

論文内容要旨

Anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody reverses
resistance to trastuzumab-mediated
antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by
capping MUC1

(KL-6/MUC1 抗体は MUC1 の capping を誘導し、
トラスツズマブの抗体依存性細胞傷害に対する
感受性を改善させる)

Cancer letters, 442:31-39,2019.

主指導教員：服部 登教授

(医歯薬保健学研究科 分子内科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：濱田 泰伸教授

(医歯薬保健学研究科 生体機能解析制御科学)

難波 将史

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

MUC1は、豊富な糖鎖を有する細胞膜貫通型の高分子糖蛋白であり、生理的には乳腺、卵巣、肺などの腺管上皮細胞に主に発現している。MUC1は正常組織においては腺管上皮細胞の細胞表面、特に頂端部に局在して発現している。しかし、乳癌や肺癌などの一部の腺癌細胞ではMUC1が過剰発現し極性を失うことで、細胞表面全体に分布する。

MUC1が過剰発現することは様々な癌腫において予後不良因子となる。この一因として、MUC1が癌細胞の免疫逃避に関わっている可能性がある。我々は以前MUC1が過剰発現した乳癌細胞株においてリンホカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）活性が減弱することを示した。また、MUC1のシアル化糖鎖抗原であるKrebs von den Lugen-6（KL-6）に対する抗体を加えることで、細胞表面上のMUC1が局在化（capping）し、LAK細胞活性が増強することも示した。

トラスツズマブは、HER2受容体に対するヒトモノクローナル抗体であり、HER2陽性の乳癌患者に使用される。トラスツズマブは、HER2受容体に結合して直接細胞内シグナルを調整することで増殖抑制作用を示し、加えて抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）を介することで殺細胞効果を発揮するが、投与しているうちに効果が減弱することが知られている。このHER2陽性乳癌のトラスツズマブ耐性にMUC1が関与している可能性はいくつか報告されているが、トラスツズマブ介在性のADCC活性の減弱とMUC1がどのように関わっているかは明らかにされていない。

今回我々は、MUC1が免疫逃避に関わることで、トラスツズマブのADCC活性にも影響を与えていると仮説を立て、複数の乳癌細胞株においてMUC1の発現量とADCC活性との相関関係を比較した。また、siRNAを用いてMUC1をノックダウンすることがADCC活性へどのように影響するかを調べた。さらに、KL-6抗体が引き起こすMUC1のcappingがADCCに影響を与えるかどうかも調べた。

まず、ウエスタンブロット法を用いて、6種の乳癌細胞株（YMB-S、YMB-A、MDA-MB-175、OCUB-F、SK-BR-3、MDA-MB-361）のMUC1発現量、HER2発現量を定量化した。YMB-S、YMB-A、MDA-MB-175、OCUB-Fの4種でMUC1が過剰発現しており、SK-BR-3、MDA-MB-361ではMUC1は発現していなかった。6種すべてでHER2の発現が観察された。蛍光抗体を用いて、細胞表面上のMUC1の分布を観察したところ、MUC1過剰発現株のうちYMB-SとMDA-MB-175では細胞表面上に均一に分布していたのに対して、YMB-AとOCUB-Fではパッチ状に局在化していた。さらに、⁵¹Crリリースアッセイを用いて、トラスツズマブのADCC活性を評価したところ、MUC1が細胞表面上に均一に分布していたYMB-SとMDA-MB-175ではADCC活性が低く、MUC1がパッチ状に局在化していた細胞株はADCC活

性が高かった。

次に MUC1 発現量とトラスツズマブの ADCC 活性との関連を検証するため、MUC1 過剰発現株のうちトラスツズマブの ADCC 活性が低かった YMB-S と MDA-MB-175 に対して、siRNA を用いて MUC1 をノックダウンしたところ、両者ともに ADCC 活性の増強がみられた。つまり MUC1 の発現量はトラスツズマブの ADCC 活性に強く影響を与えていることが示唆された。

続いて、KL-6 抗体がトラスツズマブの ADCC 活性に影響を与えるかどうかを調べた。KL-6 抗体はトラスツズマブの ADCC 活性が低く、加えて MUC1 が細胞表面上に均一に分布していた YMB-S と MDA-MB-175 におけるトラスツズマブの ADCC 活性を増強させた一方で、MUC11 がパッチ状に局在化していた細胞株には影響を与えなかった。YMB-S と MDA-MB-175 において KL-6 抗体が MUC1 にどのような影響を与えているかを調べるために、蛍光抗体を用いて細胞表面上の MUC1 の分布を観察した。KL-6 抗体を投与すると細胞表面上に均一に分布していた MUC1 は局在化 (capping) し、その形態は YMB-A や OCUB-F で観察された MUC1 のパッチ状に局在化した形態に類似していた。この capping した細胞は KL-6 抗体の濃度依存性に増加した。同様に KL-6 抗体の濃度依存性にトラスツズマブの ADCC 活性の増強もみられた。この現象は YMB-S、MDA-MB-175 の両者で観察され、別の MUC1 抗体を用いても同様の結果が得られた。最後に MUC1 の capping がトラスツズマブの ADCC による細胞死と関係があるかどうかを調べるために、タイムラプスで MUC1 分布の変化と細胞死の様子を観察した。MUC1 が均一に分布している細胞では、細胞死が誘導されず、MUC1 が capping している細胞では細胞死が誘導されていた。以上の結果から、KL-6/MUC1 抗体は MUC1 を capping し、トラスツズマブの ADCC 活性を増強させていることが示唆された。

本研究から、MUC1 が過剰発現かつ細胞表面上に均一に分布している乳癌細胞株は、トラスツズマブの ADCC 活性が減弱することが示唆された。MUC1 の発現量を減らす、あるいは KL-6/MUC1 抗体による MUC1 の局在化 (capping) を起こすことによって、この ADCC 活性は増強した。すなわち、細胞表面上の MUC1 の発現量だけではなく、分布形態もまた癌細胞の免疫逃避に影響を与えていることを明らかにした。今後、MUC1 を治療標的とすることが、トラスツズマブ耐性乳がん患者に対する治療に役立つことが期待される。