The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cell Surface Tetraspanin CD9 Mediates Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer
Author(s)	河面, 聡
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58162
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【63】

氏　　名	河　面　　聡（こう　も　さとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３８５　号
学位授与年月日	平成23年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Cell Surface Tetraspanin CD9 Mediates Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer （細胞表面蛋白テトラスパニンCD9は小細胞肺癌の抗癌剤耐性成立に関与している）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　熊ノ郷　淳 （副査） 教　授　髙倉　伸幸　　教　授　奥村明之進

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

小細胞肺癌(SCLC)は肺癌の約15%を占め、初回抗癌剤治療への反応性はよいが、すぐに再発しその時点で多剤耐性を獲得しているため、極めて予後不良である。また、non-SCLCに対しては近年有効な分子標的薬が保険適応となっているのに対し、再発後のSCLCの治療法はいまだ確立されていない。SCLC細胞は生体内で豊富な間質に囲まれており、Sethiらは、SCLC細胞のβ1ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝを介する細胞外結合組織(ECM)への接着による生存ｼｸﾞﾅﾙが抗癌剤によるｱﾎﾟﾄｰｼｽを抑制するというcell adhesion-mediated drug resistanse (CAM-DR)の考えを提唱した。我々は、ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝの働きを密接に補佐するﾃﾄﾗｽﾊﾟﾆﾝ蛋白CD9がこの機構に深く関与しているとの仮説を立てた本研究ではCD9の発現と薬剤耐性,細胞接着能,細胞運動能との関連およびCD9を標的としたSCLCの多剤耐性克服治療法の可能性を検討する。

〔　方法ならびに成績　〕

SCLC症例の診断時生検および剖検組織の免疫染色を行った。CD9は治療前はほとんど発現せず(1/16)、再発後にのみ発現していた(3/7)。SCLC細胞株(H69,SBC-3)、ｼｽﾌﾟﾗﾁﾝ耐性株(H69/CDDP,SBC-3/CDDP)、ｴﾄﾎﾟｼﾄﾞ耐性株(69/VP,SBC-3/ETP)、CD9遺伝子導入株(H69/CD9,SBC-3/CD9)を実験に供した。CD9はmRNA(RT-PCR),蛋白(ｲﾑﾉﾌﾞﾛｯﾄ),細胞表面蛋白(FACS)ﾚﾍﾞﾙにおいて耐性株のみに強発現していた。親株に抗癌剤を短期暴露することでもCD9の転写が誘導された。また、MTT assayにて薬剤感受性試験を行ったところ、これらの耐性株は未暴露のSCLC治療薬ｱﾑﾙﾋﾞｼﾝ(AMR)とｲﾘﾉﾃｶﾝ(SN-38)に交叉耐性を示した。次に、adhesion assayにて、耐性株とCD9導入株ではECMの主要成分ﾌｨﾌﾞﾛﾈｸﾁﾝへの接着能が著明に亢進し、それが抗β1ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝ抗体により阻害されることを確認した。以上の結果は、耐性株におけるCD9の強発現はβ1ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝを介するECMへの接着能亢進と密接に関連していることを示唆する。さらに、SBC-3細胞株ｼﾘｰｽﾞのﾌｨﾌﾞﾛﾈｸﾁﾝ上での細胞運動能をtime-lapse video microscopy (TLVM)を用いて検討した。耐性株とCD9導入株は親株に比して運動能が有意に低下していた。SCLC細胞株には例外なくｹﾓｶｲﾝ受容体CXCR4が発現し、そのﾘｶﾞﾝﾄﾞCXCL12刺激が運動能を上げることを我々は以前に報告した。そこでCXCL12刺激下で同様のTLVM撮影を行ったところ、耐性株の運動能は親株のﾚﾍﾞﾙまで回復し、これがCD9の一過性の転写抑制によることを確認した。以上の結果より、CD9発現に伴う接着能亢進と細胞運動能は逆相関することが明らかとなり、SCLC細胞はECMへの接着を強固にすることで生存ｼｸﾞﾅﾙを受けやすくなり抗癌剤によるｱﾎﾟﾄｰｼｽを回避するというCANM-DRへのCD9の関与が示唆された。

最後に、CD9の多剤耐性SCLC克服の治療標的としての可能性を検討した。抗CD9ﾓﾉｸﾛﾅｰﾙ抗体投与あるいはsiRNAによるCD9のﾉｯｸﾀﾞｳﾝは、H69,SBC-3両者の耐性株においてのみｱﾎﾟﾄｰｼｽを72時間で誘導し、いずれもPARPの切断を伴っていた。前者は、投与後10分でJNK/SAPK,p38のリン酸化を誘導したが、Akt,ERK1/2のリン酸化は認めなかった。以上の結果より、CD9は発現の増強している耐性株特異的な治療標的に成り得ることが示唆された。

〔　総　　括　〕

我々はβ1ｲﾝﾃｸﾞﾘﾝ機能を密接に調節するﾃﾄﾗｽﾊﾟﾆﾝ蛋白CD9が、SCLC細胞において抗癌剤暴露によりその発現が誘導され、多剤耐性となるに従ってその発現が増強すること、SCLC細胞のECMへの接着能および運動能がCD9発現によってﾄﾞﾗﾏﾁｯｸに制御されることを示し、CAM-DR機構へのCD9の寄与を明らかにした。さらに、CD9を特異的標的としたﾓﾉｸﾛﾅｰﾙ抗体およびsiRNAにより、CD9発現耐性株にのみｱﾎﾟﾄｰｼｽを誘導できることを示した。本研究の成果は、SCLCの多剤耐性克服を目指した新しい分子標的治療法の可能性を示すものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は細胞表面蛋白CD9が小細胞肺癌の薬剤耐性に関与していることをvitroの実験系で明らかにしたものである。小細胞肺癌の細胞株、および抗癌剤に長期暴露して樹立した薬剤耐性株、CD9の遺伝子導入株を用いた実験を行い、耐性株ではCD9が強発現すること、耐性株、CD9導入株ではフィブロネクチン上のβ1インテグリン依存性の細胞接着能が上昇し、運動能が低下すること、運動能の低下はケモカインCXCL12で回復することを示し、現在提唱されているcell

adhesion drug resistanceの機構にCD9が重要な役割を果たしていることを明らかにした。またCD9を標的とした抗体、siRNAで耐性株特異的にアポトーシスが誘導されることも示した。現在明確なエビデンスのない再発後の薬剤耐性化した小細胞肺癌の抗癌剤耐性機構への新しい知見をもたらし、また新規の分子標的治療の可能性を示唆したものである。これらのことから学位に値するものと認める。