

論文の内容の要旨

論文題目 新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の耐性因子の同定とその治療への応用

氏名 礒山 翔

がん化学療法において克服すべき重要な問題として、がんの薬剤耐性があげられる。薬剤耐性には、獲得耐性と自然耐性がある。がんの獲得耐性とは、抗がん剤が一旦奏効しても長期間の投与により後に効きにくくなる現象の事である。特にチロシンキナーゼ阻害剤においては、投与開始から1年以内にはほぼすべての症例で獲得耐性となると言われている。この事から、分子標的薬を用いたより効果的ながん治療を行うために、獲得耐性のメカニズムを明らかにし獲得耐性克服の治療法を開発する事が求められている。また、自然耐性がんとは抗がん剤に対して治療開始時より効果が認められないがんの事である。がんは多様で個性がある事から、がん患者の中にはある抗がん剤に対して感受性を示す人と逆に耐性を示す人が存在する。したがって、自然耐性の原因を明らかにし耐性克服の治療法を開発する事で、治療前に予め自然耐性がんを診断し耐性を克服する治療法を提供する事は、がんの個別化医療の観点からも非常に重要である。当研究室では、これまで全薬工業との共同研究で新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 を同定し、がんの分子標的治療薬として開発してきた。PI3K 阻害剤については、現在 ZSTK474 を含む多くの化合物が臨床試験を行っているところであるが、獲得耐性が出現するかどうかや耐性を規定するメカニズムについては明らかにされていない。そこで本研究は、新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 による、より効果的ながん治療法を提案するために、PI3K 阻害剤の耐性の原因を明らかにし、それを基に耐性克服の治療法を開発することを目的として、以下の成果を得た。

1. PI3K 阻害剤獲得耐性モデルの作成とその性状解析

ZSTK474 獲得耐性の *in vitro*

モデルを作成するために、ヒトがん細胞株に ZSTK474 を *in vitro* で約 2 年間暴露した。その結果、10 倍以上に耐性化した 4 つのがん細胞株由来の耐性細胞を得る事に成功した(Fig. 1)。そこで、この獲得耐性細胞の性状解析として、ZSTK474 以外の PI3K 阻害剤や従来型の抗がん剤であるシスプラチンに対する交叉耐性を調べた。その結果、耐性細胞は PI3K 阻害剤に対しては耐性を示したが、シスプラチンに対しては耐性を示さなかった。この事から、この ZSTK474 耐性細胞は PI3K 阻害剤特異的に耐性を示す事が分かった。

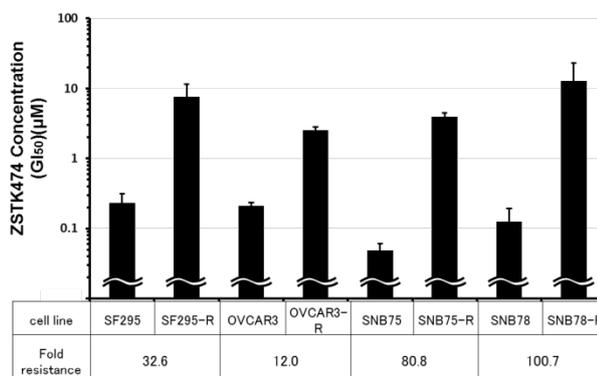


Fig. 1 得られた ZSTK474 獲得耐性細胞の耐性度

2. PI3K 阻害剤獲得耐性の原因遺伝子 IGF1R の同定

チロシンキナーゼ阻害剤の最も高頻度に認められる獲得耐性の原因として、ターゲットのチロシンキナーゼにおけるキナーゼドメイン内の遺伝子変異が知られている。そこで、本研究で得られた PI3K 阻害剤の獲得耐性細胞において、ターゲットである PI3K におけるキナーゼドメイン内の遺伝子変異を確認した。その結果、4 種類の耐性細胞全てにおいて PI3K のキナーゼドメインに新たな遺伝子変異は認められなかった。この事から、この ZSTK474 耐性は PI3K におけるキナーゼドメイン内の遺伝子変異によるものではないことが示唆された。そこで耐性の原因遺伝子を探索するために、マイクロアレイによって親株と耐性細胞の遺伝子発現プロファイルを調査し、耐性細胞で発現が亢進している遺伝子を抽出した。その結果、IGF1R が耐性に関連する遺伝子として得られた。そこで、耐性細胞における IGF1R の発現をタンパクレベルで確認したところ、4 種すべての耐性細胞で IGF1R は親株に比べて強発現していることが分かった。IGF1R は insulin-like growth factor(IGF)の受容体であり、受容体型のチロシンキナーゼである。IGF1R を IGF によって刺激すると IGF1R は自己リン酸化して活性化し、IRS を介して下流の PI3K、MAPK 経路を活性化する事が知られている。そこで、IGF1R 下流の PI3K と MAPK 経路の活性化レベルを調べた。その結果、MAPK 経路については親株と耐性細胞における活性化レベルに違いは認められなかった。一方、PI3K 経路については、耐性細胞において ZSTK474 存在下でもその活性が親株に比べて維持されている事が分かった。次に IGF1R が耐性に機能的に関係しているかどうかを検討するために、siRNA を用いて、IGF1R をノックダウンした際の耐性細胞における ZSTK474 の感受性の変化を調査した。その結果、IGF1R をノックダウンする

ことによって耐性細胞の ZSTK474 感受性が回復する事が分かった(Fig. 2)。また、その時の PI3K シグナルを調べると ZSTK474 の感受性の変化と一致して、IGF1R をノックダウンする事によって耐性細胞における PI3K シグナルがより低濃度の ZSTK474 で抑制

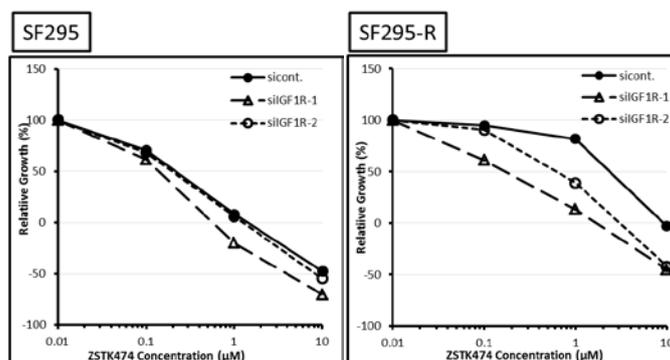


Fig. 2 耐性細胞 SF295-R およびその親株 SF295 細胞の IGF1R をノックダウンする事による、ZSTK474 感受性の変化

された。以上の結果から、耐性の原因は IGF1R の過剰発現によって、ZSTK474 存在下でも PI3K 経路の活性が維持されている事が原因と考えられた。

3. PI3K 阻害剤と IGF1R 阻害剤の併用による PI3K 阻害剤獲得耐性の克服

耐性の治療的観点から、IGF1R 阻害剤によって耐性細胞の ZSTK474 感受性が回復するかどうかを調査した。IGF1R 阻害剤として OSI906 を用いて ZSTK474 と併用した結果、IGF1R 阻害剤を併用することによって耐性細胞特異的に ZSTK474 感受性の明らかな上昇が認められた(Fig. 3)。この事

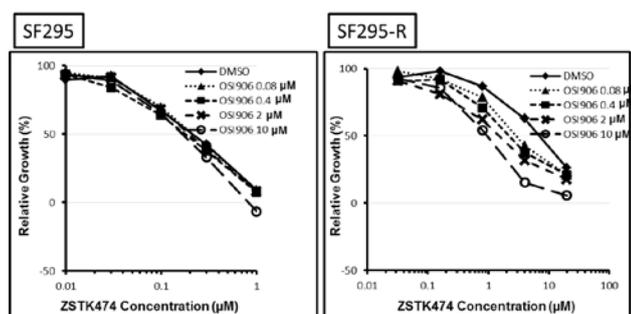


Fig. 3 耐性細胞 SF295-R とその親株 SF295 細胞に対する、IGF1R 阻害剤と ZSTK474 の併用効果

から PI3K 阻害剤耐性を克服する治療法として、IGF1R 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用が有効である事が示唆された。

4. PI3K 阻害剤の自然耐性と IGF1R の関連

PI3K 阻害剤の獲得耐性の原因として IGF1R の過剰発現が同定された事から、IGF1R が PI3K 阻害剤の自然耐性にも関連しているかどうかを検討した。IGF1R の発現量と PI3K 阻害剤の感受性に相関があるかどうかを、ZSTK474 未治療の 39 種類の *in vitro* のがん細胞株を用いて検討した。その結果、有意に IGF1R の発現が高い程 ZSTK474 が効きにくい相関があることが分かった。次に、*in vivo* においても IGF1R の発現と PI3K 阻害剤の感受性に相関が認められるかどうかを、24 種類のがん細胞株由来の xenograft を用いて検討した。その結果、*in vivo* においても IGF1R 発現が高い程 ZSTK474 が効きにくい相関がある事が分かった。この事から、IGF1R の発現は

ZSTK474 の自然耐性にも関連している事が示唆された。

5. PI3K 阻害剤の自然耐性細胞に対する PI3K 阻害剤と IGF1R 阻害剤の併用効果

IGF1R が自然耐性克服の
治療ターゲットとなり得る
かどうかを調べるために、*in vitro* で IGF1R を強発現している自然耐性細胞株 (U251) と IGF1R をほとんど発現していない感受性株 (PC-3) を用いて IGF1R 阻害剤と ZSTK474 の併用効果

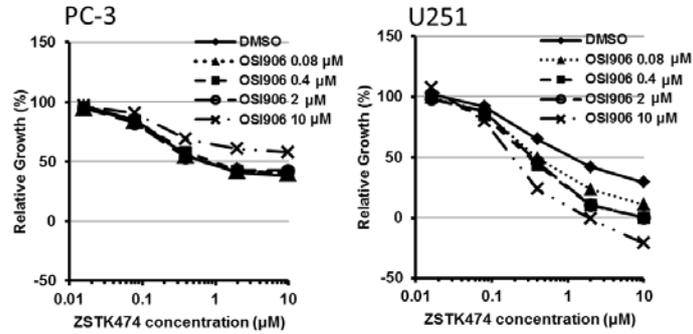


Fig. 4 IGF1R の発現が高い ZSTK474 未治療の自然耐性細胞株に対する、IGF1R 阻害剤と ZSTK474 の併用効果

と同様に、自然耐性細胞株特異的に IGF1R 阻害剤による ZSTK474 感受性の増強が認められた (Fig, 4)。この事から IGF1R は自然耐性においても機能的に ZSTK474 感受性に関係しており、自然耐性の治療法として IGF1R 阻害剤との併用が有効である可能性が示された。

6. まとめ

本研究において、*in vitro* における ZSTK474 の長期暴露によって獲得耐性が生じた事から、臨床においても PI3K 阻害剤の獲得耐性が生じる可能性が示された。また、IGF1R が獲得耐性及び自然耐性に機能的に関与している事を明らかにし、その事から IGF1R は耐性克服の治療ターゲットとなりうる事を示した。さらに、IGF1R の発現と ZSTK474 の感受性が相関する事を見出し、その事から IGF1R は予めその発現量を診断する事で PI3K 阻害剤の感受性を予測する事が出来るバイオマーカー候補となる事が示された。

本研究の成果は、PI3K 阻害剤の耐性機序の解明や耐性克服の治療法の開発、また、PI3K 阻害剤の感受性を予測するバイオマーカーの開発に新たな知見を与えるものであり、PI3K 阻害剤を用いたより効果的ながん治療の実現に貢献出来るものと考えられる。