



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1485号
学位記番号	第1071号
氏名	吉田 達哉
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment induce primary resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma with EGFR mutation (ポドプラニン陽性がん関連繊維芽細胞は、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の初期耐性を誘導する)</p> <p>Clin Cancer Res. 2015 Feb 1;21(3):642-51</p>
論文審査担当者	主査： 中西 真 副査： 飯田 真介, 新実 彰男

論文内容の要旨

EGFR(epidermal growth factor receptor)は、上皮細胞の膜上に存在する膜貫通型受容体チロシンキナーゼで、チロシンキナーゼ領域が自己リン酸化することで癌細胞の増殖・進展に深く関わる事が知られており、がん治療の標的分子として治療薬の開発がすすめられてきた。

Gefitinib, Erlotinib などの EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は、EGFR 細胞内領域の ATP 結合部位で ATP と競合し結合することで、チロシンキナーゼの活性化を阻害して、EGFR の自己リン酸化を阻害する。これによって、がん細胞の増殖、進展に関わるシグナル伝達が遮断され、抗腫瘍効果を発揮する。

当初、EGFR-TKI の効果予測因子は、女性、腺がん、非喫煙者、人種(東アジア人)と考えられていたが、2004年にEGFR遺伝子変異が発見され、このEGFR遺伝子変異を有する肺癌に対して、EGFR-TKIが薬剤感受性を有することが報告された。現在までにEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌(NSCLC)患者を対象として、初回治療のEGFR-TKIと従来の標準治療であるプラチナ併用療法を比較した第Ⅲ相試験が複数報告されている。いずれの試験においても、EGFR-TKI群が、有意に無増悪生存期間で良好な結果が報告され、EGFR遺伝子変異を有するNSCLC患者に対してEGFR-TKIは標準治療となっている。

しかし同じEGFR遺伝子変異を有する患者でもEGFR-TKIの治療効果は異なり、20-30%は初期耐性を示す。さらに治療開始から約1年程度でほとんどすべての患者で獲得耐性を示し、初期耐性と獲得耐性の克服が今後の課題となっている。EGFR-TKI治療に対する獲得耐性機構としては、これまでT790Mなどの耐性変異の他に、MET遺伝子増悪やHGF過剰発現が知られている。一方、EGFR-TKIの初期抵抗性については、治療前に耐性変異であるT790Mが存在することや、BIM欠失の関与などが報告されている。また最近では、がん関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)などのがん間質細胞が、分子標的薬の感受性に影響を与えることが報告されている。

これまで我々は、肺癌のCAFに注目して研究を行ってきた。特に podoplanin (PDPN)が発現しているCAFを有する肺腺癌の患者は、予後不良であることを報告してきた。さらにこのPDPN-CAFが、肺腺癌の組織型である solid predominant で、他の組織型に比べて発現量が高いことを明らかにしている。また術後再発例において solid predominant の肺腺癌では、他の組織型と比較してEGFR-TKIの治療効果が不良であることを示してきた。以上の背景より、本研究では、PDPN-CAFが、EGFR-TKIの感受性にどのように影響を与えるかについて検討した。

まず始めにEGFR遺伝子変異を有するEGFR-TKI感受性株(PC-9)と肺腺癌患者の切除検体より得たCAFを共培養してGefitinibの感受性を検討した。PC-9とCAF(control-CAF)共培養下では、Gefitinibの感受性はPC-9単独の状態より有意に低下した。PDPNを強発現させたCAF(PDPN-CAF)と共培養下では、Gefitinib感受性はさらに低下した。一方でPDPNをshRNAにてknock downしたCAF(sh PDPN CAF)を作成して共培養するとGefitinib感受性は有意に改善した。以上のことより、PDPNは、CAFの機能分子であることが証明された。

次に作用機序の解析として、FACSを使用してEGFR downstream signaling pathwayの検討を行った。PDPN-CAF共培養下では、Control CAFと比較してGefitinibによるp-ERK levelの低下が有意に抑制される結果であった。このことからPDPN-CAFが、EGFR downstream signaling pathwayに有意に寄与して、Gefitinibの抵抗性を示していることが明らかになった。さらに初回治療としてEGFR-TKIを使用したEGFR遺伝子変異陽性肺腺癌の術後再発患者106例を対象として、EGFR-TKIの治療効果と切除検体で免疫組織染色によって評価したPDPN-CAFの関係について検討した。奏効割合は、PDPN-CAF陰性患者は83%に対し、陽性患者では53%と有意にPDPN-CAF陽性患者の治療効果が不良であった。また無増悪生存期間(progression free survival: PFS)について検討した結果、有意にPDPN陽性患者が不良な結果であった(9.6 vs. 15.6 ヶ月, $p=0.0099$)。以上の結果より、PDPN-CAFは、EGFR-TKIの感受性に重要な役割を有していることが示唆され、PDPN-CAFは、がん治療の新たな治療標的として考えられた。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】 Gefitinib, Erlotinib などの EGFR(epidermal growth factor receptor)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は、EGFR 細胞内領域の ATP 結合部位で ATP と競合し結合してチロシンキナーゼの活性化、EGFR の自己リン酸化を阻害することでがん細胞の増殖、進展に関わるシグナル伝達を遮断し、抗腫瘍効果を発揮する。2004 年に発見された EGFR 遺伝子変異と EGFR-TKI 感受性との関連が明らかとなり、本変異を有する非小細胞肺癌(NSCLC)患者における従来の標準治療(プラチナ併用療法)を対照とする複数の第Ⅲ相試験で EGFR-TKI が無増悪生存期間の有意な延長を示したため、本治療は EGFR 遺伝子変異を有する NSCLC 患者に対する標準治療となった。しかし本治療の限界として、EGFR 遺伝子変異陽性でも 20-30%の患者が初期耐性、治療開始から約 1 年後には殆ど全ての患者が獲得耐性を示す。獲得耐性の機序には T790M などの耐性変異、MET 遺伝子増悪、HGF 過剰発現、初期抵抗性の機序には治療前の T790M の存在や、BIM 欠失の関与などが知られている。また最近ではがん関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)などのがん間質細胞が分子標的薬の感受性に影響することが報告されている。我々は肺癌の CAF に注目し、podoplanin (PDPN)が発現している CAF を有する肺腺癌が予後不良であること、肺腺癌の組織亜型である solid predominant では他の組織亜型に比べて PDPN-CAF の発現量が高く、術後再発例での EGFR-TKI の効果が不良であることを報告してきた。本研究では、PDPN-CAF が EGFR-TKI の感受性に与える影響を検討した。【方法と結果】まず EGFR 遺伝子変異を有する EGFR-TKI 感受性株(PC-9)と肺腺癌患者の切除検体より得た CAF を共培養して Gefitinib の感受性を検討した。Gefitinib 感受性は、PC-9 と CAF (control-CAF)共培養下で PC-9 単独の状態より有意に低下し、PDPN を強発現させた CAF (PDPN-CAF)と共培養下ではさらに低下したが、PDPN を sh RNA にて knock down した CAF(sh PDPN CAF)と共培養すると有意に改善した。以上より、PDPN が CAF の機能分子であることが証明された。次に FACS を用いた EGFR downstream signaling pathway により作用機序を検討した。PDPN-CAF 共培養下では、Control CAF と比較して Gefitinib による p-ERK level の低下が有意に抑制されたことから、PDPN-CAF が EGFR downstream signaling pathway に寄与することで Gefitinib 抵抗性をもたらすことが明らかになった。さらに初回治療に EGFR-TKI を使用した EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌の術後再発患者 106 例を対象に、EGFR-TKI の効果と切除検体の免疫染色で評価した PDPN-CAF の関連を検討した。PDPN 陽性患者では、奏効率 53%、無増悪生存期間 9.6 カ月であり、PDPN-CAF 陰性患者(各々 83%、15.6 ヶ月)と比較して有意に治療効果が不良であった。【結論】EGFR-TKI 感受性に重要な関与をする PDPN-CAF は、がん治療の新たな治療標的と考えられる。

【審査の内容】主査(中西教授)から「PDPN に着目した理由」「PDPN の発現レベルと EGFR-TKI 感受性との関連」など 8 項目の質問、次に第一副査(飯田教授)から「mutation の検出感度」「mutation のタイプによらず PDPN が関与するのか」など 7 項目の質問、最後に指導教授である第二副査(新実)から「肺癌発症のリスク要因」「肺癌の転移様式」など主科目を中心に 5 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本論文について十分に理解していると同時に、専攻分野(呼吸器内科学)に関する知識を習得していると認めた。以上から本論文の著者は博士(医学)の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 中西 真 副査 飯田 真介、新実 彰男