

平成 21年 2月

# 上田康仁 学位論文審査要旨

主 査 汐 田 剛 史  
副主査 井 藤 久 雄  
同 清 水 英 治

## 主論文

Synergistic cell growth inhibition by the combination of amrubicin and Akt-suppressing tyrosine kinase inhibitors in small cell lung cancer cells: Implication of c-Src and its inhibitor

(肺小細胞癌細胞におけるamrubicinとAkt抑制チロシンキナーゼ阻害薬の相乗的細胞増殖抑制効果：c-Srcとその阻害薬の関連について)

(著者：上田康仁、井岸正、橋本潔、陶山久司、荒木邦夫、澄川崇、武田賢一、中崎博文、松波馨士、小谷昌広、重岡靖、松本慎吾、清水英治)

平成21年 International Journal of Oncology 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

**Synergistic cell growth inhibition by the combination of amrubicin and Akt-suppressing tyrosine kinase inhibitors in small cell lung cancer cells: Implication of c-Src and its inhibitor**

**(肺小細胞癌細胞におけるamrubicinとAkt抑制チロシンキナーゼ阻害薬の相乗的細胞増殖抑制効果：c-Srcとその阻害薬の関連について)**

## 背 景 と 目 的

肺小細胞癌は急速な増大と転移が特徴的であり、その化学療法においては一次治療への反応は良好であることが多いものの、治療抵抗性や再発のために長期生存は困難である。これらの状況を改善するために、従来の薬剤の使用法の工夫や新規薬剤が必要とされている。Aktは抗癌剤への耐性に関与していることがこれまでに多数報告されており、これを標的とした研究を試みた。

## 方 法

Aktの活性化状態の異なる肺小細胞癌細胞株であるH209、H69、N417細胞に対する、cisplatin、etoposide、SN-38、amrubicinの50%発育阻止濃度 ( $IC_{50}$ ) をMTT法で比較した。isobologram analysisを用いて、Akt inhibitorであるLY294002と抗癌剤を併用し、その併用効果を評価した。さらにN417細胞においてgenisteinとamrubicinの併用効果を確認し、その効果に係するチロシンキナーゼをWestern blot法を用いて検討した。チロシンキナーゼに対して阻害的な薬剤とamrubicinと併用効果も確認した。またそのチロシンキナーゼの肺癌組織における発現を免疫染色で確認した。

## 結 果

cisplatin、etoposide、SN-38、amrubicinの上記細胞株への $IC_{50}$ はAktのリン酸化状態が高いほど高値を示した。このことからAktのリン酸化状態が抗癌薬抵抗性に関与していると考えられた。Aktのリン酸化の強いN417細胞において、Aktの阻害薬であるLY294002をそれぞれの薬剤と併用しその効果を確かめたところ、LY294002はcisplatin、etoposide、SN-38とは相加的効果であったが、amrubicinとは相乗的な細胞増殖抑制効果を示した。*In vitro*においてAktを抑制することでamrubicinの感受性が高まることが示された。続いてAktの上

流に位置するチロシンキナーゼに関する検討も行った。Aktの活性化の強いN417細胞とAktの活性化の弱いH209細胞ではチロシンキナーゼのリン酸化状態、パターンが異なっており、Aktの活性化状態はその上流のチロシンキナーゼの影響を受ける可能性が示唆された。N417細胞に対して、非特異的チロシンキナーゼ阻害薬であるgenisteinをamrubicinと併用しWestern blot法とMTT法で検討を行ったところ、genisteinはAktを濃度依存的に抑制し、amrubicinと相乗的細胞増殖抑制効果を示した。どのチロシンキナーゼが強く影響しているかを調べると、N417細胞ではc-Srcが活性化されていた。c-Src阻害剤であるPP2を用いると、c-SrcとAktを平行に抑制することが確認され、amrubicinと相乗的な細胞増殖抑制効果を示した。またSrc阻害効果を持ち、すでに慢性骨髄性白血病に対して臨床使用されているdasatinibを用いた場合でもPP2と同様の結果を示すことができた。肺小細胞癌組織において免疫染色で確認したところ、19検体中の17検体でc-Srcの発現が確認された。

## 考 察

本研究はN417細胞において、Aktを抑制することでamrubicinの感受性を高めることを示したものである。現在、肺癌に臨床使用できるAktの直接的な阻害薬は存在しない。Aktの抑制を模索するために上流のチロシンキナーゼについても検討すると、N417細胞においてはc-Srcの影響が大きいことが明らかとなった。そしてc-Src特異的阻害薬であるPP2を用いた場合にN417細胞のamrubicinへの感受性は高まり、また臨床使用可能なdasatinibでも同様の結果を得た。これらの現象はN417細胞において確認できたことであるが、c-Srcが肺小細胞癌治療において標的分子になり得るかをさらに評価するために、免疫染色を行い、肺小細胞癌組織19検体のうち17検体でc-Srcの発現を確認することができた。以上よりc-Srcは肺小細胞癌の治療の標的として有用である可能性が示された。

## 結 論

今回の研究は、1) 肺小細胞癌細胞のamrubicin感受性はAktの活性化状態により強く影響を受けること、2) c-Srcを抑制するとAktが抑制されamrubicinの感受性が高まり、すでに臨床使用されているdasatinibがc-SrcとAktを抑制し、同様の効果を発揮すること、3) 肺小細胞癌組織においてc-Srcの発現頻度が高いこと、が明らかとなった。今後の肺小細胞癌の治療において、c-Srcはその分子標的として有望であることが示唆された。