

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 宮林 弘至

本研究はヒト切除不能膵癌に対する化学療法として近年注目されているEGFR阻害剤エルロチニブと標準治療薬ゲムシタビンの併用効果とそのメカニズムを解明するため、内因性KrasG12D発現+Tgfr2ノックアウト膵発癌モデルを用いて、ゲムシタビンとエルロチニブが受容体や細胞内のシグナルへ与える影響を検討し、作用機序の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 膵発癌モデルマウスに各薬剤を投与して生存期間を比較すると、平均生存日数はコントロール群52.5日に対し、ゲムシタビン単独群が69日、ゲムシタビン+エルロチニブ併用群が74日とゲムシタビン単独でもコントロールに比較して有意に生存期間を延長したが、エルロチニブを併用することでさらに有意に生存期間が延長することが示された。薬剤投与時の正常膵組織と癌組織の割合を顕微鏡下で算出して比較すると、コントロール群、ゲムシタビン群に比較してゲムシタビン+エルロチニブ併用群で有意に正常組織の割合が高いことが示された。
2. *In vitro*の検討で、KRAS変異のある膵癌細胞でもエルロチニブが増殖抑制効果を持つことが示され、Flow cytometryを用いた検討でエルロチニブが膵癌細胞に対してG1期停止を起こすことが示された。またWestern blot でKRAS変異のある膵癌細胞でもEGFの刺激でEGFR、ERKのリン酸化が増強し、エルロチニブがその活性化を抑制することが示された。
3. マウス膵組織の免疫染色でゲムシタビン単独群ではリン酸化EGFR、リン酸化ERKの活性が見られ、エルロチニブ併用群ではそれが抑制された。さらにマウス膵組織から回収したタンパク溶解液でWestern blotを施行し細胞内シグナル伝達を調べると、ゲムシタビン単独群ではリン酸化ERKの活性が見られ、エルロチニブ併用群ではそれが抑制された。またゲムシタビン単独群ではEGFRの発現が亢進し、エルロチニブ併用群では発現が抑制されることが示された。
4. 膵癌細胞株を用いた*In vitro*の検討で、ゲムシタビン単独で細胞増殖を抑制するが、エルロチニブの併用でさらに増殖を抑制することが示された。またWestern blot で*in vivo*の結果と同様に、ゲムシタビンの投与でリン酸化ERKが活性化し、エルロチニブの

併用で抑制されることが示された。

5. ゲムシタビンによるEGFR-ERK 経路の活性化のメカニズムの解析のため、膵癌細胞株を用いてゲムシタビン投与時のEGFRリガンドのmRNAを定量的RT-PCRで検討すると、ゲムシタビンの投与でK375ではEgfとTgf-aが増加し、Capan-1とCFPAC-1ではEGF、Amphiregulin、TGF-aが増加した。マウス膵組織の溶解液でELISAを施行すると、ゲムシタビン投与群ではコントロール群に比較してAmphiregulin、Egfの分泌が増加していることを確認した。
6. 受容体型チロシンキナーゼリン酸化アレイでは、EGFR高発現のゲムシタビン単独群でリン酸化ERBB2の活性化を認め、エルロチニブ併用でリン酸化ERBB2活性化が抑制された。マウス膵組織の溶解液で施行したWestern blotでも同じ結果が得られ、マウス膵組織の免疫染色では、ゲムシタビン投与群でERBB2の発現亢進を認め、エルロチニブ併用群で発現が低下することが示された。
7. マウス膵癌細胞株を用いたin vitroの検討で、Western blotでゲムシタビンの投与によりERBB2の発現、リン酸化ともに増強し、エルロチニブ併用投与でともに抑制されることが示された。さらに免疫沈降法を用いてEGFRの活性化に伴いEGFRとERBB2のヘテロダイマーが形成され、エルロチニブ併用でそれが抑制されることが示された。

以上、本論文は膵発癌モデルマウスを用いて、KRAS 変異が高率である膵癌におけるEGFR 阻害剤の効果のメカニズムの一端を明らかにすることができた。ゲムシタビン投与群でみられるEGFR/ERBB2とその下流のERKシグナルの活性化をエルロチニブが抑制することを明らかにした。膵癌患者においてEGFRとERBB2が高発現し、かつTGF- β シグナルの破綻した一群が、この併用療法のよい適応であることが示唆される。本研究のような遺伝子改変マウスを用いたトランスレーショナルな研究が、難治癌である膵癌克服のための病態理解や有効な治療法の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。