

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 (乙) 第	号	氏 名	寺 井 秀 樹
主 論 文 題 名 Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC (FGF2-FGFR1経路の活性化：非小細胞肺癌のゲフィチニブ耐性獲得における新規メカニズム)				
(内容の要旨) <p>上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞はEGFR-チロシンリン酸化酵素阻害薬 (EGFR-tyrosine kinase inhibitor : EGFR-TKI) に対して高度感受性を示す。しかし、長期間の同薬剤への曝露で耐性獲得が生じることが知られている。その耐性化の機序として、既に複数の報告がある。主要なものとしては、①EGFR遺伝子790番目のアミノ酸であるスレオニンのメチオニン への置換による耐性変異 (T790M) 、②c-METの増幅によるEGFRの下流シグナルの活性化などがあるが、いまだに約30%程度は不明である。</p> <p>我々は肺癌細胞株のEGFR-TKIへの耐性獲得の新たな機序を調べるために、EGFR遺伝子変異を有し、EGFR-TKIに対して感受性のあるPC9肺癌細胞株を用いて実験を行った。</p> <p>まず、PC9 (PC9-NA) をEGFR-TKIの1種であるゲフィチニブを低濃度より徐々に濃度を上げながら約半年間曝露することにより耐性株 (PC9-GR) を作成した。また、その耐性株を限界希釈法によりクローン化してPC9-gr1とPC9-gr3を作成した。これらPC9-GR、-gr1、-gr3においては、上記のEGFR遺伝子の耐性変異 (T790M) やc-METの増幅は認めていないことを確認した。</p> <p>これら4種類の細胞株より抽出したRNAを用いてアレイによる網羅的な発現解析を行った結果、線維芽細胞増殖因子2 (fibroblast growth factor 2 : FGF2) および線維芽細胞増殖因子受容体1 (fibroblast growth factor receptor 1 : FGFR1) のmRNAの発現が、耐性株であるPC9-GR、-gr1、-gr3においてPC9-NAと比較して亢進していた。この変化は、Taqman primerを用いた定量的PCRによっても確かめられた。</p> <p>さらにウエスタンブロットを用いた解析で、PC9-GR、-gr1におけるFGFR1の蛋白レベルでの発現がPC9-NAと比較して亢進していることを確かめた。また、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assayを用いた解析で、PC9-GR、-gr1におけるFGF2の蛋白レベルでの発現がPC9-NAと比較して亢進していることを確かめた。</p> <p>そこで、このFGF2、FGFR1の発現亢進とEGFR-TKIへの耐性化との関与を調べるために、FGFRの阻害剤の一種であるPD173074を用いて実験を行った。PC9-GR、-gr1、-gr3といった耐性株では、PD173074と併用することでゲフィチニブへの感受性が回復した。また、これらの耐性株ではFGF2もしくはFGFR1に対するsmall interfering RNAを用いた遺伝子発現抑制によってもゲフィチニブへの感受性が回復した。PC9-GRを用いたウエスタンブロットによる下流のシグナルの解析においては、ゲフィチニブ単独では抑制されなかったAKTやERKのリン酸化が、PD173074を同時に加えることで抑制されることが確かめられた。また、Fluorescence Activated Cell Sorterを用いた解析でも、PC9-GRにおいてはゲフィチニブ単独と比較してPD173074を同時に加えることで、アポトーシスが強く誘導されることが判明した。</p> <p>FGF2-FGFR1経路の活性化は、EGFR遺伝子変異をもたない肺癌細胞におけるEGFR-TKIへの先天的な耐性化の機序のひとつとしてこれまでに報告されている。本報告では、新たにEGFR遺伝子変異を持つ肺癌細胞株において、EGFR-TKIへの耐性獲得の機序のひとつとしてFGF2-FGFR1経路の活性化が存在しうることを示した。</p> <p>以上より本細胞株ではこれまで報告されていない、FGF2-FGFR1経路の活性化によるゲフィチニブへの耐性獲得が起こっていることが考えられた。</p>				