

(様式4)

学位論文の内容の要旨

中村 浩規 印

(学位論文のタイトル)

Exploration of proteins involved in acquisition of resistance to cetuximab

(後天的セツキシマブ耐性獲得に関与するタンパク質の探索)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

大腸がんの治療は大きく内視鏡、手術、局所療法、全身化学療法に分けられ、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対しては主に全身化学療法が行われる。全身化学療法に用いられる薬剤の中でも、セツキシマブなどの抗上皮成長因子受容体モノクローナル抗体薬 (anti-EGFR Mab) は *KRAS* 野生型大腸がん患者の約半数に対して効果を示すと報告されており、大腸がん治療におけるキードラッグとなっている。一方、anti-EGFR Mab による治療効果が長期的に認められるのは *KRAS* 野生型大腸がん患者のうち 20% 未満であることも報告されており、後天的耐性の出現が臨床において深刻な問題となっている。セツキシマブに対する後天的耐性化には RAS-RAF-MEK-MAPK シグナル伝達経路等が関与していると報告されているが、後天的耐性化に対する有効な対策は未だ構築されていない。また、これらの報告は特定のシグナル伝達経路に焦点を当てた検討に基づいており、各研究で解析対象とされたタンパク質以外の関与については十分に検討されていない。このような一部のタンパク質のみを解析対象とする研究に対し、近年、肺がんや子宮がんの分野において、エルロチニブやシスプラチンの効果予測因子探索のための網羅的なプロテオミクスアプローチが行われ、多くの効果予測因子が報告されている。そこで本研究では、セツキシマブに対する後天的耐性化克服に向けた手段を確立することを目的として、セツキシマブ感受性および後天的耐性細胞株を用いたプロテオミクスアプローチによる網羅的タンパク解析を行い、後天的耐性獲得機構に関連する因子を探索した。

セツキシマブに対する耐性獲得細胞株 (C99-CR、SW48-CR) は、セツキシマブの効果に影響を与えると報告されている遺伝的要因を有さないセツキシマブ感受性大腸がん細胞株 (SW48とC99) にセツキシマブを継続的に曝露することで構築した。各細胞株 (C99、C99-CR、SW48、SW48-CR) から抽出した細胞由来タンパク質は、還元・アルキル化処理後にトリプシンを用いた断片化処理を行い、固相カラムを用いて脱塩濃縮した。得られたサンプルを対象に、Nano-Flow LC/Triple TOF MS を用い、Data independent 解析の一種である Sequential Window Acquisition of All Theoretica

1 Mass Spectra (SWATH) 解析による網羅的解析を実施し、各細胞株が発現するタンパク質を検出した。

セツキシマブの継続的曝露により、100 倍以上の IC_{50} 値を有するセツキシマブ耐性獲得細胞株が樹立された。また、4 種の細胞株から抽出したタンパク質を対象とした SWATH 解析によって、20,895 種のフラグメントイオンピークが検出され、4,179 種のペプチドおよびそれらによって構成される 1,294 種のタンパク質が同定および定量された。同定されたタンパク質について耐性化前後における発現量を比較した結果、C99 では耐性化によって 95 種のタンパク質の発現量が 2 倍以上に増加しており、10 倍以上に増加した 33 種のタンパク質のうちの 3 種は解糖系や糖新生に関連するタンパク質であった。一方、耐性化によって 230 種のタンパク質の発現量が半分以下に減少しており、10 分の 1 以下に減少した 29 種のタンパク質のうちの 3 種はスプライソソームに関連するタンパク質であった。SW48 では、耐性化によって 91 種のタンパク質の発現量が 2 倍以上に増加しており、そのうちの 30 種の発現量は 10 倍以上に増加したが、それらのタンパク質に共通する機能や関連パスウェイは認められなかった。また、耐性化によって 147 種のタンパク質の発現量が半分以下に減少しており、20 種の発現量は 10 分の 1 以下に減少したが、共通する機能や関連パスウェイは認められなかった。C99 と SW48 の両細胞株において耐性化によって共に発現量が 10 倍以上に上昇したタンパク質として、deoxycytidine kinase (dCK) と zink finger and BTB domain-containing protein 41 (ZBTB41) が検出され、両細胞株において耐性化によって共に発現量が10分の1以下に低下したタンパク質として dual specificity protein phosphatase 3 (DUS3) が検出された。dCK はデオキシリボヌクレオシドやデオキシリボヌクレオシドアナログのリン酸化に関与しており、dCK の過剰発現はシタラビンやゲムシタビンなどのヌクレオシドアナログの臨床効果の指標となることが報告されている。今回、我々はセツキシマブに対する後天的耐性獲得大腸がん細胞株において dCK が過剰発現していることを初めて発見した。本結果より、dCK によって活性化されるヌクレオシドアナログがセツキシマブに対する後天的耐性を生じた大腸がんの治療に有効である可能性が示唆された。一方、ZBTB41 の過剰発現は肝臓がんにおける予後不良因子であることが報告されているが、ZBTB41 の発現量の増加と大腸がんの予後との関連や、大腸がんに対する化学療法感受性との関連に関する報告はなく、DUS3 の発現量の低下とそれらの関係についても検討されていない。また、C99 において、耐性化によって解糖系および糖新生に関連するタンパク質の発現量の増加が確認されたが、SW48 では同様の傾向が確認されなかったことから、これらは細胞株特異的な現象であると考えられ、耐性化克服のための治療ターゲットには成り難いと考えられた。今後は、さらに多くの後天的耐性大腸がん細胞におけるタンパク質発現量の変化を探索するとともに、セツキシマブに対する後天的耐性を生じた大腸がんの治療におけるシタラビンやゲムシタビンなどのヌクレオシドアナログの有用性を明らかにし、ZBTB41 および DUS3 の発現量調節がセツキシマブの感受性に与える影響を評価することが重要と考えられる。