

富永 哲郎 論文内容の要旨

主 論 文

Epidermal growth factor signals regulate dihydropyrimidine dehydrogenase expression in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer

EGFR 変異型非小細胞肺癌における EGF シグナルの DPD 発現調整

富永哲郎、土谷智史、持永浩史、荒井淳一、山崎直哉、松本桂太郎、宮崎拓郎、長寄寿矢、七島篤志、塚元和弘、永安武

BMC cancer. 2016 Jun 6;16(1):354.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永安 武 教授)

緒 言

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor ; EGFR) のリン酸化酵素阻害剤 (EGFR-TKI) は、非小細胞肺癌 (Non-Small-Cell Lung Cancer ; NSCLC) におけるキードラッグであり、EGFR 変異を持つ NSCLC に効果がある。一方、代謝拮抗剤である 5-fluorouracil (5-FU) も NSCLC に対して有効な薬剤の一つである。Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は 5-FU に変性をきたす代謝酵素の一つであり、その発現が高いほど 5-FU 系抗癌剤の効果が抑制される。

われわれはこれまでの研究において、NSCLC の術後補助療法として 5-FU を内服した臨床症例を解析し、EGFR 変異と DPD 発現に関連性があることを示した。また、細胞株実験において、EGFR 変異を有する細胞株で DPD が高発現する傾向を認めた。しかし、EGFR 変異と DPD 発現を関連付ける詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、今回 EGFR カスケード、DPD 遺伝子の恒常的な発現を調整する転写因子の一つである Specificity protein 1 (Sp1) に注目し、DPD 発現との関連について細胞株を用いて検討した。

対象と方法

対象

EGFR 変異形式の異なる 5 つの NSCLC 細胞株を使用した (EGFR 変異株 (PC9, HCC827; exon19 E746-A750 (EGFR-TKI 感受性)、H1975; exon21 L858R, T790M (EGFR-TKI 耐性)、EGFR 野生株 (H1437, H1299 (EGFR-TKI 抵抗性)))。

方法

① EGFR カスケードと DPD のクロストーク解明

EGFR カスケードの activator として EGF を使用した。inhibitor は、カスケードの

上流を抑制する EGFR-TKI と下流で転写因子を抑制する mithramycin A を使用した。上記薬剤を投与した細胞から RNA を抽出し定量的 PCR 法で Sp1/DPD の mRNA 発現を評価した。また、細胞からタンパクを抽出し Sp1/DPD とその上流に存在する因子 (Extracellular signal-regulated kinase ; ERK) のリン酸化および発現を Western blot 法にて評価した。

② EGFR 変異の有無における EGFR カスケード反応性の相違

EGFR 変異株/野生株 (PC9、HCC827、H1975/H1437、H1299) のそれぞれに薬剤投与を行った後、EGFR カスケード内のシグナルリン酸化、および Sp1/DPD の発現を Western blot 法にて評価した。

③ NSCLC 細胞株に対する薬剤併用投与の影響と有効性

各細胞株に対し 5-FU 単剤、5-FU+inhibitor (EGFR-TKI・mithramycin A) の併用投与を行い cell viability を WST-1 cell proliferation assay system を用いて評価した。

結 果

- ・カスケードの検索では、PC9 で EGF 投与により Sp1/DPD のタンパク発現が濃度依存性に増加し、EGFR-TKI・mithramycin A 投与により発現が抑制された。また、上記 inhibitor 投与により Sp1 の転写活性が抑制された。
- ・EGFR 変異形式の異なる NSCLC 細胞株において、EGF 投与は EGFR 変異株のみで DPD の mRNA 発現を増加させた。
- ・EGFR-TKI・mithramycin A 投与は、EGFR 野生株と比較し EGFR 変異株において有意にアポトーシスを誘導し、Sp1/DPD のタンパク発現を抑制していた。
- ・5-FU 投与は EGFR 変異株と比較し、DPD 発現の低い EGFR 野生株において有意に細胞増殖を抑制した。
- ・5-FU に対して抵抗性を示す EGFR 変異株においては、5-FU と EGFR-TKI・mithramycin A の併用投与を行うことで、著明な細胞増殖抑制効果をもたらした。

考 察

本研究において EGFR シグナルカスケードが転写因子 Sp1 を介して DPD の発現に関与していることが明らかとなった。また、EGFR 野生株と比較し変異株において DPD のタンパク発現が高く、EGFR 変異を有する患者が 5-FU に抵抗性を示す過去の報告を支持するものであった。上記カスケードは主に EGFR 変異株において発現し、野生型では殆ど活性化されていないものと考えられた。これらの結果から、EGFR 野生型の患者には 5-FU 単剤治療、EGFR 変異型の患者には 5-FU+EGFR-TKI、EGFR-TKI に耐性 (T790M) を有する患者には 5-FU+mithramycin A の治療が有効と考えられる。本研究は、5-FU を用いた NSCLC 患者治療の個別化を考えるうえで有用と思われた。