

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

令和 5 年 3 月

近畿大学大学院

医学研究科

学位論文審査結果の報告書

氏 名 藤原 亮介

生 年 月 日 昭和 59 年 4 月 29 日

本 籍 (国 籍) 高知県

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 1394 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

Chlorpromazine cooperatively induces apoptosis with tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutated lung cancer cell lines and restores the sensitivity to gefitinib in T790M-harboring resistant cells

(クロルプロマジンは EGFR 変異肺癌細胞株に対してチロシンキナーゼ阻害薬によるアポトーシスを増強しT790M を有する耐性株のゲフィチニブに対する感受性を回復させる)

学位論文受理日 2022年 11月 12日

学位論文審査終了日 2023年 1月 18日

審 査 委 員 (主 査)

西尾 邦人

(副主査)

松本 久子

(副主査)

中川 和彦

指 導 教 員

松村 到

論文内容の要旨

【目的】

肺癌などの発症には受容体チロシンキナーゼ (RTK) の体細胞遺伝子変異が深く関与しており、変異 RTK を標的としたチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が高い有効性を示している。しかしながら、TKI 単剤では多くの例で耐性が出現し再発することから、新たな治療法の開発が求められている。当教室では、抗精神病薬クロルプロマジン (CPZ) が RTK の細胞内局在を変化させることで、RTK 変異を有する急性骨髄性白血病細胞の増殖、生存を阻害することを報告した。本研究は、この効果が epidermal growth factor receptor (EGFR) に変異を有する固形腫瘍においてもみられるかを検証するとともに、その分子機構を解析することで、TKI 耐性克服のための治療戦略を確立することを目的に行った。

【方法】

本研究ではゲフィチニブ (GEF) 感受性の活性化型変異 EGFR (exon9 欠失) を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) の細胞株 Pc9、HCC827 とそれぞれの GEF 耐性亜株である、Pc9ZD (EGFR T790M 変異付加)、Met HCC827GR (Met 増幅) を用いた。各々を CPZ、GEF 単独、併用下で培養し、増殖に及ぼす影響を ATP アッセイにより評価した。同様に T790M 変異にも有効なオシメルチニブの阻害作用に CPZ が及ぼす影響について検討した。さらに EGFR の下流分子の阻害薬であるトラメチニブ (MEK 阻害剤)、ダブラフェニブ (RAF 阻害剤)、エベロリムス (mTOR 阻害剤) と CPZ との併用による増殖阻害について解析した。また、CPZ が EGFR のシグナル伝達に及ぼす影響について、CPZ 添加前後の EGFR 及び ERK、AKT のリン酸化変化を Western blotting 法にて解析した。また、CPZ 添加前後の EGFR の細胞内局在変化を免疫蛍光染色法により解析した。

【結果】

CPZ は、Pc9、Pc9ZD の増殖を用量依存的に阻害し、その阻害効果に明らかな差は認めなかった。GEF は Pc9 の増殖を阻害したが、Pc9ZD、HCC827GR の増殖を阻害しなかった。一方、CPZ 存在下では両耐性株ともに GEF 感受性が回復した。オシメルチニブ、CPZ はそれぞれ単独で Pc9ZD のアポトーシスを誘導したが、両者の併用によりその効果は増強した。CPZ 存在下で Pc9ZD を培養した際には、EGFR のリン酸化に変化はなかったが、ERK および AKT のリン酸化は強く抑制された。トラメチニブ、ダブラフェニブは、CPZ との併用効果を示さなかったが、エベロリムスは CPZ と併用することで強く増殖を阻害した。CPZ 添加前 EGFR は主に核周囲に局在し、後期エンドソームマーカー Rab11 と強く共局在していたが、CPZ 処理後は、EGFR は細胞質内に不均等に散在し、初期エンドソームマーカー Rab5、EEA1 と強く共局在していた。

【考察】

CPZ は、EGFR のリン酸化を抑制することなく、下流の ERK、AKT のリン酸化を抑制していること、mTOR 阻害剤と CPZ を併用することでより強く増殖が阻害されたことから、CPZ は既存の TKI と異なるメカニズムで NSCLC 細胞株の増殖を抑制することが示唆された。また、CPZ は EGFR の初期-後期エンドソーム間の細胞内輸送を阻害している可能性が示唆された。

【結論】

CPZ は EGFR 変異を有する NSCLC に対して、EGFR-TKI とは異なる新たな作用メカニズムにより抗腫瘍効果をもたらすだけでなく、TKI 耐性を克服する上でも有用な薬剤であると考えられた。

| | 公表年月日 | 出版物の種類および名称 |
|-----------|--|--|
| 博士論文の印刷公表 | 2022年8月10日 公表 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.08.010) | 博士学位論文 Biochemical and Biophysical Research Communications 第 626 号 156~166 頁 |
| | 全文 | Chlorpromazine cooperatively induces apoptosis with tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutated lung cancer cell lines and restores the sensitivity to gefitinib in T790M-harboring resistant cells |

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】

肺癌などの発症には受容体チロシンキナーゼ (RTK) の体細胞遺伝子変異が深く関与しており、変異RTKを標的としたチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が高い有効性を示している。しかしながら、TKI単剤では多くの例で耐性が出現し再発することから、新たな治療法の開発が求められている。当教室では、抗精神病薬クロルプロマジン (CPZ) がRTKの細胞内局在を変化させることで、RTK変異を有する急性骨髄性白血病細胞の増殖、生存を阻害することを報告した。本研究は、この効果がepidermal growth factor receptor (EGFR) に変異を有する固形腫瘍においてもみられるかを検証するとともに、その分子機構を解析することで、TKI耐性克服のための治療戦略を確立することを目的に行った。

【方法】

本研究ではゲフィチニブ (GEF) 感受性の活性化型変異EGFR (exon9欠失) を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) の細胞株Pc9、HCC827とそれぞれのGEF耐性亜株である、Pc9ZD (EGFR T790M変異付加)、Met HCC827GR (Met増幅) を用いた。各々をCPZ、GEF単独、併用下で培養し、増殖に及ぼす影響をATPアッセイにより評価した。同様にT790M変異にも有効なオシメルチニブの阻害作用にCPZが及ぼす影響について検討した。さらにEGFRの下流分子の阻害薬であるトラメチニブ (MEK阻害剤)、ダブラフェニブ (RAF阻害剤)、エベロリムス (mTOR阻害剤) とCPZとの併用による増殖阻害について解析した。また、CPZがEGFRのシグナル伝達に及ぼす影響について、CPZ添加前後のEGFR及びERK、AKTのリン酸化変化をWestern blotting法にて解析した。また、CPZ添加前後のEGFRの細胞内局在変化を免疫蛍光染色法により解析した。

【結果】

CPZは、Pc9、Pc9ZDの増殖を用量依存的に阻害し、その阻害効果に明らかな差は認めなかった。GEFはPc9の増殖を阻害したが、Pc9ZD、HCC827GRの増殖を阻害しなかった。一方、CPZ存在下では両耐性株ともにGEF感受性が回復した。オシメルチニブ、CPZはそれぞれ単独でPc9ZDのアポトーシスを誘導したが、両者の併用によりその効果は増強した。CPZ存在下でPc9ZDを培養した際には、EGFRのリン酸化に変化はなかったが、ERKおよびAKTのリン酸化は強く抑制された。トラメチニブ、ダブラフェニブは、CPZとの併用効果を示さなかったが、エベロリムスはCPZと併用することで強く増殖を阻害した。CPZ添加前EGFRは主に核周囲に局在し、後期エンドソームマーカーRab11と強く共局在していたが、CPZ処理後は、EGFRは細胞質内に不均等に散在し、初期エンドソームマーカーRab5、EEA1と強く共局在していた

【考察】

CPZは、EGFRのリン酸化を抑制することなく、下流のERK、AKTのリン酸化を抑制していること、mTOR阻害剤とCPZを併用することでより強く増殖が阻害されたことから、CPZは既存のTKIと異なるメカニズムでNSCLC細胞株の増殖を抑制することが示唆された。また、CPZはEGFRの初期-後期エンドソーム間の細胞内輸送を阻害している可能性が示唆された。

【結論】

CPZはEGFR変異を有するNSCLCに対して、EGFR-TKIとは異なる新たな作用メカニズムにより抗腫瘍効果をもたらすだけでなく、TKI耐性を克服する上でも有用な薬剤であると考えられた。

2) 審査結果の要旨

藤原亮介氏の博士学位論文に対する最終試験は、2022年12月23日17時から本学大講堂で実施された。まず、藤原氏から本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察、および今後の展開が発表され、これに対して副主査である中川和彦、松本久子両教授、そして主査である西尾教授からいくつかの質問がなされた。

中川教授は、まず肺がん治療においてTKI耐性の克服は喫緊の課題であり、それに取り組んだ本研究の意義は大きいと感想を述べられた上で、研究に使用した細胞株については提供元だけではなく、樹立された西尾教授も紹介し、謝辞を述べたほうがよいとコメントされた。次に、CPZが野生型、変異型EGFRに及ぼす影響の相違、研究に使用したCPZ濃度と血中濃度との比較、白血病治療における臨床応用に向けた取り組み、およびCPZによるTKI耐性克服機序について質問がなされた。これらに対して藤原氏は、細胞株を譲渡いただいた経緯、および西尾教授への謝辞を述べた。野生型EGFRは主に細胞膜からシグナルを伝達しており、細胞内輸送に作用するCPZの影響はFLT3同様に少ないと推察しているが、CPZはリガンド結合後のRTKのエンドサイトーシスにも影響すること、エンドサイトーシス阻害薬であるphenylarsine oxideが、野生型EGFRを発現するNSCLC株のGEF耐性を克服することが報告されていることから、CPZが野生型EGFRに作用する可能性もあり、今後検討したいと述べた。また、今回使用したCPZの濃度は、ヒトに抗精神病薬として通常量を投与した場合の血中濃度の範囲内であり、新たな副作用が出現する可能性は低いと述べた。また、「受容体の細胞内輸送操作による白血病治療」に関してすでに特許を取得しており、将来的には臨床応用に取り組みたいと回答した。さらに、T790M 変異のGEF耐性機序として、EGFRの構造変化やATP親和性上昇によるTKIの結合低下が考えられており、CPZが変異型EGFRを早期エンドソームに留めることで構造が変化する、もしくはATP親和性を低下させることでTKIに対する感受性を回復させる仮説を述べた。松本教授からは、*vivo*での実験予定、CPZの濃度とCALMの発現量、効果との関連、および変異型EGFRと他の変異型RTKの細胞内局在変化にCPZが及ぼす影響の相違について見解を問われた。これらに対し、*vivo*でのCPZの効果については移植実験で確認したいと述べた。また、今回の解析では、CPZ濃度依存的なCALMの発現変化は未確認だが、CALMがヒト組織に普遍的に発現され、肺組織における発現、機能も報告されていること、先行研究でCPZによるAML細胞におけるCALMの発現低下が観察されており、同様の制御機構を想定していると述べた。また、変異型EGFRとFLT3-ITDなど他の変異型RTKに対するCPZの作用点の違いについては今後明らかにしていきたいと述べた。西尾教授からは、CPZがT790M変異に特異的に有効であるのか、特異的な場合の分子機序、およびGEF、CPZ併用による細胞死誘導効果について細胞周期の観点から質問が行われた。これらに対し、T790M以外の変異型EGFRについては解析を行っていないが、今回の解析からCPZの変異型EGFRに対する作用点は、初期-後期エンドソーム間の輸送阻害と考えており、他の変異型EGFRにおいても確認できる可能性があるとして述べた。またGEFとCPZ併用による細胞死誘導には、GEFによるG1休止と、S期進行後CPZによるG2/M休止の両者の関与が推察されると述べた。

上記の審査を総合的に判断し、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かに藤原氏の研究成果であること、また、藤原氏が学位授与にふさわしい基礎研究手法ならびに科学的思考能力を合わせて持つと判断し、最終試験を合格と判定した。

3) 最終試験の結果：合格

審査基準に基づく評価点

A項目 42/50点 50/50点 50/50点

B項目 5/5点 5/5点 3/5点

合

4) 学位授与の可否：可