

# 学位論文要約

Synergistic cell growth inhibition by the combination of amrubicin and Akt-suppressing agents in *K-ras* mutation-harboring lung adenocarcinoma cells: Implication of EGFR tyrosine kinase inhibitors

(*K-ras*変異陽性肺癌細胞株に対するアムルビシンとAkt活性阻害薬の相乗効果:EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の意義)

(著者:伊藤静香、井岸正、高田美也子、上田康仁、松本慎吾、小谷昌広、武田賢一、泉大樹、阪本智宏、山口耕介、牧野晴彦、唐下泰一、千酌浩樹、清水英治)

平成26年 International Journal of Oncology 44巻 685頁~692頁

近年、肺癌における種々の癌遺伝子変異が同定され、これらを標的とした治療薬が臨床導入されている。*K-ras*変異は肺癌の主要なドライバー変異であるが、活性化K-rasを標的とした治療はない。細胞内シグナル分子の一つであるAktは細胞増殖やアポトーシスに関与し、肺癌の治療標的になると考えられている。また、*K-ras*変異は化学療法抵抗性にも関与するとされているが、*K-ras*変異陽性肺癌においてその発現抑制が化学療法感受性を誘導できるか否か、いまだ明らかではない。本研究では、*K-ras*変異陽性のA549肺腺癌細胞を用いてアムルビシン (AMR) とAkt阻害薬の相乗的腫瘍抑制効果を、さらには上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) とAMRの併用効果を検討した。

## 方法

ヒト肺癌細胞株であり、*EGFR*遺伝子変異を有しないA549細胞、Ma10細胞および*EGFR*遺伝子変異を有するPC9細胞を用いた。これらにAkt阻害剤であるLY294002、非特異的チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステイン、EGFR-TKIであるゲフィチニブ、エルロチニブをAMRと共に72時間添加培養し、細胞増殖抑制効果をMTT法により評価した。併用効果はアイソボログラムあるいはコンビネーションインデックスを用いて解析した。また、各薬剤を添加した際のEGFR、Aktの発現およびリン酸化状態はウエスタンブロッティング法で評価した。アネキシンVの測定はフローサイトメトリーで、K-rasタンパク質の発現抑制はRNAi法にて行った。

## 結果

LY294002はAMRと併用するとA549細胞の増殖を相乗的に抑制したが、シスプラチンなど他

の抗癌薬との併用で相乗効果を示さなかった。LY294002とAMRを併用するとアネキシンVと細胞の結合率が増加した。ゲニステインはLY294002と同様にAkt活性を抑制し、AMR併用で相乗的細胞増殖抑制効果を示した。ゲフィチニブとエルロチニブの細胞増殖抑制効果はEGFR遺伝子変異陰性A549細胞では、変異陽性PC9細胞に比べて乏しかった。しかし、EGFR-TKIによるAktの活性抑制は100nMから1 $\mu$ Mの濃度でも認められ、AMRとの併用で相乗的な細胞増殖抑制効果を示し

た。さらに、RNAi法でK-rasの発現を抑制するとA549細胞でこの相乗効果は減弱し、EGFRおよびAktの活性も抑制されることが明らかとなった。一方、EGFRおよびK-ras遺伝子が野生型であるMa10細胞では、EGFR-TKIを加えてもAkt活性は抑制されず、EGFR-TKIとAMR併用による相乗的な細胞増殖抑制効果は認められなかった。

## 考 察

Akt阻害薬であるLY294002はAMRと併用することで細胞増殖が相乗的に抑制され、アネキシンVの細胞への結合が増加することからアポトーシスの増強の関与が示された。シスプラチンなどとLY294002の併用では相乗効果はみられないことから、Akt抑制による細胞障害性の増強効果は抗癌薬の作用機序により異なると考えられる。一般的にチロシンキナーゼはAktの上流に位置してAkt活性を制御し、K-rasも同じくAktの制御分子であるとされている。今回、非特異的チロシンキナーゼ阻害薬であるゲニステインがAkt活性を阻害し、AMRとの併用で細胞増殖を相乗的に抑制したことにより、K-ras変異を有するA549細胞においてもチロシンキナーゼの抑制がAkt活性の抑制につながり、AMRの細胞障害活性を増強することが示された。さらに、EGFR遺伝子変異を有しないA549細胞でも、臨床的に到達可能な濃度のEGFR-TKIによりAkt活性が抑制され、AMRとの併用で相乗的細胞増殖抑制が認められた。以上より、EGFR変異を有しない肺癌であってもEGFR-TKIによるAktの抑制が可能で、EGFR-TKIとAMRの併用の臨床的有用性が示唆された。以上より、EGFR-TKIとAMRの相乗効果にK-ras遺伝子変異が関与する可能性があり、EGFR-TKIとAMRの併用療法が治療抵抗性のK-ras変異陽性肺癌に対する有望な治療法になると考えられた。

## 結 論

EGFR-TKIなどのAkt阻害活性を有する抗癌薬とAMRの併用は、EGFR遺伝子変異陰性・K-ras遺伝子変異陽性肺癌細胞に対して相乗的抗腫瘍効果を示したことより、この遺伝子型を有する肺癌に対する新たな治療法になると考えられた。