

(様式4)

学位論文の内容の要旨

高橋 理充 印

(学位論文のタイトル)

Increased c-SRC expression is involved in acquired resistance to lenvatinib in hepatocellular carcinoma

(c-SRCの発現増加が肝細胞癌のレンバチニブに対する耐性獲得に関与する)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

肝臓癌は世界において悪性腫瘍による部位別死亡者数の第3位であり、予後不良の疾患としてより効果的な治療法の開発が強く求められている疾患の一つである。2025年までに毎年100万人以上が肝臓癌に罹患すると推定されており、その約90%を肝細胞癌が占めている。肝細胞癌の多くは進行癌になるまでその症状が現れないため、診断時には進行性肝細胞癌 (BCLC分類C) の状態であることが多く、その治療は薬物療法が中心となる。さらに、早期の肝細胞癌に対しては手術やアブレーションなどの根治的な治療が行われるが、その後2年以内に半数以上が再発や転移により薬物療法を中心とした治療に移行する。切除不能進行肝細胞癌に対してはレンバチニブやソラフェニブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブなどの分子標的薬が有用とされ、特にレンバチニブやソラフェニブなどの経口分子標的薬が多く肝細胞癌患者に対する一次治療において使用されている。レンバチニブは同じ経口マルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブと比較して病勢コントロール率 (complete response (CR) +partial response (PR) +stable disease (SD) の割合)、奏効率 (CR+PRの割合)、無増悪生存期間の中央値、無増悪期間の中央値ともに有意に良好 (それぞれ75.5% vs 60.5%, 24.1% vs 9.2%, 7.4か月 vs 3.7か月, 8.9か月 vs 3.7か月) な結果を示すことが報告されている。一方で、レンバチニブによる治療を開始して効果が認められた患者の中で、1年以内に腫瘍の増殖または転移が見られる患者は50%以上に上り、獲得耐性の発現は解決すべき重要な臨床問題である。本研究では肝細胞癌がレンバチニブに対して耐性を獲得する機序の解明および、抵抗性を解除する方法の構築を目的とした。

始めにレンバチニブに対して感受性の高い肝細胞癌由来細胞株であるJHH-7にレンバチニブを長期間曝露することで耐性株 (JHH-7_LR) を作成した。培地中濃度を0.5 μM から1年間かけて40 μM まで徐々に上昇させることで IC_{50} は0.56 μM から41.3 μM まで上昇し、約70倍の抵抗性を獲得した。その後、レンバチニブ感受性株および耐性株の細胞質タンパク質を抽出し、還元アルキル化・トリプシン処理および脱塩・濃縮処理を行い、LC/MSによるプロテオーム解析を行った。Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra (SWATH) 解析の結果、4,013個のペプチドが検出され、1,323個のタンパク質が同定された。そのうち、すべてのサンプルで定量値が得られた1,321個のタンパク質について解析を行った。抵抗性獲得に伴い、統計的に有意 (q 値 <0.05) かつ発現量が2倍以上に増加したタンパク質が115個、2分の1以下に低下したタンパク質が152個確認された。プロテオーム解析において発現量の変化が大きかった267個のタ

ンパク質に対してパスウェイ解析を行ったところ、124個のシグナル経路が抽出された。シグナル経路に含まれるタンパク質の数や割合に基づいて算出される $-\log(p\text{値})$ が高い10個のsignal pathwayを抽出し、経路に含まれるタンパク質の中で発現量の変化が大きかった上位10個のタンパク質を抽出した。これらのタンパク質の中で、酵素活性を有し、かつ複数の経路に関与する分子としてc-SRC、Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1、Nucleoside diphosphate kinase A、Serine hydroxymethyltransferase、cytosolic、Serine hydroxymethyltransferase、mitochondrialが見出され、各タンパク質は耐性獲得により、それぞれ5.44、0.45、0.34、0.42、2.0倍に変動した。cadherin-2やNAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1、Filamin-Aの耐性獲得による発現量の変化はそれぞれ15.91、0.02、0.14倍であり、c-SRCの発現量の変化より大きかったが、上位10個のpathwayの中で単一のシグナル経路のみに関与していた。そのため、他のチロシンキナーゼの耐性に関与する可能性があるタンパク質として報告があるc-SRCに注目し、解析を行った。SRC阻害剤であるダサチニブを耐性株に添加し、レンバチニブの効果を確認したところ、感受性株とは異なりレンバチニブの IC_{50} の低下が確認された。これにより、c-SRCを阻害することで、部分的ではあるが耐性株のレンバチニブに対する感受性が回復することが分かった。

Murakamiらは別のチロシンキナーゼ阻害薬であるアフアチニブの長期曝露によって作成したアフアチニブ耐性非小細胞肺癌由来細胞株に対して、ダサチニブを添加することでアフアチニブ抵抗性が一部解除されることを示しており、本研究の結果はその結果と一致している。しかし、ダサチニブは獲得した薬剤耐性細胞株のレンバチニブおよびアフアチニブに対する感受性を完全には回復しなかった。ダサチニブがレンバチニブの感受性を完全に回復できない理由は2つ考えられる。まず、c-SRCリン酸化の阻害に必要な培地中のダサチニブの濃度は細胞株によって異なるため、JHH-7_LR細胞ではc-SRCを十分に阻害できなかった可能性がある。この点に関しては、JHH-7_LR細胞のレンバチニブ感受性に対する、より強力なc-SRC阻害剤の影響を評価することが必要である。次に、c-SRC関連経路以外の経路も同時にレンバチニブ耐性の発現に影響を与えている可能性があるため、他の経路の関与をより詳細に研究する必要がある。結論として、我々は肝細胞癌由来細胞株であるJHH-7に対してレンバチニブを長期曝露することによってレンバチニブに対する抵抗性を獲得する際、c-SRCの活性化が影響している可能性を初めて明らかにした。また、c-SRC阻害剤であるダサチニブを曝露することによって、レンバチニブ長期曝露によって発現したレンバチニブ抵抗性を一部解除できることがわかった。今後、レンバチニブ耐性化に伴うc-SRC活性化の機序について詳細に検討することで、より効果的なレンバチニブ抵抗性解除方法の構築につながることを期待される。