

学位論文審査結果の要旨

氏名	黒川真季
審査委員	主査 荒木 博陽 副査 浜川 裕之 副査 亀岡 一裕 副査 杉田 敦郎 副査 熊木 天児

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

審査結果の要旨：

<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たところ、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。申請者は、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ェ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。

<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得ることが示された。

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 に対しては cisplatin 暴露が gefitinib への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。

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、親株から選択した 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 に対しても cisplatin 暴露が lapatinib への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> 申請者は、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得る可能性を示した。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を示し、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いう提案を示した。

本研究に関する公開審査会は平成 25 年 1 月 31 日に行われた。研究内容は Cisplatin 暴露によって誘導された上皮間葉移行様の変化が分子標的薬に対する耐性獲得にも影響する可能性を示したものである。上皮間葉移行様の変化の定義、薬物耐性の意味、濃度の設定根拠、臨床サイドからの考え方、セルラインの特徴、数の問題、Cisplatin 暴露と分子標的薬の曝露の順番のこと、曝露時間の問題など広範囲な数多くの質疑がなされたが、申請者は未だに不明な点や今後の展望を含め、的確に回答した。審査会は一致して本研究が博士（医学）の学位論文に値するものと結論した。