

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 野寄 幸一郎
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 637 号
学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 DDX3X Induces Primary EGFR-TKI Resistance Based on Intratumor Heterogeneity in Lung Cancer Cells Harboring EGFR-Activating Mutations
(DDX3X は EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞において、腫瘍内不均一性に基づく EGFR-TKI 一次耐性を誘発する)

論文審査委員 主査 教授 西條 康夫
副査 教授 成田 一衛
副査 准教授 増子 正義

博士論文の要旨

【背景】EGF レセプター遺伝子変異肺腺癌は、EGFR からのシグナルに依存するため EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib, erlotinib に高い感受性を有している。臨床においても短期間で速やかな腫瘍縮小、時に年余に渡る長期の奏効期間を示しているが、治癒に至ることはなく必ず再燃する。再燃時に獲得した耐性化機序については、T790M などの付加的遺伝子変異が重要であることが明らかとなっているが、長期の奏効期間を生かし続ける機序はほとんど解明されていない。申請者らは、マウスメラノーマ癌幹細胞のプロテオーム解析により、DDX3X が癌幹細胞特異的に発現されていることを発見した。DDX3X は ATP 依存性 RNA helicase 活性を有しており、mRNA, miRNA を含んだ RNA 代謝に深く関与していることが知られている。EGFR 遺伝子変異肺癌の癌幹細胞様形質獲得、付加的遺伝子変異によらない EGFR-TKI 耐性に DDX3X が関わっているか検討した。【方法・結果】PC9 は EGFR exon19 del を有する肺腺癌株化細胞で、DDX3X を transfect した細胞を PC9-A1 cell と名付け使用した。A1 cell は、いわゆる山中 factor のひとつであり、幹細胞機能に重要な Sox2 発現が誘導されていた。A1 cell は、parental と比較し接着非依存性に増殖する細胞の割合が増加し、一部には tumor sphere 様の細胞集塊を形成していた。次に、DDX3X と EGFR signal の関係を調べたところ PC9 は変異 EGFR が ligand 非存在下でも active formation をとるため、parental, mock cell では EGF 非存在下においても EGFR がリン酸化されていた。A1 cell では EGFR のリン酸化がほとんど認められなかった。さらに、DDX3X を knockdown することで、EGFR リン酸化は、再び parental cell と同等な状態に戻ったことを確認した。EGF 存在下で Parental, mock では EGFR リン酸化は促進されるが、A1 cell では EGF を加えても EGFR のリン酸化が認められなかった。次に、EGFR-TKI に対する感受性について検討した。Erlotinib を様々な濃度に晒し、トリパンブルーを用いて実際に生細胞、死細胞を肉眼的に cell count を 3 日間行った。Parental では、20nM 以上において、live cell の減少、dead cell の増加は明らかであった。一方、A1 cell では 20nM 以降において細胞増殖は抑制されるが明らかな生細胞の減少は認めず、さらに dead cell に関しては 2000nM でさえも増加は認められなかった。これ

らの結果は、MTT assay やPI 染色後のFACS 解析でも同様の結果が得られた。DDX3X 強制発現細胞が接着非依存的増殖を示すことから、PC9 親株細胞にわずかに存在する非接着細胞について検討を加えた。PC9 の non-adherent の細胞群を western blot で解析したところ、A1 cell と同等の DDX3X が発現が確認された。また、EGFR リン酸化についても non-adherent cell ほとんど認められず、A1 cell と同様の振る舞いを示した。stem cell のマーカーである CD44, ALDH についても検討した。Adherent cell に関しては parental は 0.47%、A1 cell では 15.8% と明らかな差を認めていた。一方、non-adherent では 23.8%、23% とおおよそ同じ割合を示していた。Cancer stem cell マーカーの一つと考えられている CD44 発現を調べたところ、non-adherent cell 分画には CD44 を極めて強く発現している細胞が存在することが判明した。以上から、parental の中でも、DDX3X が強発現しており、stem cell marker が陽性の細胞群がわずかながらに存在していると考えられた。また、PC9 を erlotinib に晒し、その濃度を数か月にわたり徐々に濃くすることで、erlotinib 耐性細胞を作製したところ、この耐性細胞は non-adherent cell や A-1 cell と同等に DDX3X を強く発現していることが判明した。【考察・結論】 DDX3X は stem cell 様の性質をもち EGFR-TKI に対する耐性にも関与しており、今後治療のターゲットとなり得ると考えられた。

審査結果の要旨

EGF レセプター遺伝子変異肺腺癌は、EGFR からのシグナルに依存するため EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib, erlotinib に高い感受性を有しているが、再燃する。耐性化機序については付加的遺伝子変異が重要であるが、長期の奏効期間を生存し続ける機序は解明されていない。申請者らは、マウスメラノーマ癌幹細胞のプロテオーム解析により、DDX3X が癌幹細胞特異的に発現されていることを発見し、EGFR-TKI 耐性に DDX3X が関わっているか検討した。

PC9 肺腺癌株化細胞に DDX3X を導入し、A1 cell とした。

A1 cell は接着非依存性に増殖する細胞が増加し、細胞集塊を形成した。A1 cell で EGFR のリン酸化が抑制されており、DDX3X を knockdown すると、parental cell と同等な状態に戻った。A1 cell は EGFR-TKI に抵抗性であり、PC9 の non-adherent の細胞群を解析したところ、A1 cell と同等の DDX3X 発現が確認された。PC9 を erlotinib に晒し、その濃度を数か月にわたり徐々に濃くすることで、erlotinib 耐性細胞を作製したところ、A-1 cell と同等に DDX3X を強く発現していることが判明した。

以上、DDX3X 発現は EGFR-TKI に対する耐性に関与していることを明らかにし、今後治療のターゲットとなり得ることを示した点に、学位論文としての価値を認める。