

審査の結果の要旨

氏名 桑野 秀規

本研究は肺腺がんにおいてがん抑制分子 CADM1 が MET とその下流分子の活性を抑制するという先行研究の結果をもとに、CADM1 が MET 過剰発現による EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性化を克服するか否かを明らかにするため、ゲフィチニブに対する耐性獲得機序の異なる 2 種類のヒト肺腺がん細胞株を用い、外来性に CADM1 を導入させ、MTS アッセイ、ウエスタンブロット解析、免疫沈降法を用いて解析し、以下の結果を得た。

1. ウエスタンブロット解析を用いて、肺腺がん細胞株の HCC827 細胞と、HCC827 細胞から得られた MET 過剰発現によりゲフィチニブに対し耐性を獲得した HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞のそれぞれの MET と CADM1 の発現を調べた。その結果、HCC827 細胞では MET と CADM1 の発現を認めた。一方で、HCC827GR5 細胞と HCC827GR6 細胞において MET は過剰発現し、かつ CADM1 の発現は欠如していた。
2. HCC827GR5 細胞に CADM1 を外来性に導入し、CADM1 が恒常的に発現した 2 つの独立した GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞を樹立した。また、HCC827GR5 細胞にベクターを単独導入した HCC827GR5V6 細胞を含む 6 つの独立した細胞株を樹立した。
3. GR5/CADM1#1 細胞を用い、免疫沈降法を施行し、CADM1 と MET の関係を調べたところ CADM1 と MET は複合体を形成していた。
4. HCC827 細胞、HCC827GR5V6 細胞、GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞のゲフィチニブ感受性を、MTS アッセイを用いて調べた。GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞はゲフィチニブ感受性を回復していた。IC₅₀ を計算すると、HCC827 細胞は $0.023 \pm 0.023 \mu\text{M}$ 、HCC827GR5V6 細胞は $10 \mu\text{M}$ 以上、GR5/CADM1#1 細胞は $0.93 \pm 0.94 \mu\text{M}$ 、GR5/CADM1#4 細胞は $0.50 \pm 0.72 \mu\text{M}$ であった。
5. HCC827GR5V6 細胞、GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞に対して、ゲフィチニブを暴露させると MET から ERBB3 を介した下流の分子の活性は、HCC827GR5V6 細胞と比べ、GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞においてより抑制された。また、HCC827GR5V6 細胞と比べて、GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞においては、切断型 PARP の発現がより上昇しており、アポトーシスが誘導されたと考えられた。
6. ヒト肺腺がん細胞株の PC9 細胞と、PC9 細胞由来で T790M によりゲフィチニブに対し耐性を獲得した PC9ZD 細胞を用いて、ウエスタンブロット解析を施行し、CADM1 と MET の発現を調べた。その結果、CADM1 は内因性に発現していなかった。また、

耐性化に伴い MET の過剰発現も認めなかった。

7. PC9ZD 細胞に CADM1 を外来性に導入し、CADM1 を恒常的に発現した細胞株を樹立し、MTS アッセイを施行したところゲフィチニブに対する感受性の回復は認めなかった。

以上の結果から、本研究で CADM1 は MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得したヒト肺腺がん細胞に対して、MET と複合体を形成し、ゲフィチニブ感受性を回復させる可能性が示された。また、肺腺がんにおいて CADM1 の発現の有無が、MET の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分子マーカーとなりうると考えられた。

現在、ゲフィチニブ耐性を獲得した肺がんに対する治療は困難であるが、これを克服する新規治療、診断に応用できる可能性が示され、学位の授与に値するものと考えられる。