

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 礒山 翔

「新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の耐性因子の同定とその治療への応用」と題する本論文は、現在開発中の新規分子標的抗がん剤候補である PI3K 阻害物質 ZSTK474 に対する耐性の原因を明らかにし、耐性を克服するための方法を開発し、より効果的ながん治療法を提案する事を目的とする研究の成果を述べたものである。薬剤耐性には、獲得耐性と自然耐性があり、前者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であり、後者はがんの個性の一つと考えられる。自然耐性、獲得耐性共に、それらの原因を明らかにし耐性を克服する方法を開発する事は、がんの個別化医療の観点からも重要である。

本論文の主要な部分は二章から成り、第一章は PI3K 阻害物質に対する獲得耐性モデルの作成、耐性獲得の機構、及び耐性克服法についての研究成果が述べられている。第二章では、PI3K 阻害物質に対するがん細胞の持つ自然耐性とその機構、さらにはその克服法についての研究成果が述べられている。

第一章の最初の部分は、PI3K 阻害物質に対する獲得耐性モデルの作成と得られた耐性細胞の特性についての記述である。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 年間暴露した結果、10 倍以上に耐性化した 4 つの耐性細胞が得られた。この獲得耐性細胞の性状解析として、ZSTK474 以外の PI3K 阻害物質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の有無が検証された。その結果、耐性細胞は PI3K 阻害物質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ず、これらの ZSTK474 耐性細胞は PI3K 阻害物質に特異性を有する事が分かった。

第一章では次に PI3K 阻害物質に対する獲得耐性の原因遺伝子を同定する事が企図された。まず、耐性細胞株において PI3K のキナーゼドメインに変異があるかどうか追究された結果、4種の細胞において、変異が認められなかった。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比較した。その結果、insulin-like growth factor-1 受容体 (IGF1R) が耐性株に高発現している事が判明した。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、PI3K 及び MAPK 経路を活性化する事が知られていたため、これらの活性化レベルを調べたところ、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

かったが、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。siRNA を用いて、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。以上の結果から、得られた耐性細胞株においては 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耐性の原因である事が明らかになった。

第一章では最後に、PI3K 阻害物質と IGF1R 阻害物質の併用によって PI3K 阻害物質に対する獲得耐性が解除出来るかどうかを検証した結果が述べられている。IGF1R 阻害物質として OSI906 を用いて ZSTK474 と併用した結果、耐性細胞特異的に ZSTK474 感受性の上昇が認められ、IGF1R 阻害物質が耐性克服に有効である事が示された。

第二章では、PI3K 阻害物質に対する自然耐性と IGF1R の関連が追究された結果が示されている。PI3K 阻害物質に対する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 の発現レベルが PI3K 阻害剤の自然耐性にも関連しているかどうかを 39 種類のがん細胞株を比較する事によって検討された。その結果、IGF1R の発現が高い細胞では ZSTK474 の効果が低いことが判明した。IGF1R の発現と PI3K 阻害物質に対する感受性の相関が *in vivo* においても認められるかどうかを、24 種類のがん細胞株由来の xenograft を用いて検討された。その結果、*in vivo* においても IGF1R 発現と ZSTK474 への感受性に逆の相関がある事が分かり、IGF1R の発現が ZSTK474 に対する自然耐性と関連している事が示唆された。

第二章の後半では、PI3K 阻害物質に対する自然耐性細胞に IGF1R 阻害物質を併用した際の効果が検証された。ZSTK474 に対する自然耐性細胞株 U251 と感受性株 PC-3 を用いて IGF1R 阻害物質の併用効果を調べた。その結果、獲得耐性を持つ細胞と同様に、自然耐性細胞株においても IGF1R 阻害物質による ZSTK474 感受性の増強が認められた。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 阻害物質との併用が有効である可能性が示された。

本研究によって ZSTK474 への長期暴露によって獲得耐性が生じることが実験的に示されたので、臨床的に使用した際にも PI3K 阻害剤の獲得耐性が生じる可能性が強い。IGF1R が獲得耐性及び自然耐性に機能的に関与している事が示され、IGF1R は PI3K 阻害物質に対する耐性を克服する際のターゲットとして有望である。さらに、IGF1R は予めその発現量を診断する事で PI3K 阻害物質に対する感受性を予測する事が出来るバイオマーカー候補ともなる。本研究の成果は、PI3K 阻害物質を抗がん剤として用いた際の耐性機序を示し、耐性克服法を提示した、また、PI3K 阻害物質に対する感受性を予測するバイオマーカーの開発と言う視点からも新たな知見を与えるものである。以上のように本論文に記述されている研究内容は、新規分子標的抗がん剤の開発に貢献し、その研究内容は、腫瘍学及び創薬科学の発展に資するところが大きい。よってこれを行った磯山 翔は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。