（ 様 式 3 ）

論 文 要 旨

Therapeutic strategies for MMAE-resistant bladder cancer through DPP4 inhibition

（ DPP4 阻害による MMAE 耐性膀胱癌に対する治療戦略 ）

LI GANG

【序論及び目的】

世界保健機関（WHO）の 2022 年統計によると、世界の膀胱癌（BC）の発病者の数はすべての癌の中で第 9 位であった。そのため、膀胱癌に対する研究は非常に重要である。抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate, ADC）に用いられるモノメチルアウリスタチン E（monomethyl auristatin E、MMAE）は、エンフォツマブ・ベドチン（enfortumab vedotin、EV）などの治療薬の細胞毒性ペイロードとして、進行性および転移性 BC の治療に使用されている。しかし、MMAE に対する耐性獲得は治療効果を著しく制限する要因である。本研究では、膀胱癌細胞における MMAE 耐性の分子機序を解明し、その克服法を探索することを目的とした。

【材料及び方法】

本研究では、BC 細胞株 T24 及び J82 を用いて薬物漸増法（drug incremental method）で MMAE 耐性株（MR-BCs）MR-T24 と MR-J82 を樹立した。XTT を用いて細胞耐性を測定し、半数阻害濃度（IC_{50}）で表した。親株と耐性株を RNA-seq を行って、耐性株で有意に発現が増加した遺伝子をスクリーニングした。qRT-PCR、western blotting により耐性株で増加したターゲット遺伝子を確認した。TCGA データベースを用いて、ターゲット遺伝子と BC 患者の関係を分析した。耐性株におけるターゲット遺伝子の発現を siRNA で用いてノックダウンしたところ、細胞の活性が影響されることを確認した。ターゲット遺伝子にコードされるタンパク質の阻害剤を用いて、親株と耐性株の細胞活性が影響されることを確認した。XTT、western blotting、Wound healing、Matrigel invasion、セルサイクル、アポトーシス、ROS アッセイを利用して薬剤耐性メカニズム及び MMAE と阻害剤の併用治療効果を検出した。また、併用治療の *in vivo* 研究を行った。

【結果】

MR-BCs では親株と比較して IC_{50} 値が約 8～10 倍に上昇した。RNA-seq 解析の結果、ジペプチジルペプチダーゼ 4（dipeptidyl peptidase 4、DPP4）の発現が顕著に増加した。TCGA データベース解析では、DPP4 高発現群において有意に予後不良であった。siRNA による DPP4 ノックダウンは、MR-BCs の増殖、移動、浸潤能力を有意に抑制した。そして、DPP4 阻害剤シタグリプチン（sitagliptin）が親株と耐性株の増殖、移動、浸潤能力を明らかに抑えた。さらに、*in vitro* 解析においてシタグリプチンが MMAE 感受性を回復させた。薬剤濃度を元の 60%に低下させた場合でも、MMAE とシタグリプチンは依然として強い相乗効果を示した。Western blotting の結果により、PI3K-Akt 経路の抑制が感受性の回復と関与することが示唆された。また、*in vivo* 実験でもこの併用治療効果を証明した。

【結論及び考察】

MMAE は EV の主要成分であり、チューブリン二量体に結合して微小管の形成を阻害することで細胞分裂を抑制し、G_2M 期での細胞周期停止を引き起こし、さらにアポトーシスを誘導する。DPP4 はプロリルオリゴペプチダーゼファミリーに属する細胞表面プロテアーゼである。これは 766 個のアミノ酸から構成される膜貫通型糖タンパク質で、相対分子量は 110 kDa である。DPP4 は多様な生物学的機能を有し、グルコース恒常性、炎症、免疫調節、細胞接着、遊走、浸潤、分化、およびアポトーシスに関与する。サイトカインやケモカインを切断することにより、DPP4 は腫瘍促進因子としても腫瘍抑制因子としても機能し得るため、腫瘍治療薬の標的としての可能性が示唆されている。

この研究では、DPP4 は BC 細胞における MMAE 耐性に深く関与しており、DPP4 阻害によって耐性克服が可能であることが示唆された。DPP4 は膀胱癌の悪性度および薬剤耐性を評価する有用なバイオマーカーとなり得る。以上より、DPP4 を標的とした治療は MMAE 耐性膀胱癌に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

（　Molecular Oncology「IN PRESS」）