

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1264 号	氏 名	小野 真由
論文審査担当者	主 査 平塚 佐千枝 副 査 塩沢 丹里 ・ 古庄 知己		

(論文審査の結果の要旨)

CDK4/6 阻害剤は進行再発エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳癌の治療に広く使用されるようになったが、この薬剤に耐性になった後の治療について、耐性機序の基礎研究に基づいた一定の見解はない。CDK4/6 阻害剤に耐性となった乳癌の治療戦略を構築するために、パルボシクリブ耐性乳癌細胞を樹立し、その耐性機序の解析を行った。

ER 陽性乳癌細胞株である T47D と MCF7 に長期間パルボシクリブを曝露し、パルボシクリブ耐性 T47D (T47D-PR) と、1 μ M パルボシクリブ耐性 MCF7 (MCF7-P1) および 2 μ M パルボシクリブ耐性 MCF7 (MCF7-P2) を樹立した。これらの耐性株の化学療法剤や分子標的薬に対する薬剤感受性の変化を細胞増殖測定法 (WST 法) で解析した。また、短時間のパルボシクリブ曝露、耐性株樹立後の異なるパルボシクリブ曝露期間の耐性株およびパルボシクリブ非存在下で培養後の耐性株で、シグナル伝達経路や細胞周期調節に関与するタンパク発現やリン酸化の変化をウェスタンブロット法で解析した。さらに、これらの耐性株の *RB1* 遺伝子のコピー数や変異を解析した。

その結果、小野は次の結論を得た。

- すべてのパルボシクリブ耐性株で CDK6 の発現上昇と Rb 発現およびそのリン酸化の減少が認められた。一方で、ER α の発現減少と mTOR リン酸化の上昇は T47D-PR のみで認められ、T47D-PR と MCF7-P1 では cyclinE2 と E2F-1 の発現は減少するのに対し MCF7-P2 では上昇する等、耐性株ごとに異なるタンパク発現やリン酸化の変化が認められた。
- 耐性株をパルボシクリブに長期間曝露し続けた株 (-L) では、樹立直後の耐性株と比較し、一部のタンパク発現やリン酸化に変化が認められた。T47D-PR-L と MCF7-P2 では Rb リン酸化の消失が認められ、これらをパルボシクリブ非存在下で長期培養しても Rb リン酸化の回復は認められず、*RB1* 遺伝子に、T47D-PR-L ではコピー数減少と欠失が、MCF7-P2 ではコピー数減少と 1 塩基置換により停止コドンが生じていることが確認された。
- 全ての耐性株で CDK4/6 阻害剤であるアベマシクリブへの交叉耐性が認められ、CDK1/2/5/9 阻害剤であるディナシクリブには親株と同等の感受性を示すことが確認された。
- mTOR リン酸化の上昇を認めた T47D-PR では mTOR 阻害剤エベロリムスに対する感受性が増加していた。
- 乳癌治療に使用される主な化学療法剤 (エリブリン、パクリタキセル、ドキシソルビシン、フルオロウラシル) に対する感受性は、全ての耐性株で親株との変化は認めなかった。
- パルボシクリブとフルベストラントの併用では、親株で認められたフルベストラントによる増殖抑制効果の増強は、パルボシクリブに長期曝露した耐性株では認められなかったが、パルボシクリブ非存在下で長期培養した耐性株では増殖抑制の増強が認められた。

これらの結果より、ER 陽性乳癌細胞では複数の分子機構の変化がパルボシクリブ耐性獲得に関与しており、耐性細胞で活性化されているタンパクを標的とした治療戦略が、耐性克服に有用と考えられる。また、パルボシクリブ単剤の投与により *RB1* 遺伝子にコピー数変化や変異が誘導されることが示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。