

平成20年2月

# 高田美也子 学位論文審査要旨

主 査	清 水 英 治
副主査	西 連 寺 剛
同	難 波 栄 二

## 主論文

肺癌細胞株におけるEGFR標的治療薬の感受性因子の検討

(著者：高田美也子、千酌浩樹)

平成20年1月 59巻 米子医学雑誌 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## 肺癌細胞株におけるEGFR標的治療薬の感受性因子の検討

上皮成長因子受容体 (EGFR) は肺癌細胞において、しばしば過剰発現を示し肺癌の進展や増悪に重要な役割を果たしている。EGFRは肺癌の分子標的療法薬のターゲットとして非常に魅力的な分子であり、現在EGFR阻害剤が次々と開発されている。しかしながら、これらの薬剤に対して感受性を示す生物学的因子については未だ明らかにされていない。今回の研究の目的は、*EGFR*遺伝子変異を有する肺癌細胞株と遺伝子変異をもたない細胞株に対する低分子EGFRチロシンキナーゼ阻害剤 (gefitinib) と抗EGFR抗体 (cetuximab) の抗腫瘍効果を検討し、さらに抗腫瘍効果を予測し得る分子マーカーの検索を行った。

### 方 法

肺癌細胞19株とEGFR強発現株である類上皮細胞癌1株を対象とした。EGFR発現はフローサイトメトリー法により細胞表面の抗原量をAntibody-Binding Capacityとして定量した。*EGFR*遺伝子変異 (exon 18, 19, 20, 21) と*KRAS*遺伝子変異 (exon 2) についてはPCRダイレクトシーケンス法により、*EGFR*遺伝子コピー数はFISH法により解析した。また、gefitinib、cetuximabに対する細胞増殖抑制効果はWST-8法により検討した。さらに、EGFRとその下流のシグナル伝達分子 (ERK, AKT, STAT3) については*EGFR*遺伝子変異を含む細胞株 (11-18, PC9, PC14, Ma1) と野生型細胞株 (A549) においてウエスタンブロッティング法にて検討した。さらに11-18細胞についてはAKTの遺伝子導入による検討を行った。

### 結 果

Gefitinib感受性と*EGFR*遺伝子変異の間には相関が認められた。また、*EGFR*遺伝子コピー数については野生型*EGFR*を有する細胞において第二の感受性因子であることが分かった。一方、cetuximab感受性には*EGFR*遺伝子変異は必要であるが、それだけでは説明することができなかった。*EGFR*遺伝子変異をもつcetuximab感受性11-18細胞は、リン酸化型AKTがほとんど認められなかった。11-18細胞においてトランスフェクションによりリン酸化AKTを増強させたところ、cetuximabに対し抵抗性を示した。gefitinibはERKとAKT経路両者のリン酸化を有意に抑制するが、cetuximabはERKのリン酸化のみを抑制することが判明した。

## 考 察

低分子チロシンキナーゼ阻害薬gefitinibの感受性決定因子としては*EGFR*遺伝子変異を有することが最も重要であり、*EGFR*遺伝子コピー数の増加がそれに次ぐ規定因子であることが示された。一方、抗*EGFR*モノクローナル抗体cetuximabではこれらの因子だけでは説明できなかった。cetuximabはERK経路は効果的に抑制できるがAKT経路の抑制は十分でないため、AKT経路の活性化がほとんどみられない11-18細胞においてcetuximabによる細胞増殖抑制効果が顕著であった。このことは*EGFR*遺伝子変異に加え、AKT経路の活性化状態がcetuximabの感受性決定因子になることを示唆した。Gefitinib, cetuximabともに*EGFR*を阻害するが、*EGFR*下流の分子に対する効果の相違を示した。Gefitinibの抗腫瘍効果は*EGFR*下流のRas/MAPK経路、PI3-kinase/AKT経路、そしてSTAT経路の恒常的な活性化を全て抑制できるため、変異*EGFR*に依存した。つまり*EGFR*遺伝子変異を有する肺癌細胞を効果的に増殖阻止できると考えられた。一方、cetuximabはERK経路は抑制するがAKT経路の抑制能力は劣るため*EGFR*遺伝子変異を有する細胞を全て増殖阻止できるわけではないが、変異*EGFR*を有し、*EGFR*経路に依存している細胞のうち、AKT経路が活性化されていない細胞には抗腫瘍効果を示すと考えられた。

## 結 論

Gefitinibの感受性を規定する因子としては*EGFR*遺伝子変異が最も重要で、次に*EGFR*遺伝子コピー数の増加であることが確認された。一方、cetuximab感受性は*EGFR*遺伝子変異を持ち、さらにAKTリン酸化の持続的な抑制がなされていることが必要であることが判明した。これらの結果より、今後肺癌患者の治療法を選択する上で有効な臨床的指標となることが示唆された。