 SN-38 が複製依存性に誘導する DSB と細胞傷害への影響に対する Tmab の先行投与・後投与の影響を調べた。

[ 材料ならびに方法 ]

Top-1 阻害薬イリノテカンの活性代謝物 SN-38 を使用した。細胞傷害作用の比較に MTT assay を行い、DSB の早期指標の  $\gamma$ H2AX はウェスタンブロット、免疫染色で評価した。細胞周期の評価にフローサイトメトリーを行った。また、AKT、MAPKK の各阻害薬を用いて同経路の関与を調べた。

[ 結果 ]

ウェスタンブロットによる検討で、SN-38 投与時のリン酸化 AKT、MAPK の発現は Tmab 併用により減弱した。MTT assay において、SN-38 による細胞傷害は、HER2 高発現の N87 において Tmab の先行投与で用量依存性に減弱し、逆に後投与では増強した。ウェスタンブロットにおいて、N87 では Tmab 後投与で DSB の指標  $\gamma$ H2AX が増強し、先行投与では減弱した。免疫染色においても、SN-38 単独投与時と比較して  $\gamma$ H2AX は、Tmab の先行投与で減弱し、後投与で増加した。フローサイトメトリーを用い細胞を G1 同期後に比較したところ、Tmab は細胞周期の進行を N87 で遅延させた。以上の差異は HER2 陰性細胞 MKN74 では見られなかった。

次に HER2 の二大下流シグナル AKT と MAPKK の阻害薬を用い検討した。MTT assay に

において SN-38 の細胞傷害は両阻害薬の併用で増強した。またウェスタンブロットで $\gamma$ H2AX 誘導は阻害薬単独では増強せず、両阻害薬併用により増強した。

#### [ 考察 ]

Tmab は HER2 陽性細胞において、SN-38 の細胞傷害作用を SN-38 に先行投与すると減弱させ、後投与では増強させた。この現象は HER2 陰性細胞では見られなかった。Tmab の投与順序が、HER2 陽性細胞における SN-38 の細胞傷害に重要な役割を持つことを示唆している。

今回 Tmab 先行投与時に見られた HER2 陽性細胞における SN-38 作用の減弱は、Tmab により細胞周期の進行が遅延したことに関係している可能性がある。すなわち、SN-38 の DNA 傷害は複製依存性であり、Tmab の前処置にて複製シグナルが減弱していた場合、その DNA 傷害発生の機会は減少すると考えられる。

一方、Tmab の後投与における SN-38 効果の増強であるが、通常、DSB の誘導の際にチェックポイント機構により細胞周期が停止するため、Tmab の細胞周期進行遅延は影響しないと考えられる。そして、EGFR シグナル阻害が DNA 修復を阻害するという従来知見より、HER2 下流シグナルの抑制が DSB 修復を抑制し、SN-38 の作用を増強した可能性が考えられる。

また AKT と MAPKK の阻害薬は、単独では DNA 傷害に影響せず、併用投与で DSB を増強していた。これは AKT、MAPK 経路の双方が DSB 修復に関与し、それぞれ相補的に DNA 傷害より防御する働きをもつためと推測される。DSB 修復に両経路が必要であるならば、Tmab は両経路を阻害して SN-38 誘導 DSB の修復を妨害したと考えられる。

#### [ 結論 ]

本研究は、HER2 陽性胃癌細胞において、Tmab の投与順序が併用する SN-38 の細胞傷害と DSB 誘導に影響することを示した。Tmab 先行投与は細胞周期の進行を遅延させ、Top-1 阻害薬による DSB 誘導を減弱した。一方、Tmab 後投与は SN-38 の殺細胞効果を増強した。本結果は、HER2 陽性癌患者の治療において複製依存性に DNA 傷害を誘導する抗腫瘍薬を用いる場合、Tmab の投与順序が重要であることを示唆している。より効果的な癌治療のため、さらなる研究が必要と考える。

### 論文審査の結果の要旨

上皮増殖因子 HER2 (ERBB2/neu) は胃癌の約 20% に発現しており、HER2 阻害薬トラスツズマブ (Tmab) は、HER2 高発現胃癌において 2011 年本邦でも臨床使用が開始された。HER2 シグナルは DNA の複製、転写、細胞増殖を促進し、Tmab はこれを阻害する。胃癌に使用されるトポイソメラーゼ-1 (Top-1) 阻害薬イリノテカンの活性代謝物 SN-38 は、複製依存性に DNA 二重鎖切断 (DSB) を誘導することから、この 2 剤を併用する場合、逆に DNA 傷害発生の機会を減ずる可能性が考えられる。

申請者は、HER2 高発現の NCI-N87 (N87) と発現のない MKN74 ヒト胃癌細胞を用いて、SN-38 が複製依存性に誘導する DSB と細胞傷害に対し、Tmab の先行投与・後投与の影響を検討した。その結果、1) ウェスタンブロットによる検討では、N87 細胞において SN-38 投与時のリン酸化 AKT、MAPK の発現は Tmab 併用により減弱した。2) MTT assay では、SN-38 による細胞傷害は N87 細胞において Tmab の先行投与で用量依存性に減弱し、逆に後投与では増強した。3) ウェスタンブロットおよび免疫染色において、N87 細胞では Tmab 後投与で DSB の指標  $\gamma$ H2AX が増強し、先行投与では減弱した。4) フローサイトメトリーによる比較では、Tmab は細胞周期の進行を N87 細胞で遅延させた。以上の差異は MKN74 細胞では認められなかった。5) HER2 の二大下流シグナル AKT と MAPKK の阻害薬を用いた検討では SN-38 の細胞傷害は両阻害薬の併用で増強した。

本研究は、HER2 陽性胃癌細胞において Tmab 先行投与は細胞周期の進行を遅延させ、Top-1 阻害薬による DSB 誘導を減弱するが、Tmab 後投与は Top-1 阻害薬の殺細胞効果を増強する事を明らかにした。

審査委員会は、HER2 陽性癌患者の治療において複製依存性に DNA 傷害を誘導する抗腫瘍薬を用いる場合、Tmab の投与順序の重要性を示した本研究の意義を高く評価した。以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大西 一功  
副査 梅村 和夫 副査 梶村 春彦