

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	三浦健太郎
論文審査担当者	主査 小泉 知展 教授 副査 塩沢 丹里 教授・花岡 正幸 教授
論文題目	FGF2-FGFR1 pathway activation together with thymidylate synthase upregulation is induced in pemetrexed-resistant lung cancer cells (ペメトレキセド耐性肺癌細胞では FGF2-FGFR1 経路の活性化と thymidylate synthase の発現上昇が誘導される)

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 ペメトレキセドは扁平上皮癌を除く非小細胞肺癌に適応が認められている葉酸代謝拮抗剤である。ペメトレキセドに対する耐性に関しては、これまでに thymidylate synthase (TS) や ATP-binding cassette transporter 11 (ABCC11) などの関与が報告されているが、その機序は完全には解明されていない。Fibroblast growth factor 2 (FGF2) は血管新生、創傷治癒などに関連する増殖因子で、細胞の増殖や分化の過程で重要な役割を担っており、癌細胞の上皮間葉転換(EMT)を誘導することも知られている。今回、*EGFR* status の異なる2つの肺腺癌細胞株を用いてペメトレキセド耐性細胞株を樹立し、ペメトレキセド耐性機序を明らかにすべく解析を行った。

【方法】 *EGFR* status の異なる2つの肺腺癌細胞株 PC9 (mutant *EGFR*)、H1993 (wild-type *EGFR*) に長期間ペメトレキセドを曝露し、ペメトレキセド耐性株 PC9-MTA と H1993-MTA を樹立し、マイクロアレイ法での網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、親株と耐性株での FGF2 および EMT 関連マーカー、TS、MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発現およびリン酸化をウェスタンブロット(WB)法、RT-PCR 法、ELISA 法を用いて解析した。また、FGF2 発現を si RNA を用いてノックダウンした際のペメトレキセド感受性と、FGFR1 の阻害剤である PD173074 を耐性株に投与した際のペメトレキセド感受性を WST 法で解析し、その際の EMT 関連マーカーと MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発現およびリン酸化の変化を解析した。

【結果】 マイクロアレイ解析では、二つのペメトレキセド耐性株 (PC9-MTA、H1993-MTA) で、親株に比べて FGF2 と FGFR1、TS の mRNA 発現が上昇しており、FGF2 の蛋白発現増加は WB 法と培養上清の定量で、FGFR1 発現は RT-PCR で、TS の蛋白発現増加は WB 法でそれぞれ確認された。親株との形態の比較では、PC9-MTA では変化を認めなかったが、H1993-MTA は紡錘形に変化していた。PC9-MTA では pERK の増加を認めたが、H1993-MTA では、pEGFR の著明な低下と pMEK の低下、一方で間葉系マーカー蛋白の発現上昇が認められた。PC9-MTA、H1993-MTA で siRNA を用いて FGF2 のノックダウンを行うと部分的にペメトレキセド耐性の回復が認められ、TS のノックダウンでは、著明なペメトレキセド耐性の回復が認められた。また、FGFR 阻害剤 PD173074 の投与により、PC9-MTA では有意な耐性の回復が認められたが、H1993-MTA ではわずかな回復にとどまった。FGF2 抑制または FGFR1 阻害剤により、PC9-MTA では pERK の発現低下を認めたが、H1993-MTA では EGFR と下流のシグナル伝達分子のリン酸化の上昇と EMT マーカーの発現低下を認めた。一方、PC9-MTA、H1993-MTA とともに、FGF2 のノックダウンによる TS 発現の変化は認められなかった。ZEB1 のノックダウンにより、H1993-MTA では Slug や pSmad の発現低下が誘導され、ペメトレキセド感受性は部分的に回復した。

【考察】 今回の結果から、(i) 肺腺癌細胞のペメトレキセド耐性には、TS の発現増加と部分的に FGF2-FGFR 経路の活性化が関与する、(ii) *EGFR* 変異を有する PC9 では、EGFR 経路を介したシグナル伝達を変えることなく、FGF2-FGFR 経路の活性化により MAPK/ERK 経路が活性化されペメトレキセド耐性が誘導される、(iii) 野生型 *EGFR* の H1993 では、EGFR 経路の抑制と FGF2-FGFR 経路の活性化、およびそれにより誘導される EMT がペメトレキセド耐性に関与する、これらの可能性が示唆された。本研究の結果から、肺腺癌細胞がペメトレキセド耐性を獲得する機序は癌細胞の *EGFR* status により異なり、ペメトレキセドと FGFR を標的とした治療の併用が、非小細胞肺癌の新規治療戦略となる可能性が示唆される。