

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

長嶺 歩 印

(学位論文のタイトル)

L-Lactate dehydrogenase B may be a predictive marker for sensitivity to anti-EGFR monoclonal antibodies in colorectal cancer cell lines

(乳酸脱水素酵素 B は大腸癌細胞株に対する抗 EGFR 抗体薬の効果予測マーカーとなり得る)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

*KRAS* 遺伝子変異は抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体薬の効果に最も大きな影響を与える因子であり、*KRAS* 遺伝子変異の有無は抗 EGFR 抗体薬を用いた治療の決定因子とされている。しかしながら、*KRAS* 野生型大腸癌患者の半数以上が抗 EGFR 抗体薬に対して耐性を示すことが知られており、他の遺伝子変異を考慮しても、遺伝子解析のみで治療効果を十分に予測することは困難である。薬物反応性の個人差は、遺伝子変異や mRNA の変動、その他多くの要因の変動の結果として生じる各種タンパク質の種々変化によって引き起こされることから、近年、生体内タンパク質に焦点を当てた効果予測マーカーの探索が広く行われている。一部の低分子の抗癌薬については、薬物抵抗性を反映するマーカータンパク質が報告されているが、抗体薬を対象とした効果予測マーカータンパク質については十分に検討されていない。そこで、大腸癌に対する抗 EGFR 抗体薬の効果予測法を構築することを目的に、抗 EGFR 抗体薬の 1 つであるセツキシマブに対する感受性が異なる複数の大腸癌細胞株由来のタンパク質を網羅的に解析し、セツキシマブの効果予測マーカータンパク質を探索した。

セツキシマブの効果に影響する遺伝子 (*KRAS*、*NRAS*、*BRAF* および *PIK3CA*) が野生型であり、セツキシマブに対する感受性が異なる 6種類の大腸癌細胞株 (感受性株 : C99、SW48、部分耐性株 : HT55、C10、耐性株 : COLO320DM、CAC02) を解析対象とした。各細胞株から抽出した細胞質および細胞膜由来タンパク質を還元アルキル化処理し、トリプシンで断片化したサンプルを LC-TOF MS で解析した。主成分解析と判別分析を用い、感受性株 2 種と耐性株 2 種から検出された成分イオンピークを比較し、感受性株もしくは耐性株に特異的に認められる成分イオンピークを抽出した。次に、抽出された成分イオンピークのうち、そのピーク強度が 6 種類の細胞株におけるセツキシマブに対する感受性 (IC<sub>50</sub>) と有意に相関する成分イオンピークを抽出し、当該成分イオンを構成するタンパク質を MS Fit 解析により検出した。抽出されたタンパク質をセツキシマブの効果予測候補マーカータンパク質として、LC-MS/MS で各細胞における当該タンパク質の発現量を解析した。また、セツキシマブ感受性株にセツキシマブを曝露することでセツキシマブ後天的耐性株を樹立し、耐性獲得に伴う候補マーカータンパク質発現量の変動を解析した。

抗 EGFR 抗体薬に対する感受性と有意に相関する成分イオンピークとして 294 のイオンピークが検出され、これらの分子イオンが構成するタンパク質として、L-Lactate dehydrogenase B (LDHB) が検出された。各細胞中の LDHB タンパク質量を解析したところ、耐性株および部分耐性株 C10 において LDHB の発現量が有意に高かったが、部分耐性株の HT55 では LDHB の高発

現は認められなかった。また、後天的耐性獲得に伴い、LDHB 発現量は有意に上昇した。

本研究では、プロテオーム解析を用いた網羅的解析によりセツキシマブ感受性に LDHB の発現量が関与している可能性を初めて明らかにし、LDHB が大腸癌患者におけるセツキシマブ効果予測バイオマーカーとして有用である可能性を見出した。また、後天的耐性株においても LDHB の高発現が確認されたことから、セツキシマブに対する二次的耐性においても LDHB が重要な因子である可能性が考えられた。LDH は Warburg 効果に関する重要な酵素の 1 つとして知られており、癌細胞における Warburg 効果が抗癌剤の薬物反応性に影響を与えることが報告されている。このことから、LDHB の発現量増加は Warburg 効果を活性化し、セツキシマブの耐性化を誘導していると考えられた。なお、本研究において LDHB タンパク質の発現量増加とセツキシマブに対する抵抗性発現の因果関係は解明できていないが、部分耐性株である HT55 において LDHB タンパク質発現量が低かったことから、耐性化に伴い LDHB が上昇したのではなく、LDHB の上昇に伴い、何らかの変化が生じた結果、セツキシマブに対する耐性が生じたと考えられる。今後は LDHB 発現量が低いにも関わらずセツキシマブに対する感受性が低い細胞株を対象とした解析を行い、LDHB 以外のセツキシマブの効果決定因子を探索するとともに、LDHB の発現量調節がセツキシマブの効果に与える影響を詳細に評価することが重要であり、これにより、大腸癌における LDHB をターゲットとした新たな治療薬の開発および後天的耐性化を回避する新たな治療法の開発につながることを期待される。