

論文内容の要旨

氏名	おがもとくに お 岡本邦男		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	医第1057号		
学位授与の日付	平成23年3月22日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations (EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるサバイビンの役割)		
論文審査委員 (主査)	教授	中川和彦	
	(副主査)	教授	松村到
	(副主査)	教授	義江修

【目的】

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKIs) であるゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌患者において優れた抗腫瘍効果を発揮することが臨床において確認されており、in vitro ではゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株にアポトーシスを引き起こすことが報告されている。しかし、そのアポトーシスのメカニズムについての検討は充分になされていない。本研究では EGFR 遺伝子変異を有する、または有さない非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株を用いて、ゲフィチニブによって生じるアポトーシス関連蛋白の発現変化を検討した。

【方法】

ゲフィチニブがアポトーシス関連蛋白に与える影響を Westernblot 法で、アポトーシスを Annexin 染色法とフローサイトメトリーを用いて検討した。さらに、サバイビンの高発現株を樹立することでサバイビンの発現変化がゲフィチニブによって生じるアポトーシスに与える影響を検討した。

【結果】

ゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株においてサバイビンの発現を抑制したが、EGFR 遺伝子変異陰性 NSCLC 細胞株ではこの変化は生じなかった。このゲフィチニブによって生じるサバイビンの発現低下は EGFR-AKT 経路を介して起こっていることを確認した。EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株にサバイビンを高発現させた株を樹立したところ、サバイビン高発現株においてはゲフィチニブの抗腫瘍効果が減弱することを in vitro と in vivo で証明した。また、樹立したサバイビン高発現株に対して、アポトーシス関連蛋白の1つである BIM を siRNA を用いて発現を抑制することで、ゲフィチニブによって生じるこのアポトーシスをさらに抑制した。

【考察】

EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株において、EGFR-TKIs は EGFR のリン酸化を抑制し、その下流に存在する AKT 経路と ERK 経路を阻害することが知られているが、その詳細なメカニズムに関する検討は少なく、AKT、ERK の抑制がどのような役割を持っているかは不明な点が多い。今回の研究からゲフィチニブによるサバイビンの発現低下は AKT 経路を介しており、ゲフィチニブによって引き起こされるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを示した。現在、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する EGFR-TKIs は非常に有効な治療法であることが証明されているが、一方で de novo 耐性や獲得耐性が臨床的にも問題となっている。EGFR-TKIs の引き起こすアポトーシスマカニズムを詳細に調べることは、その耐性メカニズムの解明や、耐性に対する新たな治療戦略の開発に有用であると考えられる。

【結論】

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌株においてゲフィチニブを暴露した際に生じるサバイビンの発現低下は EGFR-AKT 経路を介しており、ゲフィチニブによって引き起こされるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしており、この AKT-サバイビン経路と ERK-BIM 経路はそれぞれ独立して機能している。

論文審査結果の要旨

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2010年 12 月 15 日 公表予定	出版物名 Cancer Research Vol. 70 No. 24
	公 表 内 容	2010年 12 月 15 日 発行予定
	全 文	

目的

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKIs) であるゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌患者において優れた抗腫瘍効果を発揮することが臨床において確認されており、in vitro ではゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株にアポトーシスを引き起こすことが報告されている。Inhibitor of apoptosis protein (IAP) はアポトーシスの実行因子であるカスパーゼを抑制することによりアポトーシスを抑制する機能を持っているが、この IAP と EGFR-TKIs の引き起こすアポトーシスの関連についてはこれまでに報告がなされておらず、そのアポトーシスのメカニズムについての検討は充分になされていない。本研究では EGFR 遺伝子変異を有する、または有さない非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株を用いて、ゲフィチニブによって生じるアポトーシスを IAP の発現変化を中心として検討した。

方法

ゲフィチニブがアポトーシス関連蛋白に与える影響を Western blot 法で、アポトーシスを Western blot 法、Annexin 染色法とフローサイトメトリーを用いて検討した。さらに、small interfering RNA 法 (siRNA) を用いてサバイビンを特異的に発現させることと、ウイルスベクターを用いてサバイビンの高発現株を樹立することでサバイビンの発現変化がゲフィチニブによって生じるアポトーシスに与える影響を検討した。また、サバイビンの発現低下がどのような経路で生じるのかを検討し、BCL 蛋白の 1 つである BIM とサバイビンのゲフィチニブによるアポトーシスへの関与を検討した。

## 結果

ゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株においてサバイビンの発現を抑制したが、EGFR 遺伝子変異陰性 NSCLC 細胞株ではこの変化は生じなかった。このゲフィチニブによって生じるサバイビンの発現低下は EGFR-PI3K-AKT 経路を介して起こっていることを確認した。siRNA 法を用いてサバイビンの発現を抑制したところ、細胞にアポトーシスを引き起こすことを確認した。また、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株にサバイビンを高発現させた株を樹立したところ、サバイビン高発現株においてはゲフィチニブの抗腫瘍効果が減弱することを *in vitro* と *in vivo* で証明した。また、樹立したサバイビン高発現株に対して、アポトーシス関連蛋白の 1 つである BIM を siRNA 法を用いて発現抑制することで、ゲフィチニブによって生じるこのアポトーシスをさらに抑制した。

## 考察

EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 株において、EGFR-TKIs は EGFR のリン酸化を抑制し、その下流に存在する PI3K-AKT 経路と MEK-ERK 経路を阻害することが知られているが、その詳細なメカニズムに関する検討は少なく、AKT、ERK の抑制がどのような役割を持っているかは不明な点が多い。今回の研究からゲフィチニブによるサバイビンの発現低下は PI3K-AKT 経路を介しており、ゲフィチニブによって引き起こされるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを示した。この PI3K-AKT-サバイビンの経路と MEK-ERK-BIM の経路は EGFR-TKIs のアポトーシスにそれぞれ独立して関与していることを示した。現在、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する EGFR-TKIs は非常に有効な治療法である

ことが証明されているが、一方で *de novo* 耐性や獲得耐性が臨床的にも問題となっている。EGFR-TKIs の引き起こすアポトーシスメカニズムを詳細に調べることは、その耐性メカニズムの解明や、耐性に対する新たな治療戦略の開発に有用であると考えられる。よって本研究は、学位論文として価値のあるものと考ええる。