

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構における細胞接着分子 CADM1 の意義

氏名 桑野 秀規

要旨

肺がんは 2008 年の WHO による統計によると、世界のがん死亡の約 18% を占めており、また、日本人のがん死の第 1 位を占め、厚生労働省によると 2011 年は 70293 人が死亡している。肺がんによる死亡者数は年々増加傾向にあり、したがって肺がんが社会に与える影響は極めて大きく、その予防、並びに肺がんによる死亡の克服の社会的意義は高い。肺がんの大部分は組織学的に神経内分泌由来の性質を持つ小細胞肺がん、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん等を主体とする非小細胞肺がん (Non-small cell lung carcinoma; NSCLC) に分類される。従来の組織型や病期分類による治療感受性や予後の予測はしばしば困難なこともあり、癌の生物学的特性を反映する、診断や治療に役立てられるマーカーの同定が求められている。

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) は、膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体 (Receptor of tyrosine kinase; RTK) で、約 170kDa の分子量で二量体を作るがん原遺伝子産物である。代表的な EGFR のリガンドは上皮成長因子 (Epidermal growth factor; EGF) である。リガンドが EGFR の細胞外ドメインに結合すると、EGFR 分子同士でホモ二量体を形成する場合や、他の HER ファミリーとヘテロ二量体を形成する場合がある。この後、細胞内ドメインのチロシンキナーゼのお互いのチロシン残基をリン酸化して活性化される。さらに、そのリン酸基に Grb2 (growth factor receptor bound protein 2)、Shc (src homology and collagen) 等の特異的なアダプタータンパク質が結合し、下流の PI3K-AKT 経路や RAS-MAPK 経路を活性化させ、細胞の生存や増殖を促進すると言われている。

ゲフィチニブは EGFR のチロシンキナーゼ部に ATP と競合的に結合することにより、抗腫瘍効果を示す可逆的 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-tyrosine kinase inhibitor; EGFR-TKI) である。我が国では非小細胞肺がんに対し 2002 年に承認され、当初から腺がん、女性、非喫煙者の腺がんを中心とした症例に腫瘍抑制効果が認められた。さらに、2004 年に EGFR キナーゼ部位における特異的変異を持つ症例においては、この EGFR 変異を持たない症例と比べ、ゲフィチニブ投与による治療効果が顕著に高いことが明らかにされた。

このように、EGFR は肺腺がんの治療に対する重要な標的分子であるが、臨床上の大きな問題点として、ゲフィチニブ奏功例の多くは 1-2 年以内に耐性を獲得することが挙げられる。EGFR-TKI への耐性獲得の主な分子機序は、2 つ報告されている。1 つ目はコドン 790 のスレオニンがメチオニンに変化 (T790M) することにより、ATP 結合部位の立体構造が変化し、EGFR-TKI の親和性が低下して、EGFR-TKI に対する耐性を獲得するものが全体の約 50%

を占めている。一方、*MET* 増幅により過剰発現した *MET* が、*EGFR* に非依存的に *ERBB3* を活性化することにより、がん細胞の生存、増殖を促進する細胞が、全体の約 20%に認められるとされる。このように、肺腺がんは早期に *EGFR-TKI* に対する耐性を獲得するため、将来的には *EGFR-TKI* 耐性獲得後に再度遺伝子検査や免疫組織染色を行い、その耐性獲得機序に応じた治療選択を行うことが重要と考えられる。

CADM1 は所属研究室において同定されたがん抑制分子である。上皮細胞の側面に発現してホモ二量体を形成し、隣接細胞のホモ二量体とトランス結合を形成し、細胞接着分子としても働く。その細胞内ドメインには 4.1 結合モチーフおよび *PDZ* 結合モチーフを持ち、それぞれ 4.1 タンパク質群および膜結合性グアニレートキナーゼ群 (membrane-associated guanylate kinase homologue: *MAGuKs*) が結合している。4.1 タンパク質群のうちでは 4.1B / *DAL-1* と 4.1N が *CADM1* と結合することが示されている。この 4.1 タンパク質群は、アクチンやスペクトリンと結合し、細胞接着シグナルを細胞骨格へと伝える。また、この 4.1B 遺伝子は非小細胞肺がんの 57%において、プロモーター領域のメチル化により不活化されていることから、*CADM1-4.1B* の分子経路は非小細胞肺がんの重要ながん抑制経路と考えられている。所属研究室において、*CADM1* の *MET* 分子経路への修飾の実態を、肺腺がん培養細胞 A549 細胞を用いて解析した。その結果、A549 細胞株において、*HGF* 刺激により誘導された *MET* および *AKT* や *mTOR* などの分子群のリン酸化は、*CADM1* の発現により抑制されることが示された。

さらに、*CADM1* と *MET* が相互作用を免疫沈降法にて検討した。すると、A549 に *CADM1* を過剰発現させた A549-*CADM1* 細胞株の細胞抽出物を抗 *MET* 抗体にて免疫沈降したところ、*CADM1* が共沈することが、抗 *CADM1* 抗体を用いたウエスタン・ブロット法により示された。従って、*CADM1* は肺上皮細胞の細胞膜上において *MET* と複合体を作り、*MET* 経路を抑制するが、*CADM1* ががんにおいて不活化すると、*MET-AKT* シグナル経路の抑制機能が減弱し、結果として、細胞増殖の促進から発がんに至る引き金となることが示唆された。

そこで、我々は、本研究で *MET* 過剰発現により *EGFR-TKI* に耐性を獲得した肺腺がんにおいて、*CADM1* と *MET* との関係を検討し、さらに、*CADM1* が *MET* シグナル経路を抑制し *EGFR-TKI* 耐性を克服しうるか否かを調べた。

まず、ゲフィチニブ高感受性肺腺がん細胞株 HCC827 で認めた *CADM1* の発現が、*MET* 増幅によりゲフィチニブ耐性を示す HCC827 由来細胞 GR5、GR6 では欠如することを見出した。次に GR5 細胞に *CADM1* をトランスフェクションし、2つの独立した *CADM1* 恒常発現株である GR5/*CADM1*#1 細胞と GR5/*CADM1*#4 細胞を得た。これら2つの細胞株を HCC827 とベクター単独導入した HCC827GR5 と共に MTS アッセイを用いて、ゲフィチニブ感受性を比較した。50%阻害濃度 (IC_{50}) を計算したところ、HCC827 は $0.023 \pm 0.023 \mu\text{M}$ 、ベクター単独導入 HCC827GR5 は $10 \mu\text{M}$ 以上と、他の文献と比較しても同様の値だった。一方で、GR5/*CADM1*#1 細胞は $0.50 \pm 0.72 \mu\text{M}$ 、GR5/*CADM1*#4 細胞は 0.93 ± 0.94

μM であり、感受性の回復を認めた。しかし、親細胞 HCC827 の感受性には至らなかった。

また、CADM1 を導入した GR5 細胞株の抽出液を抗 MET 抗体にて免疫沈降を行ったところ、抗 CADM1 抗体によるウェスタンブロット法にて CADM1 が共沈することが示された。さらにこの抽出液を抗 CADM1 抗体で免疫沈降し、抗 MET 抗体でウェスタンブロット解析を行ったところ、MET と共沈していることが示された。また、 $5 \mu\text{M}$ のゲフィチニブを 48 時間暴露させた CADM1 導入 GR5 細胞群は、コントロール群と比較して、MET やその下流分子である AKT や ERK1/2 のリン酸化が抑制された。一方で、GR5 細胞にゲフィチニブを暴露させたところ、MET やその下流分子のリン酸化の抑制は認めなかった。以上より、CADM1 は MET と複合体を形成し、MET の経路を抑制することにより、ゲフィチニブ感受性を回復したと考えられた。

これに対し、EGFR の T790M 変異によるゲフィチニブ耐性の機序に CADM1 が関わるかどうかを検討するために、ゲフィチニブ高感受性肺腺がん細胞株 PC9 と、この PC9 細胞由来で EGFR の T790M 変異により耐性を獲得した PC9ZD 細胞について CADM1 の発現を検討したところ、両者ともに CADM1 発現を認めなかった。次に PC9ZD 細胞に CADM1 を外来性に発現させたところ、ゲフィチニブ感受性の回復は全く認められなかった。以上より CADM1 は MET 経路の抑制を介してゲフィチニブ耐性を抑える可能性が示された。

以上の結果から、肺腺がんにおいて CADM1 の発現の有無が、MET 活性化を介したゲフィチニブに対する耐性を獲得するか否かを予測する指標となる可能性が考えられる。今回の結果では、耐性獲得前に CADM1 の発現が認められた HCC827 細胞は MET 過剰発現を介して耐性を獲得していたが、CADM1 の発現が認められなかった PC9 細胞では、T790M により耐性を獲得していた。

さらに、HCC827GR5 に CADM1 を導入した細胞株においては、ゲフィチニブ感受性の回復を認めたことから、MET 過剰発現により耐性を獲得した肺腺がんの患者に対し、CADM1 の導入によりゲフィチニブの抗腫瘍効果を回復できる可能性も考えられた。以上より本研究では、肺腺がんにおける CADM1 の発現の有無が MET 経路を抑制すること、またゲフィチニブ耐性獲得機序を予測する分子マーカーの一つになり、治療法の選択に関わる可能性や、MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん患者の治療に結びつく可能性が示唆された。