



Title	KRAS変異肺癌における上皮間葉移行に基づいたMEK阻害薬による受容体型チロシンキナーゼのフィードバック機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	北井, 秀典
Description	配架番号 : 2347
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12933号
Issue Date	2017-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68598
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hidenori_Kitai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 北井秀典

学 位 論 文 題 名

KRAS 変異肺癌における上皮間葉移行に基づいた MEK 阻害薬による受容体型チロシンキナーゼのフィードバック機構に関する研究

(Studies on Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition based on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in KRAS Mutant Lung Cancer)

【背景と目的】近年、肺腺癌においては EGFR 遺伝子変異など様々なドライバー遺伝子変異が発見され、分子標的薬により高い抗腫瘍効果が認められている。その中でも KRAS 変異肺は海外において肺腺癌の中で最も頻度が高いが、未だ有効な分子標的治療は確立されていない。ERK 経路 (RAS-RAF-MEK-ERK) は細胞の増殖・分化・死に関わる細胞内シグナル伝達経路であり、KRAS 変異肺癌においても重要な経路とされている。KRAS 変異肺癌に対する治療戦略として、この ERK 経路をターゲットとした MEK 阻害薬が開発され臨床試験が行われたが、その効果は十分ではなかった。我々は KRAS 変異肺癌において MEK 阻害薬の耐性機構として RTK による下流シグナルへのフィードバックが生じることを明らかにし、その RTK を決定づける因子について検証した。また MEK 阻害薬と RTK の阻害薬の効果について *in vitro*, *in vivo* で検証した。

【対象と方法】1. KRAS 変異肺癌細胞株に MEK 阻害薬を加え、ERK 経路と PI3K 経路の経時的なシグナル変化についてウエスタンブロット法を用いて検証した。また MEK 阻害薬投与後に活性化してくる RTK についてリン酸化 RTK array 法を用いて検証した。ERBB3 が発現している KRAS 変異肺癌において MEK 阻害薬と pan-ERBB 阻害薬の併用効果をフローサイトメトリーによるアポトーシス解析やゼノグラフトモデルを用いて検証した。2. KRAS 変異肺癌細胞株における ERBB3 の発現と上皮間葉移行(EMT)状態についてウエスタンブロット法を用いて検証した。上皮系の KRAS 変異肺癌細胞株である H358 と TGF- β により EMT を誘導した H358 (H358M) の遺伝子変化をマイクロアレイ法により網羅的に検証し、H358M で発現が上昇してくる RTK を探索した。また CCLE、TCGA のデータベースから KRAS 変異肺癌細胞株とヒト KRAS 変異肺腺癌の遺伝子データを抽出して階層的クラスター解析を行い、ERBB3、FGFR1 の発現と EMT に関連する遺伝子について検証した。3. 間葉系の KRAS 変異細胞株に MEK 阻害薬を加えた際に変動する遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に検証した。また間葉系の KRAS 変異細胞株である LU99 に SPRY4、DUSP6 の siRNA 導入、SPRY4 の過剰発現を行い、FRS2 とその下流シグナル経路に与える影響についてウエスタンブロット法を用いて検証した。4. 間葉系 KRAS 変異肺癌に対する MEK 阻害

薬と FGFR 阻害薬の併用効果についてフローサイトメトリーによるアポトーシス解析やゼノグラフトモデルを用いて検証した。

【結果】 1. KRAS 変異肺癌細胞株に対して MEK 阻害薬を投与すると、上皮系の細胞株では ERBB3、間葉系では FGFR1-FRS2 経路の活性化を認め、それらは ERK 経路の再活性化、PI3K 経路の活性化を引き起こしていた。2. FGFR1-FRS2 経路活性化のメカニズムは FRS2 を抑制している SPRY4 が MEK 阻害薬により発現が低下し、FRS2 の抑制が外れるためと考えられた。上皮系の細胞株においても MEK 阻害薬投与により SPRY4 は低下するが、FRS2 の活性化は認めなかった。3. KRAS 変異肺癌細胞株とゼノグラフトモデルにおいて、上皮系では MEK 阻害薬と pan-ERBB 阻害薬の併用、間葉系では MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用により著明な細胞のアポトーシス増加、抗腫瘍効果を認めた。

【考察】 RTK の転写調節因子は ERK 経路によって調節されており、ERK の抑制により RTK が活性化されることが報告されている。実際、KRAS 変異肺癌細胞株に対し MEK 阻害薬を投与すると RTK の活性化を認め、それに伴い ERK 経路の再活性化、PI3K 経路の活性化を認めた。また MEK 阻害薬により活性化する RTK は腫瘍の EMT の状態によって異なり、上皮系では ERBB3、間葉系では FGFR1 であった。そして MEK 阻害薬と EMT の状態に応じた RTK 阻害薬の併用により *in vivo* では高い抗腫瘍効果を認めた。MEK 阻害薬により活性化する RTK によるフィードバック機構は MEK 阻害薬の耐性として働いていると考えられる。

間葉系 KRAS 変異肺癌において FGFR1-FRS2 経路が活性化するメカニズムは、SPRY4 の低下により FRS2 の抑制が外れるためと考えられた。上皮系の細胞株でも MEK 阻害薬により SPRY4 の発現は低下するが、FRS2 の活性化は認めず、SPRY4 による FRS2 の抑制は間葉系の KRAS 変異肺癌に特有のメカニズムと考えられた。

MEK 阻害薬と RTK 阻害薬の併用療法による効果は個々の細胞株により大きく異なるが、これは KRAS 変異肺癌に heterogeneity が存在するためと考えられる。実際、細胞株やヒトの KRAS 変異肺癌の遺伝子解析結果では、ERBB3、FGFR1 の発現レベルは各々の細胞株や腫瘍によって様々であった。また他の要因として、本研究では RTK や KRAS の下流シグナルとして ERK 経路、PI3K 経路にのみ着目したが、KRAS の下流シグナルは多様であり、RAL など他のシグナル経路が生存に寄与している可能性がある。更に、最近抗アポトーシス関連タンパクやアポトーシス促進タンパクの発現が、MEK 阻害薬の耐性に関与していると報告されており、このことも併用療法の効果に影響している可能性がある。

【結論】 KRAS 変異肺癌では MEK 阻害薬により腫瘍の EMT の状態に基づき、上皮系の腫瘍では ERBB3、間葉系の腫瘍では FGFR1 から下流シグナルへのフィードバックが起こる。一部の KRAS 変異肺癌において、腫瘍の EMT をバイオマーカーとした MEK 阻害薬と RTK 阻害薬の併用は有効な分子標的薬治療になりうる。