



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1507号
学位記番号	第1078号
氏名	立松 勉
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451 in vitro (非小細胞肺癌における NTRK1 転座及び NTRK 発現と AZD7451 薬剤感受性の検討)</p> <p>Molecular and Clinical Oncology, 2(5):725-730, Sep 2014</p>
論文審査担当者	主査： 新実 彰男 副査： 高橋 智, 中西 良一

論文内容の要旨

【背景および目的】

近年、分子標的治療薬の進歩により肺癌治療の幅が広がってきているが、未だ化学療法に頼らざるを得ない症例が多いのが現状である。こうした中で最近、肺癌における発癌原因・治療標的遺伝子として Neurotrophic tyrosine kinase receptor(以下、NTRK) 1 遺伝子の転座 (MPRIIP-NTRK1、CD74-NTRK1) が報告された。NTRK1 遺伝子は、TRKA タンパクをコードする遺伝子で、NTRK1 の転座により TRKA が活性化され、発癌に導くことが知られている。また、神経内分泌大細胞癌 Large cell neuroendocrine carcinoma(以下、LCNEC)で、TRKB タンパクをコードする NTRK2 や TRKC タンパクをコードする NTRK3 の変異を認めたとの報告もある。今回、我々は当施設で手術された日本の肺癌患者における NTRK1 遺伝子異常や NTRK の発現頻度を調査するとともに、新たな分子標的治療薬の可能性として新規 NTRK 阻害剤 AZD7451 の薬剤感受性について検討した。

【患者と方法】

I. NTRK1 転座と NTRK 発現の検索

当施設で切除された非小細胞肺癌 Non-small-cell lung cancer (以下、NSCLC) 268 例 (腺癌 198 例、扁平上皮癌 70 例) の凍結腫瘍組織から Total RNA を抽出し、RT-PCR、ダイレクトシーケンシングで NTRK1 転座、NTRK 発現を検索した。

II. 免疫染色による NTRK1/2 発現の検索

免疫染色で TRKA/B タンパク発現を検索した。

III. 定量的 PCR による NTRK1-3 発現の評価

NTRK1 転座を持つ結腸癌細胞株である KM-12 と NTRK2 高発現が報告されている LCNEC 細胞株である H460, H810 や当施設で切除された LCNEC4 例について、定量的 PCR を施行し、NTRK1-3 キナーゼドメインの mRNA level を測定した。

IV. AZD7451 の増殖抑制効果の評価

細胞実験で AZD7451 の細胞増殖抑制効果を検討した。KM-12, H460, H810 それぞれの細胞に AZD7451 投与後、24 時間後の細胞数を測定した。

V. AZD7451 治療による pTRKA/B とその下流シグナルの評価

AZD7451 を投与された細胞株からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングで pTRKA/B とその下流にある pAkt, pERK1/2 のタンパク発現が抑制されるかを検討した。

【結果】

I. 当施設の肺癌患者における NTRK1 転座および NTRK の発現頻度

当施設の症例では NTRK1 転座、NTRK1-3 発現例は認めなかった。

II. 免疫染色による TRKA/B 発現の確認

TRKA では、高発現例は認めなかった。TRKB では肺癌 39 例中 7 例に高発現を認め、そのうち LCNEC 4 例中 1 例に過剰発現例が含まれていた。

III. NTRK1-3 チロシンキナーゼドメインにおける mRNA level の評価

NTRK1 では、KM-12 で高度の、H460 で中等度の mRNA level の上昇を示した。H810 では mRNA level は低かった。NTRK2, 3 では、mRNA level の増加をほとんど認めなかった。LCNEC4 例の mRNA level の腫瘍/正常組織比 (T/N 比) >1 の症例は認めなかった。

IV. AZD7451 の増殖抑制効果の評価

AZD7451 で治療した 3 細胞の細胞増殖抑制効果について検討した。KM-12 と H460 は、コントロールに比べ、1nM 以上で細胞増殖抑制効果を示した。H810 では細胞増殖は抑制されなかった。

V. AZD7451 治療後の pTRKA/B とその下流シグナルの評価

AZD7451 治療後の細胞タンパクを用いてウェスタンブロッティングを施行した。KM-12 では pTRKA Tyr490 と pAkt が濃度依存性に抑制された。H460 では total TRKB の高発現を認め、NTRK2 発現があると証明した。また、pTRKB Tyr706/707 と pERK が濃度依存性に抑制された。H810 では、TRKA/B の発現を認めなかった。

【考察】

Vaishnavi らは NSCLC 91 例中 3 例(3.3%)に NTRK1 転座を認めたことを報告し、Marchetti らは LCNEC29 例中 9 例 (31%) に NTRK2, 3 変異を認めたことを報告した。今回、我々は当施設で手術された日本の肺癌患者におけるこれらの遺伝子異常の頻度につき検討したが、NSCLC 268 例中 1 例も NTRK1 転座や NTRK 変異を認めなかった。この理由として、これらの遺伝子異常が欧米人に比べ、日本人で極めて稀である可能性が考えられた。しかしながら、我々は、NTRK 阻害剤 AZD7451 が NTRK1 転座あるいは NTRK2 発現を持つ細胞の TRK のリン酸化とその下流シグナルを抑制し、細胞増殖を抑制することを示した。NTRK2 とそのリガンドである BDNF は、神経内分泌腫瘍、特に LCNEC で高発現を認め、腫瘍の増殖に関連していることが報告されている。LCNEC は一般的に予後不良で標準的な癌治療の他にオプションがない状況である。よって AZD7451 が今後、肺癌、特に LCNEC の治療薬として有用となる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

【発表の概略】 Vaishnavi らにより Non-small-cell lung cancer (以下 NSCLC)91 例中 3 例 (3.3%)に Neurotrophic tyrosine receptor kinase (以下 NTRK)1 遺伝子の転座と、Marchetti らによる肺の Large cell neuroendocrine carcinoma(以下 LCNEC)29 例中 9 例 (31%)に見られた NTRK2, 3 遺伝子の変異が発癌原因遺伝子として報告され、NTRK 遺伝子を標的とした治療が注目されている。そこで当施設の NTRK1 転座を検討したところ、NSCLC 268 例中 1 例も認められなかった。次に、定量的 PCR で NTRK1-3 の発現を検索したところ、腺癌では NTRK1 で 74 例中 4 例、NTRK2 で 66 例中 3 例、NTRK3 で 62 例中 1 例の発現上昇を認めたが、LCNEC では 4 例とも発現上昇を認めなかった。続いて免疫染色でタンパク発現を検索したところ、TRKA では肺癌 61 例中 1 例も陽性例を認めず、TRKB では肺癌 39 例 (LCNEC4 例を含む) 中 7 例に高発現を認め、うち 1 例は LCNEC 症例であった。次に、NTRK1 転座を持つ結腸癌細胞株 KM-12 と NTRK2 高発現が報告されている LCNEC 細胞株 H460, H810 の 3 細胞株を用いて新規 TRK 阻害剤 AZD7451 の薬剤感受性について検討を加えた。3 細胞株における NTRK1-3 発現の有無を推測するため mRNA level を測定すると、NTRK1 は KM-12 で高度の、H460 で中等度の mRNA level の上昇を示したが、NTRK2, 3 では 3 細胞株とも殆ど増加を示さなかった。次に 3 細胞株における AZD7451 の細胞増殖抑制効果を検討したところ、KM-12 と H460 は細胞増殖抑制効果を示したが H810 では抑制されなかった。続いて AZD7451 投与後の pTRKA/B とその下流の pAkt, pERK1/2 タンパク発現について Western blotting を用いて検討した。結果、KM-12 では TRKA 発現があり、pTRKA と pAkt が濃度依存性に抑制され、H460 では TRKB 発現があり、pTRKB と pERK が濃度依存性に抑制された。H810 では TRKA/B 発現は認められなかった。この結果、AZD7451 が NTRK1 転座および NTRK2 発現細胞株の TRK のリン酸化と下流シグナルを抑制し、細胞増殖を抑制することが示された。以上より、NTRK1 転座は欧米人に比べ日本人で頻度が稀な可能性、AZD7451 等の TRK 阻害剤が今後 NTRK1 転座肺癌や LCNEC 治療の選択肢となる可能性が示唆された。

【審議の内容】 主査の新実教授より、①NTRK1 転座に着目した根拠、②NTRK1 転座について日本の他施設で検討されているか、③正常組織で mRNA level が高いため治療薬の副作用が強くなる可能性、④AZD7451 は pan-TRK inhibitor であるが選択的 inhibitor はあるか、⑤小細胞肺癌に対する検討は行ったか、⑥今回の研究結果を今度どのように発展させていく予定か、等の質問があった。次に副査の高橋教授から①2013 年の共同研究で当院の症例は何例か、②NTRK の変異については検索したか、③NTRK 発現の検討で症例数にばらつきがあるのはなぜか、④mRNA level 高値の評価として tumor/normal > 1 は妥当か、⑤腺癌で mRNA level 高値でも免疫染色が陰性なのはなぜか、⑥AZD7451 の細胞実験で標準偏差を算出したか、⑦Real time PCR の測定回数、⑧免疫染色の評価法、等の質問があった。同じく副査の中西教授より①肺癌に対する組織型、ステージ別の外科治療戦略について、②今回の研究の意義は何か、等の質問があった。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本研究領域について深く理解するとともに、専門分野に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者に博士 (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 新実 彰男 副査 高橋 智 中西 良一