

平成26年 2月

伊藤静香 学位論文審査要旨

主査 松浦達也
副主査 中村廣繁
同 清水英治

主論文

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

参考論文

1. Acute aortic thrombosis during cisplatin based chemotherapy for gastric cancer
(シスプラチンによる化学療法中に腹部大動脈血栓症を来した胃癌の1例)
(著者:伊藤静香、中村由貴、能美隆啓、佐々木祐一郎)
平成25年 Internal Medicine 52巻 973頁～975頁

学 位 論 文 要 旨

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)

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 100 nM から 1 μ 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。