OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規EGFR-TKI耐性獲得因子eIF3cの分子病理学的意義の解明とバイオマーカーとしての有用性の検討
Author(s)	新谷, 拓也
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72335
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　新谷　拓也　）	
論文題名	新規EGFR-TKI耐性獲得因子eIF3cの分子病理学的意義の解明とバイオマーカーとしての有用性の検討

論文内容の要旨

【背景】

上皮成長因子受容体（EGFR）は、非小細胞肺癌（NSCLC）の主なドライバー癌遺伝子であることが知られており、*EGFR*遺伝子の体細胞変異（exon19の欠失変異等）はアジア諸国では30～50%と高頻度で認められる。エルロチニブ等のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）は*EGFR*遺伝子変異陽性のNSCLCに著効することが示されているが、1-2年でほぼ全例耐性を獲得してしまうことが問題となっている。その機序して、*EGFR*遺伝子の二次的変異（T790M）、側副経路の活性化（*Met*遺伝子増幅等）、オートファジー等多数報告されており、腫瘍の持つヘテロな性質が耐性化機構を複雑化していると考えられる。薬剤耐性化機構の解明は、癌薬物療法の個別化だけでなく、医療経済効果への波及も期待される重要な課題である。本研究は、EGFR-TKI耐性株を用いて新規EGFR-TKI耐性化機構の解明並びに臨床における意義を明らかにする目的で検討を行った。

【方法】

*EGFR*遺伝子変異（exon19欠失変異）陽性の肺癌細胞株PC9及びHCC827にそれぞれエルロチニブを濃度漸増にて６ヶ月以上曝露させ、エルロチニブ耐性株（PC9/ER及びHCC827/ER）を樹立した。各薬剤の感受性は、MTT試験を用いて評価した。T790M等の耐性化変異は、サンガーシークエンス法及びアレル特異的PCR法にて検出した。エルロチニブ耐性化関連因子の同定を目的に、プロテオミクスを用いた網羅的解析を行った。候補因子の発現量は、ウエスタンブロット法及びreal time RT-PCR法にて確認した。候補因子のエルロチニブ感受性及びEGFR関連シグナルへ与える影響は、si-RNAを用いた遺伝子発現抑制にて検証した。オートファジー活性は、LC3B-IIのタンパク量またはLC3B-RFP発現ベクター導入によってオートファゴソーム（LC3B-RFP puncta）の可視化にて評価した。*EGFR*遺伝子変異陽性のNSCLC患者から得られた腫瘍生検検体について免疫組織染色を行い、候補因子の染色強度とEGFR-TKI耐性及び予後の相関性を検討した。

【結果】

PC9/ER及びHCC827/ER共にエルロチニブに対して強い耐性を得ていたが、T790M変異は共に陰性であった。PC9/ERではPC9に比してP-Metが高発現していたが、Met阻害剤クリゾチニブを併用してもPC9/ERにおけるエルロチニブ耐性は変化しなかったことから、Met非依存的な耐性化機構の存在が示唆された。そこで、PC9とPC9/ERのプロテオーム解析で得られたタンパク質の内､PC9/ERのみから同定されたタンパク質についてGoSlim解析及びPathway解析を行ったところ、翻訳関連タンパク質に変動を認めた。この中で、翻訳開始反応の制御に重要なeIF3cに着目した。eIF3c発現量はmRNA量、タンパク質量共にPC9/ER及びHCC827/ERで、それぞれPC9及びHCC827に比べて有意に高かった。eIF3cノックダウンに伴うエルロチニブ感受性を検討したところ、PC9では変化なかったが、PC9/ERでは有意にエルロチニブ耐性が改善した。この結果からeIF3cがEGFR-TKI耐性化に寄与している可能性が示唆された。続いて、PC9/ERにおいてeIF3cノックダウンに伴うエルロチニブ添加時のEGFR関連シグナル分子変動を検討したところ、EGFR、Akt、Erk1/2のリン酸化活性は変化しなかったが、LC3B-IIが有意に減少した。また、PC9にeIF3c発現ベクター及びLC3B-RFP発現ベクターを導入したところ、LC3B-RFP puncta数が有意に増加した。さらに、PC9/ERにおけるLC3B-IIはエルロチニブ添加時においてPC9に比して有意に高かった。オートファジー阻害剤クロロキン併用によって、PC9/ERにおけるエルロチニブ耐性は有意に改善した。以上から、eIF3cのEGFR-TKI耐性獲得機序としてオートファジーの誘導が示唆された。最後に、NSCLC患者の臨床検体において、eIF3c陽性率はEGFR-TKI治療前よりも治療後の検体で有意に高かった。さらに、eIF3c陽性例はEGFR-TKI治療後の無増悪生存期間がeIF3c陰性例に比して有意に短かった。

【考察】

eIF3cは複数の癌種で過剰発現する予後不良因子であることが報告されている。また、eIF3cはEGFR下流のmTORに直接結合し、eIF4とS6Kを介したcap依存性翻訳開始反応を制御するともいわれている。これまでにmTORやeIF4とEGFR-TKI耐性については報告されているが、本研究で初めてeIF3cがEGFR-TKI耐性に関与していることが示された。さらに、PC9/ERのエルロチニブ耐性は、eIF3cに制御されるオートファジーに依存的であると推察された。NSCLCにおいてオートファジーの阻害がエルロチニブ耐性を抑制することは複数報告されているが、オートファジーの生理的機能を考慮すると、その薬理学的阻害に伴う重篤な有害事象の可能性が懸念される。eIF3cノックダウンがPC9には影響を与えなかったことから、eIF3c阻害剤はEGFR-TKI耐性に対する選択性が高いという特性が推察される。また、患者検体の解析によって、臨床におけるeIF3cとEGFR-TKI耐性の相関性が示唆された。本研究は症例数が少なく後ろ向き研究でもあることから臨床データの解釈には限界が存在することに留意する必要があるが、本研究で得られた臨床知見は、eIF3cがNSCLC患者におけるバイオマーカーとして個別化医療に貢献できる可能性を示している。

【結論】

eIF3c発現量の増加は、オートファジーを増強させ、NSCLCにおけるEGFR-TKI耐性を引き起こした。さらに、生検検体においてeIF3c発現増加している患者は予後不良であった。以上より、eIF3c はEGFR-TKIの治療応答性の予測バイオマーカーとなりうるのみならず、eIF3cの阻害剤の開発がNSCLC患者におけるEGFR-TKI耐性克服の新たな治療戦略となることが期待される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名（新谷　拓也）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	藤尾　慈
副 査	教授	辻川和丈
副 査	教授	堤　康央

論文審査の結果の要旨

上皮成長因子受容体(EGFR)は、非小細胞肺癌のドライバー遺伝子であり、EGFRを標的とする治療薬であるEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は、非小細胞肺癌の克服を可能とするものと期待された。しかし、その後、EGFR-TKIを用いた治療過程で、癌細胞が耐性を獲得するため、EGFR-TKI治療の効果も限定的であることが明らかになり、EGFR-TKI耐性獲得機構の分子レベルでの解明は喫緊の課題となっている。

本研究において、学位申請者は、新たにEGFR-TKI耐性細胞株を樹立し、プロテオミクス解析から、耐性株においてeIF3cの発現が増強していることを見出した。耐性細胞株においてeIF3cをノックダウンすることによりEGFR-TKI耐性が改善したことから、eIF3cが新規の耐性原因因子であることが示唆された。学位申請者は、細胞株の耐性獲得機序を追究し、eIF3cの発現増強によるオートファジーの亢進が薬剤耐性に重要であることを見出した。さらに、非小細胞肺癌の臨床検体において、eIF3c陽性率はEGFR-TKI治療後の症例、すなわち耐性症例で上昇すること、治療前にeIF3c陽性の症例は、陰性症例と比して予後が悪いことを明らかにした。

以上、本論文は、非小細胞肺癌のEGFR-TKIに対する新たな耐性獲得機構を見出し、そのバイオマーカーおよび治療標的としての意義を提案するものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。