

学位論文審査結果の報告書

氏 名 渡邊 諭美

生 年 月 日 昭和62年1月7日

本 籍 (国 籍) 大阪府

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第1248号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規程第5条該当

論 文 題 目


T790M-selective EGFR-TKI combined with dasatinib as an optimal strategy for overcoming EGFR-TKI resistance in T790M-positive non-small cell lung cancer


(T790M陽性EGFR-TKI耐性肺癌細胞株における第三世代EGFR-TKIとSrc阻害薬ダサチニブの併用効果の検討)

学位論文受理日 2017年 11月 10日


学位論文審査終了日 2018年 1月 18日

審 査 委 員 (主 査) 西尾 和人 

(副主査) 高橋 菜夫 

(副主査) 松村 到 

(副 査) 

指 導 教 員 中川 和孝 

論文内容の要旨

【目的】

Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者における *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (*EGFR*-TKIs) への耐性獲得機序の約半数は T790M 変異によるものである。この T790M 変異を伴う *EGFR*-TKI 耐性を獲得した患者には T790M 遺伝子変異特異的 *EGFR*-TKI が効果を示す。しかしその効果は限定的であり、それにはおそらくアポトーシス耐性が関与している。我々は以前に T790M 存在下における co-oncogenic driver として Src ファミリーキナーゼが重要であり、Src 阻害薬であるダサチニブは T790M 陽性肺癌細胞株において非可逆的 *EGFR*-TKI および前臨床で使用されている T790M 選択的 *EGFR*-TKI の効果を増強させることを見出した。本研究では我々はダサチニブと臨床応用されている T790M 選択的 *EGFR*-TKI の併用効果について T790M 陽性、陰性肺癌細胞株を用いて評価した。

【方法】

EGFR 遺伝子変異陽性 T790M 陰性非小細胞肺癌細胞株 PC9 および、PC9 に第一世代 *EGFR*-TKI であるゲフィチニブを恒常的に暴露させることにより樹立された *EGFR* 遺伝子変異陽性 T790M 陽性非小細胞肺癌細胞株 PC9GR、*EGFR* 遺伝子変異陽性 T790M 陽性非小細胞肺癌細胞株 (*de novo* 耐性) H1975 を用いて cell viability アッセイ、ウェスタンブロット、アネキシンを用いたフローサイトメトリーを行い、臨床応用されている T790M 選択的 *EGFR*-TKI とダサチニブの併用効果について評価した。また、国内において既に保険承認を得ている T790M 選択的 *EGFR*-TKI であるオシメルチニブとダサチニブの併用効果については H1975 xenograft モデルを用いて *in vivo* における抗腫瘍効果も評価した。

【結果】

Cell viability アッセイでは T790M 陽性細胞株において T790M 選択的 *EGFR*-TKI とダサチニブの間に相乗効果を認めることが確認された。ウェスタンブロットでは T790M 選択的 *EGFR*-TKI、ダサチニブそれぞれ単剤では Src、Akt、Erk のいずれかの活性化が維持されていたのに対し、T790M 選択的 *EGFR*-TKI とダサチニブの併用においてはすべてが同時に阻害されていた。ダサチニブはさらに T790M 陽性細胞株において T790M 選択的 *EGFR*-TKI によるアポトーシスを増強させることがアネキシンを用いたフローサイトメトリーにより確認された。この事象は抗アポトーシス Bcl-2 ファミリーである Bcl-xL の発現低下と関連していた。さらに既に保険承認を得ている T790M 選択的 *EGFR*-TKI、オシメルチニブとダサチニブの併用は H1975 を用いた T790M 陽性 xenograft マウスモデルにおいて Bcl-xL の発現低下とアポトーシスの増加を伴って腫瘍増殖を抑制することが確認された。

【考察】

T790M 選択的 *EGFR*-TKI とダサチニブの併用は *in vitro*、*in vivo* において相乗効果をもたらした。この併用療法におけるアポトーシスの促進および Bcl-xL の発現低下は、T790M 陽性細胞株に本来備わるアポトーシス耐性の存在を示唆している。T790M 選択的 *EGFR*-TKI による Akt、Erk 経路の遮断に加え、ダサチニブによる Src 経路の遮断を行うことが Bcl-xL の発現を抑制しアポトーシスを促進していることが考えられた。

【結論】

本研究は T790M 陽性非小細胞肺癌細胞株におけるアポトーシス耐性に Bcl-xL が重要な役割を担っており、臨床開発されている T790M 選択的 *EGFR*-TKI とダサチニブの併用は T790M 陽性 *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者において第一世代 *EGFR*-TKI に対する耐性克服への戦略となる可能性を示唆している。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2017年8月24日 公 表 (DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0351)	博士学位論文 Molecular cancer therapeutics
	T790M-selective EGFR-TKI combined with dasatinib as an optimal strategy for overcoming EGFR-TKI resistance in T790M-positive non-small cell lung cancer	
	全 文	2017年8月24日 online掲載

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】：Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者におけるEGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) への耐性獲得機序の約半数はT790M変異によるものである。このT790M変異を伴うEGFR-TKI耐性を獲得した患者にはT790Mアミノ酸レベルなので変異特異的EGFR-TKIが効果を示す。しかしその効果は限定的であり、それにはおそらくアポトーシス耐性が関与している。申請者らは以前にT790M存在下におけるco-oncogenic driverとしてSrcファミリーキナーゼが重要であり、Src阻害薬であるダサチニブはT790M陽性肺癌細胞株において非可逆的EGFR-TKIおよび前臨床で使用されているT790M選択的EGFR-TKIの効果を増強させることを見出した。本研究で申請者らはダサチニブと臨床応用されているT790M選択的EGFR-TKIの併用効果についてT790M陽性、陰性肺癌細胞株を用いて評価した。

【方法】：EGFR遺伝子変異陽性T790M陰性非小細胞肺癌細胞株PC9および、PC9に第一世代EGFR-TKIであるゲフィチニブを恒常的に暴露させることにより樹立されたEGFR遺伝子変異陽性T790M陽性非小細胞肺癌細胞株PC9GR、EGFR遺伝子変異陽性T790M陽性非小細胞肺癌細胞株 (de novo耐性) H1975を用いてcell viabilityアッセイ、ウェスタンブロット、アネキシンを用いたフローサイトメトリーを行い、臨床応用されているT790M選択的EGFR-TKIとダサチニブの併用効果について評価した。また、国内において既に保険承認を得ているT790M選択的EGFR-TKIであるオシメルチニブとダサチニブの併用効果についてはH1975 xenograftモデルを用いてin vivoにおける抗腫瘍効果も評価した。

【結果】：Cell viabilityアッセイではT790M陽性細胞株においてT790M選択的EGFR-TKIとダサチニブの間に相乗効果を認めることが確認された。ウェスタンブロットではT790M選択的EGFR-TKI、ダサチニブそれぞれ単剤ではSrc、Akt、Erkのいずれかの活性化が維持されたのに対し、T790M選択的EGFR-TKIとダサチニブの併用においてはすべてが同時に阻害されていた。ダサチニブはさらにT790M陽性細胞株においてT790M選択的EGFR-TKIによるアポトーシスを増強させることがアネキシンを用いたフローサイトメトリーにより確認された。この事象は抗アポトーシス因子Bcl-2ファミリーであるBcl-xLの発現低下と関連していた。さらに既に保険承認を得ているT790M選択的EGFR-TKI、オシメルチニブとダサチニブの併用はH1975を用いたT790M陽性xenograftマウスモデルにおいてBcl-xLの発現低下とアポトーシスの増加を伴って腫瘍増殖を抑制することが確認された。

【考察】：T790M選択的EGFR-TKIとダサチニブの併用はin vitro, in vivoにおいて相乗効果をもたらした。この併用療法におけるアポトーシスの促進およびBcl-xLの発現低下は、T790M陽性細胞株に本来備わるアポトーシス耐性の存在を示唆している。T790M選択的EGFR-TKIによるAkt, Erk経路の遮断に加え、ダサチニブによるSrc経路の遮断を行うことがBcl-xLの発現を抑制しアポトーシスを促進していることが考えられた。

【結論】：本研究はT790M陽性非小細胞肺癌細胞株におけるアポトーシス耐性にBcl-xLが重要な役割を担っており、臨床開発されているT790M選択的EGFR-TKIとダサチニブの併用はT790M陽性EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者において第一世代EGFR-TKIに対する耐性克服への戦略となる可能性を示唆している。

本研究はT790M陽性EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に対して T790M選択的 EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の効果が限定的であるという背景にT790M陽性肺癌細胞のアポトーシス耐性が存在すること、またダサチニブと T790M選択的 EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の併用が臨床においても患者の生存期間延長に寄与する可能性があることを示唆するものである。本研究はよって今後臨床開発につながる重要な知見であり、学位論文として価値のあるものとする。

2) 審査結果の要旨

本論文に対する最終試験は、平成29年12月27日午後5時から研究棟6階会議室で実施された。

申請者は臨床で多忙である中で少しずつ研究成果を積み上げ、臨床的に有意義な研究を行った。計画立案から方法の確立、実際の実験、実験結果の解釈などを自ら行い論文作成したものである。T790M陽性となったEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に対しては有効な治療が限られている。その中でT790M選択的EGFR-TKIとDasatinibの併用はより高い抗腫瘍効果を期待できる治療法であり、今後の肺癌治療の向上に寄与すると考えられ本研究を行った申請者に敬意を表したい。

最終試験では発表者が本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察を口頭にて発表した。それに対して私、西尾の司会進行により副主査である高橋、松村両教授と共に学位審査を行った。

論文審査結果の要旨

高橋教授からは次の質問があった。①Cell viability assayで示されている薬剤の sigmoid curveは急峻でありこのような場合は臨床で使用する際毒性が懸念されるがそれについてどう考えるべきか、②OsimertinibとDasatinibを併用することによって耐性を防ぐことができるのか。また松村教授からは次の質問があった。①これまでDasatinibは GefitinibやErlotinibとの併用での臨床試験では芳しい結果を出せていないが、OsimertinibとDasatinibの併用は本当に臨床において効果が期待できるのか、②肺癌領域でもRASやBRAFのmutationがあると思うがそのような下流シグナルの変異がある場合には上流を抑制しても効果がないだろうと考えられる。今回の研究ではそのような可能性はないか、③実験で使用しているDasatinibの使用濃度は実際に臨床で使用する際の血中濃度と整合性は取れているのか。次いで私から次のような質問をした。①Dasatinibのmajorな毒性は何か、また薬剤がsynergisticであった場合毒性もsynergisticになることがあるがその点での懸念はないか②アポトーシスでPARPのcleavageが見られているがその上流で抑制が起こっているのか③メカニズムの詳細は不明ということであるが何か推察するところはあるか。最後に傍聴席よりOsimertinibは現在一次治療として使用されるようになったがこの研究の立ち位置はどのように考えればよいかと質問があった。

申請者はこれらの質問に対して既知の報告をふまえ、具体的な例を挙げながら適切に答えた。論文の内容、質疑応答からEGFR陽性非小細胞肺癌に対する知識、実験手技の技量についても卓越したものを持つことが確認された。

したがって、主査・副主査が合議の上、提出された学位論文が確かに渡邊諭美氏の研究成果であること、同氏が腫瘍内科医としての技量と当該分野の研究を指導する能力をもつことを確認し、最終試験を合格とした。

3) 最終試験の結果：
合格

4) 学位授与の可否：
可