

論文の内容の要旨

論文題目 「細胞接着分子 CADM1 によるゲフィチニブ耐性ヒト肺腺がんの耐性克服
に向けた実験的治療」

氏名 土屋 武弘

世界においても、そして日本でも、肺がんは死亡率が第 1 位の悪性腫瘍である。肺がんは約 80-85%を占める非小細胞肺がんとは約 15-20%を占める小細胞肺癌に分類される。特に腺がんは、非小細胞肺がんの 50-60%を占める。悪性腫瘍は、がん原遺伝子、がん抑制遺伝子、遺伝子修復酵素における遺伝子異常が、経時的・多段階的に蓄積することによって生じる。特に、肺腺がんの成因に関わるがん遺伝子として *EGFR*(上皮成長因子受容体)、*KRAS*、*MET*、*EML4-ALK* などが、がん抑制遺伝子として *TP53*、*X* などが報告されている。近年、これらの遺伝子を標的とした分子標的薬が開発され、治療選択は大きく変化した。その中で、*EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤(*EGFR-TKI*) : ゲフィチニブ、エルロチニブは、手術不能症例において広く使用され、著明な抗腫瘍効果をもたらしている。

EGFR は、*EGFR/ErbB1/HER1*、*ErbB2/Neu/HER2*、*ErbB3/HER3* と *ErbB4/HER4* の 4 遺伝子から構成される *ErbB/HER family* に属している。*EGFR* は、増殖因子が結合する細胞外領域、細胞膜を貫通する疎水性膜貫領域、チロシンキナーゼ活性をもつ細胞内領域から構成される。リガンドである *EGF*、*TGF- α* 等が結合すると、*EGFR* はホモ 2 量体、または他の *ErbB family* 受容体とヘテロ 2 量体を形成して活性化され、*EGFR* に複数存在するチロシン残基を自己リン酸化する。その結果、*Ras/Raf/MEK* 経路、*Jak/STAT* 経路、*PI3K/Akt* 経路等の下流シグナル分子群が活性化され、細胞増殖や生存を正に制御している。

EGFR の活性化変異には、細胞外領域の欠失や、チロシンキナーゼドメイン内の点突然変異・欠失が知られている。特に、キナーゼドメイン内の ATP 結合領域での 5 アミノ酸欠失や 858 番目のロイシンの置換によって、リガンド非依存的な自己リン酸化が生じ、*EGFR* の恒常的な活性化が生じる。*EGFR-TKI* は、この ATP 結合部位に対して ATP と競合的に結合することで *EGFR* のリン酸化を阻害し、細胞の増殖抑制・アポトーシスを誘導する。

ゲフィチニブは 2002 年に、世界に先駆けて日本で承認された *EGFR-TKI* である。非・軽喫煙者の肺腺がん患者に対する第 III 相試験 *IPASS*、*First-Signal* 試験において、無増悪生存

期間(PFS)の延長が示され、プラチナ製剤等の標準療法に対する優越性が証明された。その後、EGFR 遺伝子変異の有無で患者選択をした第Ⅲ相試験においても、中間解析の段階でゲフィチニブ群の優越性が示された。現在では「EGFR 遺伝子変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に適応され、優れた治療成績をあげている。

しかしながら、ゲフィチニブは、ほぼ全ての症例で約 1-2 年の間に耐性を獲得することが大きな問題となっている。耐性獲得機構としては、1) EGFR 二次的遺伝子変異：ATP 結合部位の構造変化によりゲフィチニブ親和性低下をもたらす、790 番目のスレオニンからメチオニンへの変異(T790M)、2) MET 遺伝子増幅：過剰発現した MET が ErbB3 蛋白質(ERBB3) と会合し、ERRB3 の持続的活性化を誘導するバイパス経路の発生、3) HGF 過剰発現：肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) の過剰発現による MET 経路の活性化、4) 上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition :EMT)：EMT 誘導による上皮性形質の消失による薬剤感受性の低下・消失。及び肺腺がん細胞から小細胞肺がんへの形質転換、5)PIK3CA 変異：PIK3CA の変異による恒常的な PI3K 経路の活性化が報告されている。以上の獲得耐性機構のうち、5~22%の症例が MET 遺伝子増幅に起因している。

そこで、MET を機能阻害し、ゲフィチニブ耐性を克服することを目的として、本研究を遂行することとした。MET の機能抑制の候補因子として、遺伝子 X に着目した。X は、機能的相補法により非小細胞肺がん細胞株より単離・同定された、がん抑制遺伝子である。X は、ほぼ全ての上皮組織で発現し、特に肺、脳、精巣において強い発現が認められる。一方、肺をはじめとする、様々な組織由来の腫瘍においては、その進展に伴い X の発現は減弱或いは欠失する。ヒト肺腺がんでは、約 60%の症例で発現低下または欠失が認められ、その原因としてアレルの欠失、プロモーターのメチル化などが報告されている。

近年、当研究室の先行研究から、X が MET シグナル経路に対して抑制的に働く可能性が明らかとなった。

そこで、EGFR 変異を有するゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞株 A と、MET 増幅により耐性を獲得した B 及び C 細胞をモデルとして、MET 依存的獲得耐性における X の役割が検討された。

その結果、1) 親株と異なり、耐性株では X の発現を認めないこと、2) X 発現細胞内では X と MET が複合体を形成すること、3) 耐性株に X を過剰発現させることで、ゲフィチニブに対する感受性が部分的に回復することが明らかとなった。

以上の成果から、ゲフィチニブ耐性細胞に X を導入・発現することで、MET 増幅による EGFR-TKI 獲得耐性を克服できる可能性が考えられた。しかし上記先行研究は、培養細胞を用いた *in vitro* での検討に過ぎない。そこで本研究では、*in vivo* においても X 導入によるゲフィチニブ感受性の回復が認められるか、担癌マウスモデルを用い、検討することとした。

まず A、B 細胞と、B に X を導入した X 安定発現細胞株 B+X を用いて異種異所性移植マウスモデルを樹立した。Balb/c nude マウスの背部皮下に各細胞を移植し、無作為に 2 群に

割り当て、ゲフィチニブ投与群、非投与群とした。ゲフィチニブ投与群には、ゲフィチニブを週 5 回経胃的に投与した。陰性コントロールとして、PBS を同量投与し、非治療群とした。投与期間は 21 日間とし、経時的に腫瘍径を測定した。

その結果、耐性株 B 由来の腫瘍 (B 腫瘍群) とは対照的に、ゲフィチニブ投与によって B+X 細胞由来の腫瘍 (B+X 腫瘍群) 体積はほとんど増大せず、ゲフィチニブに対する感受性が回復していることが示された ($p<0.01$)。この腫瘍組織を採取し、抗 Ki-67 抗体による免疫染色により増殖能を比較検討したところ、Ki-67 陽性細胞は、B 腫瘍に比べ B+X 腫瘍群で有意に低下していた。興味深いことに、ゲフィチニブ非投与群においても、B+X 腫瘍群の腫瘍体積は、B 腫瘍群と比較して有意に小さく ($p<0.01$)、Ki67 陽性細胞も減少していることが明らかとなった。従って、X を単独で過剰発現させることで MET 耐性肺腺がん細胞の増殖を抑制し、更にゲフィチニブを作用させることで相乗的な増殖抑制効果を示すことが示唆された。

次に、X をドキシサイクリン(Dox)依存的に発現誘導可能な細胞株を確立し、同様な担癌マウスモデル実験を行なった。Dox 投与により X の発現を誘導し、ゲフィチニブ投与することにより、腫瘍増殖の抑制を認め、X 安定発現株と同様の結果を得ることが出来た。

そこで、より応用的な抗腫瘍戦略・耐性克服法として、外来性に X を導入する実験的遺伝子治療モデルの確立を目指した。ゲフィチニブ耐性腫瘍に X を外来性に導入して、ゲフィチニブ投与を行った。その結果、X を外来性に導入して、ゲフィチニブを投与した群において、有意な腫瘍増殖の抑制を認めた。このことから、MET 増幅に起因するゲフィチニブ耐性肺腺がんの耐性克服に対して、X を外来性に導入することが新たな遺伝子治療法となる可能性があるものと考えた。

・本論文は学術誌に投稿予定であるため、当該遺伝子、タンパク質と細胞を各々遺伝子 X、X、A 細胞、B 細胞として表記いたしました。