

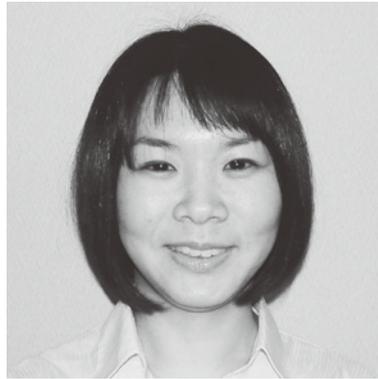
—— 女子大学院学生奨励賞受賞記念講演 ——

2019年5月18日：勝山館

## 乳癌におけるタンパク質間相互作用可視化技術の病理検査への応用

東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野

岩 渕 英里 奈



### 略 歴

平成 21 年 3 月	東北大学医学部保健学科卒業（臨床検査技師）
平成 21 年 4 月	東北大学大学院医学系研究科 技術補佐員
平成 26 年 9 月	東北大学大学院医学系研究科修了 修士（医科学）
平成 28 年 9 月	東北医科薬科大学医学部 技術職員
平成 30 年 4 月	東北大学大学院医学系研究科 日本学術振興会特別研究員
平成 30 年 9 月	東北大学大学院医学系研究科修了 博士（医学）

## 乳癌におけるタンパク質間相互作用可視化技術の病理検査への応用

### Visualization of Protein-Protein Interaction for Application to Pathological Examination in Breast Cancer

岩 渕 英里 奈

東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野

#### はじめに

乳癌患者の治療においては個々の乳癌の増殖様式に応じた『個別化医療』が提唱されており、乳癌の生物学的特徴を理解することは重要である。その為には遺伝子の発現解析やタンパクの機能解析が必須となるが、多くのタンパクは単独では機能せず他のタンパクとの相互作用により種々の機能を生じる。したがってタンパク質間相互作用（PPI: Protein-protein interaction）と乳癌の生物学的特徴との関係を解明することで、単独の機能解明よりも実際の機能に近い結果を得ることが期待される。このため、従来のようにあるタンパクの発現を検討するだけではなく、PPIの検索が重要であると考えられる。病理診断におけるタンパク発現の解析は、ヒト組織をホルマリン固定・パラフィン包埋した切片を用いた免疫組織化学が主となっている。一方、PPIの評価は免疫沈降法のように培養細胞を用いた *in vitro* での解析が主であり、実際の臨床検体であるパラフィン切片上でPPIを評価する方法は、これまで報告がなかった。そこで、本研究ではパラフィン切片上でPPIを可視化することで、PPI可視化技術の臨床検査としての可能性も検討した。本研究ではcarcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) 6に着目し、以下の2点を解明することを目的とした。すなわち① CEACAM6およびCEACAM8が相互作用することで、乳癌細胞にどのような影響を与えているのか？② HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) 陽性乳癌におけるCEACAM6およびHER2との相互作用がHER2阻害剤トラスツズマブの奏功性に何らかの影響を及ぼしているのか？という2点である。

CEACAM6はCEA familyの中でも様々な癌でその発現が報告されているが、生物学的意義は十分に解明されていない。しかし近年、結晶構造解析から

CEACAM6とCEACAM8がヘテロダイマーを形成することが報告されたため、CEACAM6の機能の解明にはCEACAM8を始めとする他のタンパクへの結合タンパクとしての作用に意義があるとして注目されている<sup>1)</sup>。このためCEACAM6単独での検討では、その機能は十分に解明されていないと考えられ、CEACAM8とともに検討することで乳癌における新しい生物学的意義が明らかになると考えられる。

一方、CEACAM6の結合タンパクとしての作用は細胞膜上の受容体への関与も示唆されている。本研究ではCEACAM6と乳癌の増殖に関与する因子として知られるHER2に着目し、HER2およびCEACAM6の両タンパクが細胞膜上で結合することによって干渉しあうのではと仮説を立て、両タンパクのPPIを検討し、合わせてPPIが抗HER2薬トラスツズマブの奏功性に及ぼす影響も検討した。

#### CEACAM6 および CEACAM8 の タンパク質間相互作用の検討

ヒト乳癌組織を用いてCEACAM6およびCEACAM8の免疫組織化学を行った。CEACAM6の発現と臨床病理学的因子との関係を検討したところ、Histological grade および臨床 Stage が低い症例群で有意に高かった。同様の結果はCEACAM8でも認められた。さらに、両タンパク陽性の症例でHistological grade および臨床 Stage も有意に低かった。次に、CEACAM8安定発現細胞株を作製し、CEACAM6およびCEACAM8のPPIの可視化および増殖能・血管内皮細胞に対する浸潤能に関して検討した。PPIの可視化には、近接ライゲーシオンアッセイ法を用いた。その結果、CEACAM6/8両方陽性細胞でのみ、PPIが確認できた。また、増殖能についてはCEACAM6/8両方陽性細胞ではCEACAM6単独陽性細胞およびCEACAM8単独陽

性細胞と比較して抑制されたが、CEACAM8 単独陽性細胞では他の細胞と比べて促進された。血管内皮細胞に対する浸潤能は CEACAM6/8 両方陽性細胞では有意な差は得られなかったが、CEACAM8 単独陽性細胞で CEACAM6 単独陽性細胞と比較して促進された。血管内皮に対する浸潤能との関係に着目し、転移との関係を検討するため、乳癌の肺転移症例および骨転移症例を用いて CEACAM6 および CEACAM8 の免疫組織化学を行った。CEACAM6 は肺転移症例と比較して骨転移症例で有意に発現が高かった。一方、CEACAM8 は骨転移症例と比較して肺転移症例で発現が高かったが、統計学的な有意差は得られなかった。

本研究では、初めて乳癌における CEACAM8 の発現、CEACAM6 および CEACAM8 両タンパクの発現と臨床病理学的因子との関係を明らかにする事が出来た。乳癌組織を用いた検討および *In vitro* の結果から両タンパクが共に発現している乳癌ではその悪性度が低下すると考えられた。一方、近接ライゲーションアッセイ法では CEACAM6/8 両方陽性細胞で細胞膜と細胞質に両タンパクのヘテロダイマーが検出され、CEACAM6 および CEACAM8 のヘテロダイマーの可視化を初めて示した。さらに、CEACAM6 は乳癌の骨転移症例で肺転移症例と比較して有意にその発現が高かった。これまで CEACAM ファミリーの発現動態と乳癌の転移との関係は明らかにされていないが、同じ細胞接着分子である ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) は乳癌皮膚転移巣で高発現する<sup>2)</sup>と報告されており、乳癌の転移に関しては接着分子の転移臓器における特異性が報告されている。そのため、乳癌の骨転移および肺転移に関しては CEACAM6 および CEACAM8 それぞれが関与している可能性が考えられた。*In vitro* で増殖能・浸潤能を検討した結果では両タンパク高発現細胞は血管内皮細胞に対する浸潤能および増殖能は低かった。一方 CEACAM6 単独陽性細胞では増殖能および浸潤能双方が高かった。この事から、CEACAM6 および CEACAM8 がヘテロダイマーを形成することで、上記の CEACAM6 単独での作用が抑制され、血管内皮細胞への結合が阻害されるため、血行性転移は抑制されると示唆された<sup>3)</sup>。

### CEACAM6 および HER2 の相互作用の検討

まず、HER2 陽性乳癌培養細胞株を用いて CEACAM6 がトラスツズマブの効果に与える影響を検討した。CEACAM6 高発現でかつトラスツズマブ感受性が高い BT-474 および HCC-1419 にて 2 種類の

siRNA を用いて CEACAM6 をノックダウンし、トラスツズマブ感受性を WST-8 assay および *In vitro* ADCC assay にて評価した。その結果、BT-474 と HCC-1419 両方の細胞で WST-8 assay の結果で示される HER2 シグナルの抑制および抗体依存性細胞傷害活性で CEACAM6 ノックダウンによるトラスツズマブ感受性の低下が認められた。また、CEACAM6 のノックダウンにより HER2 タンパクの細胞膜領域の割合が減少し、細胞内領域の割合が増加したことで、HER2 タンパクのインターナリゼーションの促進が認められた。さらにトラスツズマブ高感受性の BT-474 および HCC-1419 だけではなく、低感受性の MDA-MB-361 でも CEACAM6 が高発現していた。この事よりトラスツズマブ感受性が CEACAM6 の発現量で規定されているわけではないという仮説の下、高感受性細胞と低感受性細胞の相違点を検討するため、CEACAM6 および HER2 の PPI を検討した。解析には近接ライゲーションアッセイ法および免疫沈降反応を用いた。その結果、BT-474、HCC-1419 で PPI が検出されたが、MDA-MB-361 では検出されなかった。次に、HER2 陽性ヒト乳癌組織を用いて近接ライゲーションアッセイ法にて CEACAM6 および HER2 の PPI を検討し、さらに PPI 陽性細胞と CEACAM6 タンパク発現との関係を検討したところ、両者の間に有意な関係は認められなかった。一方で、術前生検標本（その後トラスツズマブ療法施行）でも CEACAM6 および HER2 の PPI の検討を行ったところ、PPI の陽性率が高い症例で有意にトラスツズマブ療法の治療効果が高かった。

以上の結果から、*in vitro* で CEACAM6 ノックダウンによりトラスツズマブ感受性の低下と HER2 タンパクのインターナリゼーションの促進が認められ、CEACAM6 が HER2 のインターナリゼーションを抑制することが分かった。EGFR ではそのインターナリゼーションおよびデグラデーションの異常調節により EGFR 阻害剤への獲得耐性に関与することが報告されている<sup>4,5)</sup>。同様に HER2 においても HER2 のインターナリゼーションが抗 HER2 薬への耐性に関与すると考えられている<sup>6)</sup>。これらの報告を考慮すると、本研究結果から HER2 は CEACAM6 が存在しない状態では細胞内に取り込まれるため、CEACAM6 をノックダウンするとトラスツズマブ感受性が低下したと考えられた。以上より、CEACAM6 は HER2 のインターナリゼーションに関与し、その結果トラスツズマブ感受性に影響を与えることを本研究で初めて示した。

さらに、乳癌培養細胞およびヒト乳癌組織において

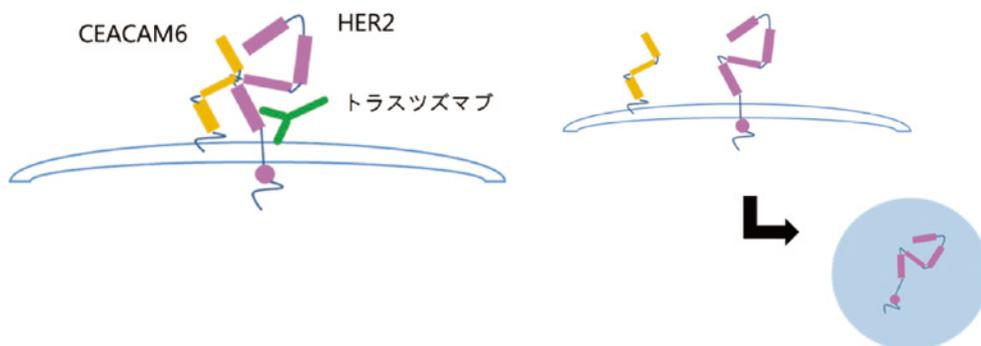


図. CEACAM6 と HER2 の PPI による HER2 インターナリゼーションからのエスケープの概略図

HER2 と CEACAM6 の PPI が検出され、この PPI は術前トラスツズマブ治療の治療効果に正の相関があることも明らかにした。乳癌細胞において CEACAM6 および HER2 の PPI を明らかにしたのは本研究が初めてであり、この相互作用がトラスツズマブ感受性に関与していることが示唆された。以上のことから、CEACAM6 と HER2 が結合することで HER2 を細胞膜に留め、トラスツズマブと結合することを可能にしているのではないかと考えた。そして、この結合は HER2 シグナル経路による細胞傷害活性の抑制および抗体依存性細胞傷害活性の双方で効果があった。Khoury らはマイクロアレイを用いた検討において CEACAM6 の発現が低い乳癌細胞でトラスツズマブとの反応性が増加することを報告しているが<sup>7)</sup>、本研究によりトラスツズマブ感受性に関与するのは CEACAM6 の発現量ではなく、HER2 との PPI であることを示した。したがって、CEACAM6 および HER2 の PPI の有無を評価することで、乳癌患者のトラスツズマブ奏功性を予測できる可能性が示唆された<sup>8)</sup>。

#### おわりに

CEACAM6 は CEACAM8 と相互作用をすることで乳癌細胞の増殖を抑制し、癌の悪性度を低下させることが示唆された。CEACAM6 単独陽性細胞では増殖能および浸潤能が高くなり、また骨転移にも関連を及ぼす可能性が示唆され、CEACAM8 と相互作用をすることでこれらの作用が抑制されると考えられる。一方で、乳癌培養細胞株において CEACAM6 は細胞膜で HER2 と結合し、HER2 のインターナリゼーションを抑制することでトラスツズマブの奏功性に関与する可能性が示唆された(図)。ヒト乳癌組織においても CEACAM6 と HER2 の PPI はトラスツズマブの治療効果と正の

相関関係を示したため、この PPI を評価することにより乳癌患者のトラスツズマブ奏功性を治療前に予測できると考えられた。また、PPI 解析は通常の病理組織標本で実施できる技法であることから、新規検査法としての展開が期待される。

#### 謝 辞

末筆ではございますが、今回の受賞にあたり、ご指導いただきました笹野公伸教授、三木康宏先生を始め病理診断学分野スタッフの皆さま、そして、選考に携わってくださった先生方に心より感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Bonsor, D.A., Günther, S., Beadenkopf, R., et al. (2015) Diverse oligomeric states of CEACAM IgV domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 201509511.
- 2) Ihnen, M., Kilic, E., Köhler, N., et al. (2011) Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin. *J. Clin. Pathol.*, **64**, 146-152.
- 3) Iwabuchi, E., Miki, Y., Onodera, Y., et al. (2019) Co-expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 and 8 inhibits proliferation and invasiveness of breast carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **36**(5), 423-432.
- 4) Wheeler, D.L., Huang, S., Kruser, T.J., et al. (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, **27**, 3944-3956.
- 5) Wheeler, D.L., Dunn, E.F. and Harari, P.M. (2010) Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **7**, 493-507.

- 6) Ben-Kasus, T., Schechter, B., Lavi, S., et al. (2009) Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies : relevance of receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3294-3299.
- 7) Khoury, T., Kanehira, K., Wang, D., et al. (2010) Breast carcinoma with amplified HER2 : a gene expression signature specific for trastuzumab resistance and poor prognosis. *Mod. Pathol.*, **23**, 1364-1378.
- 8) Iwabuchi, E., Miki, Y., Kanai, A., et al. (2018) The interaction between carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 and HER2 is associated with therapeutic efficacy of trastuzumab in breast cancer. *J. Pathol.*, **246**(3), 379-389.