

(第12号様式)

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 黒川 真季

学位論文名 Cisplatin 暴露は上皮間葉移行様変化を誘導し分子標的薬に対する耐性獲得に影響を及ぼす

学位論文の要約

目的：

プラチナ製剤等細胞障害性抗癌剤及び分子標的薬の開発により抗癌剤治療が劇的に進化しつつあるが、治療過程で常に薬剤耐性が誘導されることが治療上の限界となる。ところで、臨床においてはこれら異なる二つのタイプの薬剤を連続して使用するケースがあるものの、一方の薬剤により誘導された耐性が他方の薬剤に対する感受性・耐性に与える影響に関しては殆ど解明されていない。本研究では、肺癌細胞株を用いた cisplatin、分子標的薬連続治療モデル系を構築し、プラチナ製剤治療が分子標的薬治療に与える影響を検討した。また、プラチナ製剤、分子標的薬双方に共通する耐性機構である上皮間葉移行が、本連続治療モデルに関与する可能性を併せて検討した。

方法：

EGFR 阻害薬 gefitinib に感受性の肺腺癌細胞株 HCC4006 及び HCC827、HER2 阻害薬 lapatinib に感受性の肺扁平上皮癌細胞株 NCI-H2170 を cisplatin 暴露下で継代培養し cisplatin 耐性細胞を樹立した (HCC4006-CR、HCC827-CR 及び NCI-H2170-CR 細胞株)。更に親株、cisplatin 耐性細胞に存在する分子標的薬耐性ポテンシャル細胞を二週間の gefitinib または lapatinib 暴露により選択し (HCC4006-GR2w、HCC4006-CR-GR2w、HCC827-GR2w、HCC827-CR-GR2w、NCI-H2170-LR2w 及び NCI-H2170-CR-LR2w 細胞株)、得られた二つの耐性細胞を比較解析することにより、シスプラチンに対する耐性獲得が分子標的薬に対する耐性獲得に与える影響について検討した。各分子標的薬への感受性は MTS assay により、上皮間葉移行マーカーの発現はウエスタンブロット及び qRT-PCR 法により確認した。上皮間葉移行に伴う運動能の亢進を transwell migration assay により評価し、この運動能の制御に関わる因子を、siRNA ノックダウン法により検討した [Kurokawa, Ise, Omi, Goishi and Higashiyama, 2013: 主論文]。

結果：

cisplatin 耐性細胞株 HCC4006-CR は親株に比して gefitinib 感受性を部分的に失った。また本耐性細胞を gefitinib に僅か 2 週間暴露することにより選択された細胞株 HCC4006-CR-GR2w は、HCC4006-GR2w と比して gefitinib 高耐性を示した。これらの結果は、cisplatin 耐性獲得が gefitinib 耐性化に影響を与えたことを示す。さらに耐性細胞では上皮間葉移行様の変化を認め、cisplatin によって誘導された上皮間葉移行様の変化が gefitinib 耐性獲得に影響を与えることを示す結果を得た。

HCC827 細胞株から同様に樹立された耐性細胞 HCC827-CR-GR2w もまた、上皮間葉移行様の変化を示すマーカー変動を認めた。ところで、HCC827 の gefitinib 耐性機構として *MET* 遺伝子増幅が報告されているが、HCC827-CR-GR2w では *MET* 遺伝子増幅は見られなかった。一方、親株 HCC827 から選択された gefitinib 耐性細胞 HCC827-GR2w は上皮間葉移行様の変化を示さなかった。以上の結果は、HCC827 では cisplatin 暴露が gefitinib に対する耐性獲得機構に影響を与え、上皮間葉移行様の変化が優勢的に gefitinib 耐性獲得に関与したことを示す。

また、cisplatin 耐性細胞株 NCI-H2170-CR から lapatinib 二週間暴露により選択された NCI-H2170-CR-LR2w でもまた上皮間葉移行様の変化を示すマーカー変動を認めたが、親株から選択された NCI-H2170-LR2w では上皮間葉移行様の変化は見られなかった。以上の結果は、NCI-H2170 においても cisplatin 暴露が lapatinib に対する耐性獲得機構に影響を与え、上皮間葉移行様の変化が優勢的に lapatinib 耐性獲得に関与したことを示す。

樹立した耐性細胞の運動能を評価したところ、cisplatin 耐性細胞から分子標的薬で選択された、上皮間葉移行様の変化を伴った細胞株で顕著な運動能の亢進が認められた。また、HCC4006 及び HCC827 由来耐性細胞では、この運動能の亢進が受容体チロシンキナーゼ AXL の発現亢進と相関し、これらの亢進した運動能は AXL ノックダウンにより有意に抑制された。

結論：

cisplatin、分子標的薬による連続治療においては、cisplatin によって誘導された上皮間葉移行様の変化が、続く分子標的薬に対する耐性獲得にも影響を与えうる可能性が示された。また、上皮間葉移行様の変化を伴ってこれら二剤に耐性を獲得した癌細胞は運動能の亢進など高転移能を獲得する可能性が示され、それら耐性癌に対しては AXL 等の上皮間葉移行関連因子を標的とした抗転移治療が有効ではないかと考えられた。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文：Maki Kurokawa, Nobuyuki Ise, Kazuya Omi, Katsutoshi Goishi, Shigeki Higashiyama: Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Cancer Science* 104(7):904-911 2013 DOI: 10.1111/cas.12171