

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	石川 大輔
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第602号
学位授与の日付	平成26年3月24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	mTOR Inhibitors Control the Growth of EGFR Mutant Lung Cancer Even after Acquiring Resistance by HGF (mTOR 阻害薬は HGF によって耐性を獲得した EGFR 変異陽性肺癌の発育を制御する)
論文審査委員	主査 教授 西條 康夫 副査 教授 土田 正則 副査 教授 成田 一衛

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)の活性化変異を有する非小細胞肺癌に対する、ゲフィチニブ・エルロチニブといった EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性獲得が、現在の肺癌治療に於いて重要な問題となっている。耐性機序の一つに、肝細胞増殖因子(HGF)によって起こる Met 蛋白質(MET)の活性化が挙げられ、HGF を介して EGFR とは別の経路からの細胞増殖シグナルを伝えることによりがん細胞の増殖・生存を促すことが知られている。また、HGF は腫瘍において血管内皮増殖因子(VEGF)の産生亢進を介して血管新生を促すことも示されており、この腫瘍血管新生も治療への耐性を促していると考えられている。

哺乳類ラパマイシン標的蛋白(mTOR)は、EGFR 及び MET、さらには VEGF をなどのチロシンキナーゼから始まる細胞増殖シグナル伝達経路の下流にあるセリン/スレオニンキナーゼである。これを阻害する mTOR 阻害薬は、様々な悪性腫瘍における治療薬になることが期待され、既に国内では腎細胞癌と腓神経内分泌腫瘍にて、国外では乳癌に対する治療薬として用いられている。また mTOR 阻害薬は VEGF の産生を抑制することが知られ、腫瘍血管新生の阻害からも抗腫瘍効果を示すものと考えられている。

#### 方法

本研究では、既に国内の臨床にて使用可能である mTOR 阻害薬のエベロリムスとテムシロリムスを、HGF によって EGFR-TKI に対する抵抗性を獲得した肺癌細胞株に対し用いた。in vitro にては HGF を添加した培地、および HGF を自己産生する肺癌細胞株へ、in vivo では HGF を自己産生する肺癌細胞株のマウス異種移植モデルを用いて、それぞれにおける mTOR 阻害薬の効果を検証した。手法は MTT アッセイによるバイアビリティ、ウエスタンブロットによるシグナル伝達経路への影響、in vivo での腫瘍の成長および腫瘍血管新生の程度、腫瘍からの VEGF 産生への変化と正常血管内皮細胞への影響をそれぞれ検証した。

#### 結果

申請者らは前述の2剤の mTOR 阻害薬を用いて、EGFR 遺伝子変異肺癌細胞株である PC-9 と HCC827 のバイアビリティを抑制することを示した。さらに同薬剤を用いて PC-9 に対し、mTOR のさらに下流のシグナ

ル伝達分子である 70kDa リボソーム S6 キナーゼ (p70S6K) および真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (4EBP1) のリン酸化を阻害することをウエスタンブロットにて示した。そして、これらの効果は HGF によって耐性が誘導されても同様の効果を示すことを明らかにした。

マウスを用いた PC-9 による異種移植モデルにおいて、テムシロリムスは腫瘍増大を抑制する効果を示した。そして EGFR-TKI に耐性を示す HGF 高発現 PC-9 細胞株の異種移植モデルでも同様の効果を示した。またウエスタンブロットにて p70S6K のリン酸化を抑制することも示し、免疫染色にても細胞増殖が抑制されていることを示した。

また *in vitro* において PC-9 にテムシロリムスを用いることで VEGF 産生を抑制し、HGF によって VEGF の産生が亢進しても同様の効果を示すことが明らかとなった。また、血管内皮細胞株 HMVEC は VEGF により増殖が促されるが、この増殖もテムシロリムスにより抑制されることを示した。また上述の異種移植モデルについてもテムシロリムスを用いてマウスの血管新生が抑制されることを示した。

#### 考察と結論

mTOR 阻害薬は HGF により EGFR-TKI への耐性を獲得した EGFR 陽性肺癌に対し、腫瘍細胞増殖を直接的に抑制することを示した。また腫瘍血管に対しては、HGF により促される腫瘍からの VEGF 産生を抑制することと、VEGF によって促進された血管内皮細胞の増殖を阻害する 2 つの機序からその血管新生を抑えることが示され、これは抗腫瘍効果に繋がるものと考えられた。

現在のところ、mTOR 阻害薬による肺癌の臨床試験は、有効性を示したものは無い。しかし HGF 産生によって耐性を獲得した EGFR 遺伝子変異を有する肺癌症例に絞った場合、mTOR 阻害薬の効果を期待できるものと考えられた。

#### 審査結果の要旨

EGFR 活性化変異非小細胞肺癌による EGFR-TKI に対する耐性機序の一つに、HGF による MET の活性化がある。HGF を介して EGFR とは別の経路から細胞増殖シグナルを伝え、また VEGF を介して血管新生を促す。mTOR は、EGFR、MET、VEGF の下流にあるセリン/スレオニンキナーゼであり、これを阻害する mTOR 阻害薬は、様々な悪性腫瘍における治療薬になることが期待されている。本研究では、HGF 誘導 EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株 PC-9 と HCC827 に対し、mTOR 阻害薬を用い解析した。HGF 誘導 EGFR 耐性 PC-9 に対し、mTOR 阻害剤は親株と同様の増殖抑制およびシグナル伝達抑制効果を示した。耐性 PC-9 細胞の異種移植モデルでも親株同様の増殖抑制効果を示した。HGF による PC-9 からの VEGF 産生促進は mTOR 阻害剤で阻害され、血管内皮細胞株 HMVEC の増殖も抑制されることを示した。腫瘍血管に対し mTOR 阻害剤は腫瘍からの VEGF 産生抑制と血管内皮細胞の増殖を阻害する 2 つの機序から血管新生を抑える。HGF 産生によって耐性を獲得した EGFR 遺伝子変異肺癌症例に絞った場合、mTOR 阻害薬の効果を期待できるものと考えられた。HGF 誘導 EGFR-TKI 耐性肺癌に対して、mTOR 阻害剤の有効性を初めて示した研究であり、学位論文に十分値する。