

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 小北 晃弘

---

生年月日 昭和 58年 1月 11日

本籍(国籍) 日本

---

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 1169 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当  
(博士の学位)

論文題目 Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the  
H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK  
rearrangement via epithelial-mesenchymal transition

---

---

---


## 審査委員

(主 査) 竹山 卓典 


---

(副主査) 岡田 奇 


---

(副主査) 松村 到 

---

(副 査) 

---

(副 査) 

---

## 論文内容の要旨

### 【目的】

Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)-anaplastic lymphoma kinase (ALK) の転座を有する非小細胞肺癌患者では、一般的にクリゾチニブのようなALK阻害薬への感受性は良好である。しかし、EML4-ALKの転座をもつ患者の中でもクリゾチニブへの耐性を示すものもある。低酸素はいくつかの癌種では抗がん剤や分子標的薬への耐性を示すことが指摘されており、ALK阻害薬への感受性と低酸素の関係について検討を行った。

### 【方法】

EML4-ALK転座を有する非小細胞肺癌細胞株H3122を用いて、ALK阻害薬（クリゾチニブ、もしくはアレクチニブ）への感受性をMTT assayを用いて正常酸素下と低酸素下比較した。さらにクリゾチニブを負荷しALKの下流にある増殖シグナルの変化をwestern blot法で確認した。形態と浸潤能の変化をそれぞれ顕微鏡下、migration assayで比較した。上皮間葉移行（EMT）関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRとwestern blot法で比較した。Hif1 $\alpha$ をSiRNAを用いてノックダウンさせ低酸素下でのALK阻害薬に対する感受性の変化をMTT assayを用いて確認した。

### 【結果】

低酸素下ではH3122はALK阻害薬に対してIC50で約8倍の耐性を示し、クリゾチニブを負荷しても低酸素下ではALKの下流にある増殖シグナルのリン酸化は抑制されなかった。細胞形態は低酸素下におくことにより、上皮間葉移行（EMT）に特徴づけられる紡錘形へと徐々に変化し浸潤能も増加、EMTとの関係性が示唆された。EMT関連遺伝子の発現を確認すると、E-カドヘリンの低下とビメンチン、フィブロネクチン、Slugの増加がみとめられ低酸素によりEMTを起こしていることがわかった。Hif1 $\alpha$ をノックダウンさせると低酸素下でもクリゾチニブへの感受性が改善した。

### 【考察】

ALK阻害薬の耐性の報告としては、ALKの二次変異、他のチロシンキナーゼの再活性化、EMTなどがあり、耐性への克服として耐性機序の解明が必要となっている。EMTは上皮系の細胞が間葉系の細胞形態、性質を獲得する現象で、がん細胞の悪性化や浸潤・転移の過程においても重要な役割を担っている。がん細胞におけるEMTは、低酸素応答、がん幹細胞、抗がん剤耐性との関連も指摘されている。Hif1 $\alpha$ は低酸素下で発現量が増加する重要な転写因子の一つである。Hif1 $\alpha$ は腫瘍の血管新生、細胞生存、EMT、抗がん剤耐性に関わる遺伝子を活性化するとされている。今回、ALK転座を有する非小細胞肺癌株において、低酸素下でHif1 $\alpha$ が増加し、それによりEMTが引き起こされALK阻害薬への耐性を獲得している可能性が示唆された。

### 【結論】

ALK転座を有する非小細胞肺癌において、低酸素下ではEMTを介してALK阻害薬への耐性を獲得していることが示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2014年 8 月 1 日 公 表 (doi : 10. 3892/ijo. 2014. 2574.)	出版物名 Internal Journal of Oncolgy. Vol. 45 No. 4 p.1430~1436
	公 表 内 容	2014年 8 月 1 日 online 掲載
	要 約	

## 論文審査結果の要旨

癌は遺伝子異常によって起こる疾患であり、臨床的に発見される際には多くの遺伝子変異・増幅・転座・欠失が蓄積している。近年、肺腺癌を中心とする一部の肺癌では、癌細胞の生存・増殖に関わる“driver gene”と呼ばれる遺伝子に異常があり、その遺伝子に生存・増殖が依存しているような“oncogenic addiction”の状態が見られ、その異常産物を分子標的薬で抑制することでしばしば劇的な抗腫瘍効果を得られることが明らかとなった。Anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子は、当初は悪性リンパ腫で融合遺伝子が発見されたが、2007年にSodaらが肺癌でEML4-ALKの融合遺伝子を新たなdriver geneとして報告した。ALK融合遺伝子を持つ肺癌は肺腺癌の5%程度に過ぎないがALK阻害剤であるcrizotinibやalectinibが著効し、既に本邦でも使用可能となっている。しかしながらcrizotinibの無病増悪生存期間は10か月程度で、いずれは耐性化するとされており、所謂gate keeper mutationの存在や、他のレセプターチロシンキナーゼの活性化などが機序として報告されている。一方、低酸素状態は腫瘍の悪性度に関わり転移や抗癌剤の耐性を誘導することが広く知られているが、ALK融合遺伝子を有する場合でのALK阻害剤についての報告は存在しない。低酸素がALK阻害剤の耐性に関わるか、さらにその機序を明らかにすることを目的とした。

### 方法：

ALK融合遺伝子を有する肺腺癌細胞株H3122を10%のFBSを混合したRPMI-1640メディアウムで5%のCO<sub>2</sub>下37度で培養した。低酸素状態は、低酸素インキュベーターを用いて5%のCO<sub>2</sub>下37度、酸素濃度が1%未満の状態を維持した。細胞増殖阻害実験として、細胞を撒いた24時間後にcrizotinibを加え、さらに72時間後にMTTを加えて吸光度を測定した。Real-time RT-PCR法を用いて、EMT関連遺伝子の発現を確認した。Western-blotting法を用いてEMT関連タンパクの発現を確認した。遊走能試験として、正常酸素下・低酸素下で48時間培養後にケモタキセルチャンバーに細胞を撒き直し24時間後にチャンバー外に遊走した細胞をクリスタルバイオレットで染色し細胞数をカウントした。

### 結果：

低酸素下ではH3122はクリゾチニブに対してIC<sub>50</sub>で約8倍の耐性を示し、クリゾチニブを負荷しても低酸素下ではALKの下流にある増殖シグナルのリン酸化は抑制されなかった。細胞形態は低酸素下におくことにより、上皮間葉移行(EMT)に特徴づけられる紡錘形へと徐々に変化しEMTとの関係性が示唆された。EMT関連遺伝子とタンパクの発現を確認すると、低酸素下ではE-カドヘリンの低下とビメンチン、フィブロネクチン、Slugの増加がみとめられ、遊走能も増加、低酸素によりEMTを起こしていることがわかった。Hif 1  $\alpha$  をノックダウンさせると低酸素下でもクリゾチニブへの感受性が改善し、EMT関連タンパク発現の変化も消失した。

考察：

ALK融合遺伝子を有する肺腺癌細胞株H3122において、低酸素下ではHif1 $\alpha$ を介してEMTが誘導されALK阻害薬に対する耐性を獲得していることがわかった。低酸素は、腫瘍を形成する腫瘍の中心部と仮定され、そういった腫瘍の内部にはALK阻害薬に耐性となっている部分があると考えられる。また、ALKがHif1 $\alpha$ の転写に関与し、Hif1 $\alpha$ がALK陽性腫瘍の生存・増殖に必要な不可欠な因子である、という報告もある。この結果からALK陽性肺がんに対しては、ALK阻害薬だけでなく、Hif1 $\alpha$ を標的とした治療や血管新生阻害薬などの併用がALK阻害剤耐性への克服として提案できると考察している。

本研究成果は、ALK遺伝子変異をもつ肺腺癌の薬剤耐性獲得機構に低酸素環境の影響を初めて示したもので、さらにその機序にHif1 $\alpha$ が関与することを明確に示したものである。学位申請者は本研究を中心となって遂行し、本研究分野に関する理解と造詣も十分で、最終試験では合格と判定した。本研究は、肺癌治療の臨床的課題に対する一つの回答を提示した成果であり、本論文は医学博士の学位に値する論文と判定した。

## 博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 27 年 2 月 10 日

## 審査委員

主査 竹山 宜典



副主査 岡田 希



副主査 松村 到



副査



## 学位申請者氏名

小北 晃弘

## 論文題目

Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition

## 要旨

学位申請者は公聴会において、学位申請研究に関して以下のような報告を行った。すなわち、本研究ではALK融合遺伝子を有する肺腺癌細胞株H3122において低酸素下でのALK阻害薬の耐性とその機序を明らかにすることを目的とした。低酸素下ではクリゾチニブへ耐性を示し、細胞形態は紡錘形へと変化を起した。上皮間葉移行（EMT）との関係を疑い、EMT関連遺伝子とタンパクの発現の変化を比較して、低酸素下でのEMT惹起を確認した。細胞の低酸素応答の中心であるHif1 $\alpha$ をノックダウンすると、低酸素下でもクリゾチニブへの感受性が改善しEMT関連タンパクの変化も消失し、細胞の形態変化も起きなかった。以上から、ALK融合遺伝子を有する肺腺癌細胞株H3122では低酸素下でHif1 $\alpha$ を介してEMTが誘導されALK阻害薬への耐性を示すことが明らかとなった。

報告後に、岡田副主査から（1）肺腺癌でEML4-ALK以外のdriver-geneの種類（2）ALK陽性肺癌では他のdriver geneをもつ肺癌と比較して低酸素への応答が強いということはないか（3）ALKの下流のシグナルが低酸素下ではクリゾチニブで阻害されていないことがわかったがその理由（4）EMTは癌において転移との関係が言われているがALK陽性肺癌は転移しやすいといったことはあるのか、松村副主査からは（5）一般に低酸素状態での薬物代謝との関係（6）他のdriver-geneを有する肺癌では低酸素による耐性の報告はあるのか（7）低酸素によるEMTが今回確認されているが正常酸素環境に戻すとEMTが解除されるのか、また戻るまでの期間は、光富教授からは（8）今回の研究への臨床的意義は（9）今回低酸素と定義した1%未満の酸素条件は、実際の癌ではどの程度存在するのかについての質問があった。これらの質問に対して学位申請者は適切に回答したので、学位論文が学位申請者の研究成果であることを確認し、最終試験に合格とした。