



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Ten Gefitinib-sensitizing mutant Epidermal Growth Factor Receptor enables transformation of a mouse fibroblast cell line.                                                                                                                                            |
| Author(s)    | 長友, 泉                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46275">https://hdl.handle.net/11094/46275</a>                                                                                                                                                                                  |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                           |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | ながとも いずみ<br>長 友 泉                                                                                                                                                         |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号     | 第 20104 号                                                                                                                                                                 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 18 年 3 月 24 日                                                                                                                                                          |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科分子病態医学専攻                                                                                                                                        |
| 学 位 論 文 名     | The Gefitinib-sensitizing mutant Epidermal Growth Factor Receptor enables transformation of a mouse fibroblast cell line.<br>(ゲフィチニブ感受性の変異型上皮成長因子受容体は、マウス線維芽細胞株を形質転換させる。) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 川瀬 一郎<br><br>(副査)<br>教 授 門田 守人 教 授 仲野 徹                                                                                                                       |

### 論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 非小細胞肺癌(NSCLC)患者の一部では、上皮成長因子受容体 Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)の分子標的治療薬である gefitinib (イレッサ) に対する極めて高い感受性が認められ、それには EGFR の種々の体細胞変異が関連する。変異型 EGFR のうち、特に頻度の高い 746-750 deletion mutant EGFR に注目し、そのシグナル伝達を解析した。

〔方法ならびに成績〕 内因性の EGFR を発現していない、マウス線維芽細胞株 NR6 を親株として、野生型 EGFR を発現する NE99、NE2002 (各々高度発現、中等度発現)、変異型 EGFR を発現する NR/Del (中等度発現) を作成した。トランスフォーメーションの解析は軟寒天コロニー形成法で、細胞増殖の解析はフローサイトメトリーによる細胞周期測定と BrdU 取り込み法で、シグナルの解析は ELISA 法で行った。

(1) トランスフォーメーション: 三種の stable transfectant cell line につき検討した。EGF を添加しない培地(5% 血清) ではすべての細胞株でコロニー形成は認められなかった。3 日毎に EGF (10 ng/ml) を添加した培地では、NE99 で最も多くのコロニー形成が認められ ( $13 \pm 1.73$  個/dish)、次いで NR/Del ( $5 \pm 2.0$  個/dish)、NE2002 ( $0.33 \pm 0.57$  個/dish) という結果であった。前 2 者間の比較では有意差を認めた ( $p=0.0007$ )。この結果から、頻回の EGF 刺激では、野生型 EGFR 発現細胞のトランスフォーメーションには高度の発現レベルが必要であり、同等の発現レベルで比較した場合は野生型よりも変異型 EGFR のトランスフォーメーション能が強いことが示唆された。次に、EGF 刺激に対する依存度を比較するため、他の条件を変えずに EGF 刺激の頻度を 10 日毎として同様の解析を行った。最も多くのコロニー形成が認められたのは NE99 であったが、その数は  $8 \pm 2.0$  個/dish であり、3 日毎の場合と比較して有意に減少していた ( $p=0.01$ )。一方、NR/Del のコロニー形成は  $5.3 \pm 1.52$  個/dish であり、3 日毎の場合と比較して同等であった ( $p=0.8287$ )。NE2002 では  $0.33 \pm 0.57$  個/dish であった。この結果から、野生型 EGFR を高度に発現する状況では、トランスフォーメーション能は EGF 刺激の頻度に依存するが、変異型 EGFR ではその依存度は低いと結論付けた。

(2) 細胞増殖: トランスフォーメーションは複雑な素過程からなり、細胞増殖の亢進はその中心的な役割を担うと

考えられる。上述した現象を更に解析するため、細胞増殖の検討を行った。ここでは EGF 単独の効果を検討するため、starvation 及び EGF 刺激の培地中の血清は各々 0.1%、0.3% とした。NE99、NE2002 では EGF 刺激で細胞周期の S 期の分布が明らかに増加したが、NR/Del ではその増加は認められなかった。また、BrdU 取込みも、NE99、NE2002 では EGF 刺激で明らかに増加したが、NR/Del ではその増加はわずかであった。これらの結果から、EGF 単独の単回刺激による細胞増殖は、変異型 EGFR では野生型 EGFR よりもむしろ低反応であると考えられた。

(3) MAPK 活性化: EGF 刺激による細胞増殖では、古典的 MAPK の Erk1/2 が主なシグナル伝達経路である。EGF 刺激に対する Erk1/2 活性化を解析し、上述の細胞増殖との関連を検討した。EGF 刺激 10 分後の Erk1/2 活性化のピークは、NE2002 で最も高く、次いで NE99 であった。NR/Del はわずかな増加に留まり、これらの結果は BrdU 取り込みと同じ傾向であった。すなわち、EGF のみの単回刺激に対して、MAPK 活性化とそれに続く細胞増殖は、野生型 EGFR 発現細胞の方が変異型 EGFR 発現細胞よりも顕著であった。

[総括] 変異型 EGFR を発現する細胞は、野生型 EGFR を発現する細胞と比較して、より少ない発現レベル及びより少ない EGF 刺激でトランスフォームすることが判明したが、その優位性を EGF 刺激による細胞増殖の亢進で説明することはできなかった。その機序には、他の生化学的/細胞生物学的過程が関わっていると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

上皮成長因子受容体 (EGFR) は、癌細胞でしばしば活性化されている。非小細胞肺癌の一部の症例では、EGFR に対する分子標的薬剤のゲフィチニブが極めて有効であり、そのような症例では EGFR の体細胞変異が存在する。本研究において、変異型 EGFR は、正常細胞が癌化する過程へ直接的に関与することが示唆された。すなわち、変異型 EGFR を導入したマウス線維芽細胞株は、野生型 EGFR と比較し、軟寒天内コロニー形成能が促進されていた。また、細胞外からの増殖刺激が弱い状況でも、その活性は維持されており、むしろ刺激に対する即時的な増殖反応は低下していた。追加データとして、変異型 EGFR では、刺激に対するシグナル活性化反応のピークは低下しているものの、活性化の持続時間は遷延していることが示された。本研究は、変異型 EGFR に特徴的なシグナル伝達の修飾という、新たな治療戦略の可能性を示唆しており、学位の授与に値すると考えられる。