

審査の結果の要旨

氏名 小倉 隼人

本論文では、過剰なチロシンキナーゼ活性を有する分子標的治療薬耐性がん細胞を用いて、自身のチロシンキナーゼ活性の強弱により制御される細胞の生存と死の分子機構について解析した結果が述べられている。本論文は5章からなるが、その第1章ではランダムな遺伝子変異を導入できる ENU mutagenesis 手法を用いた耐性細胞スクリーニング中に見出された、分子標的治療薬存在下のみで増殖できるクローンとその遺伝子変異部位の解析、第2章では分子標的治療薬除去後に観察される細胞死（アポトーシス）の機構解析、第3章では doxycycline (DOX) により発現制御可能な ROS1 発現誘導モデルでの検証、第4章ではリン酸化プロテオーム解析で見出された ROS1 による FAF1 分子のチロシンリン酸化について、第5章では ROS1 以外を標的とする分子標的治療薬を含む薬剤ライブラリでのスクリーニングにより見出された p38MAPK の活性化を介した ROS1 依存的な細胞死について述べられている。

本論文提出者である小倉君は、ランダムな遺伝子変異を導入できるスクリーニング系である ENU mutagenesis スクリーニングの過程で得られた ROS1 キナーゼ部位内に F2004V もしくは F2075C の変異を有する分子標的治療薬耐性がん細胞 (F2004V 変異細胞、F2075C 変異細胞) では、cabozantinib 低濃度存在下でのみ細胞増殖が促進され、同薬剤非存在下では細胞が死滅してしまうという所属研究室で見出されていた現象に興味を持ち、cabozantinib に依存して増殖するという分子標的治療薬耐性機構を解明すべく研究を開始した。

小倉君はまず、cabozantinib 以外の ROS1 阻害薬である crizotinib や lorlatinib の低濃度存在下でも F2004V 変異細胞や F2075C 変異細胞の増殖が促進され、逆に同薬剤の非存在下では細胞が死滅してしまう現象を見出し、ROS1 を起点とするシグナルが細胞死誘導に関与していることを明らかにした。さらに、ROS1 阻害薬の非存在下では、F2004V 変異細胞と F2075C 変異細胞はともに ROS1 シグナルの過剰活性化とその下流増殖因子の過剰活性化が起こることを明らかにした。ROS1 シグナルの活性化は一般的には細胞増殖を誘導するとされているにも関わらず、2004V 変異細胞と F2075C 変異細胞では caspase-8 や PARP の切断といったアポトーシス誘導マーカーが認められ、アポトーシスが誘導されていることが確認された。また、ENU mutagenesis では ROS1 以外の遺伝子にも変異を生じさせる可能性があるため、doxycycline (DOX) 添加により発現制御できる F2075C 変異型 CD74-ROS1 遺伝子を用いて ROS1 シグナルを人為的に過剰活性化する細胞を再構築して ENU mutagenesis で得られた実験結果が再現されるかの検証も行っている。この再構築されたがん細胞でも、DOX 添加により ROS1 シグナルを過剰活性化すると細胞死が誘導されることが確認された。さらに、低濃度 ROS1 阻害薬存在下では細胞死が抑制される

だけでなく細胞増殖が促進されることが観察され、がん分子標的治療薬依存的な増殖を示すがん細胞は確かに ROS1 キナーゼ部位内の点変異と相関していることが明らかになった。cDNA マイクロアレイを実施することで、過剰な ROS1 シグナルを起点とした細胞死の際に、各種アポトーシスシグナルが活性化していることが明らかになっている。さらに、リン酸化プロテオーム解析を実施することで、過剰な ROS1 シグナル特異的にチロシンリン酸化される候補タンパク質を複数見出した。その中で小倉君は、細胞死受容体シグナル伝達経路関連因子である FAF1 に注目し、詳細な解析を行うことで FAF1 が ROS1 によって直接的にチロシンリン酸化されることを世界で初めて明らかにしている。さらに、282 種類の阻害剤ライブラリを用いたスクリーニングを実施することで、F2004V 変異細胞や F2075C 変異細胞の細胞死を抑制するシグナル伝達経路の同定を進め、Hsp90 阻害薬が過剰な ROS1 シグナル伝達を部分的に抑制することで細胞死を抑制すること、F2075C 変異細胞においては p38MAPK 阻害剤添加によって細胞死が部分的に抑制されることも見出している。よって、ROS1 シグナルの過剰活性化による p38MAPK シグナルの活性化が細胞死誘導に関与していることが明らかにされた。

本論文提出者である小倉君は、分子標的治療薬依存的な増殖を示すがん細胞が治療抵抗性につながっている可能性を示唆するとともに、先行研究との共通点および相違点、分子標的治療薬の断続的投与や休薬期間の設定の提案などを通じ、本現象の臨床的位置づけも論じていた。

本論文で示された結果は小倉君自身で遂行した実験の結果であり、本論文第 4 章のリン酸化プロテオーム解析については英語論文の共著者に含まれる国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクト所属の朝長毅プロジェクトリーダーおよび足立淳プロジェクト研究員に研究指導・機器操作方法の教授をいただいた。しかし、小倉君は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所まで出向き主体となって実験および解析を行ったことを考慮すると、本論文の成果に対する論文提出者の寄与は十分であると判断する。

以上より、本論文提出者は博士（医科学）の学位を授与するに値すると判断した。

以上 1986 字