







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 697 号	氏名	内 匠 陽 平
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆 志	
	副査氏名	白石 憲 男	
	副査氏名	白石 裕 士	
論文題目			
<p>MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements          (MET 阻害薬は、NTRK1 または ROS1 融合遺伝子を有する腫瘍において、肝細胞増殖因子により誘導されるエヌトレクチニブに対する抵抗性を克服する)</p>			
論文掲載雑誌名 Cancer Medicine			
論文要旨			
<p>エヌトレクチニブは、NTRK 融合遺伝子を有する固形癌および ROS1 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療に有効な薬剤である。しかし、その有効性は、耐性や獲得抵抗性によって制限されており、そのメカニズムは完全には解明されていない。これまでに腫瘍の微小環境において、腫瘍関連線維芽細胞が産生する肝細胞増殖因子 (HGF) などの成長因子が分子標的薬の感受性に決定的な影響を与えることが報告されている。本研究において、微小環境に存在する腫瘍関連線維芽細胞が産生する成長因子が、エヌトレクチニブに対する感受性に影響を与えるかどうかを検討したところ、HGF が、その受容体である MET を活性化することで、KM12SM 細胞 (NTRK 融合遺伝子を含む) および HCC78 細胞 (ROS1 融合遺伝子を含む) に対して強力にエヌトレクチニブ抵抗性を誘導することが明らかになった。HGF によるエヌトレクチニブ耐性は、<i>in vitro</i> では活性型 HGF 特異的大環状ペプチド HiP-8 と MET 阻害薬であるカプマチニブにより回復した。Western blot によるシグナル解析では、エヌトレクチニブ存在下でも、HGF を投与することで、MET のリン酸化が上昇し、下流シグナルである ERK・AKT のリン酸化も上昇したが、カプマチニブを併用することで MET シグナル経路は抑制された。さらに、HGF を産生する線維芽細胞は、<i>in vitro</i> において、エヌトレクチニブ耐性を促進し、その効果は抗 HGF 抗体によりキャンセルされた。KM12SM と HGF 産生線維芽細胞を接種した皮下腫瘍モデルでは、エヌトレクチニブ単剤では、腫瘍の増殖速度は抑制できたが、縮小には至らなかった。カプマチニブの使用により、腫瘍は縮小し、エヌトレクチニブ抵抗性が克服された。</p> <p>本研究により、NTRK1 や ROS1 融合遺伝子を有する腫瘍のエヌトレクチニブに対する初期耐性は、がん微小環境に存在する HGF などの成長因子によって MET シグナル経路を介して誘導されるという生物学的な基本原理が示された。さらに、抵抗性を誘発する HGF に対して、活性型 HGF 特異的大環状ペプチド HiP-8 や MET 阻害薬であるカプマチニブを最適に併用することで、エヌトレクチニブの治療効果を最大化できる可能性が示された点は、がんの新たな治療戦略につながるものと期待される。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第697号	氏名	内匠陽平
審査委員会委員	主査氏名	小林隆志	
	副査氏名	白石憲男	
	副査氏名	白石裕才	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 実臨床で初期耐性と獲得耐性の出現頻度はどちらが高いか。また、それぞれの特徴を答えよ。</li> <li>2. 分子標的薬耐性の機序としてのレセプターのamplificationについて説明せよ。</li> <li>3. HGFが誘導するエヌトレクチニブ耐性は可逆的か不可逆的か答えよ。</li> <li>4. 一般的に染色体転座はどのような機構で起こるのか説明せよ。また、NTRKとROS1の場合、転座パターンによってエヌトレクチニブに対する抵抗性が変わるのか答えよ。</li> <li>5. 細胞培養に用いたFBSは同一のロットか、細胞溶解に用いた界面活性剤は何か答えよ。</li> <li>6. 使用したヒト正常線維芽細胞のPDL (population doublings level) を答えよ。</li> <li>7. 細胞生存率の評価としてMTTアッセイを用いた理由を説明せよ。また、薬剤による細胞内の代謝の変化がMTTアッセイの結果に影響を及ぼした可能性はないのか答えよ。</li> <li>8. 耐性克服効果がIGFやFGF-2でも部分的にみられたが、それらのdose-responseを検討したか答えよ。</li> <li>9. 成長因子とエヌトレクチニブが直接結合し相互作用を生じる可能性があるのか答えよ。</li> <li>10. KM12SMとHCC78におけるエヌトレクチニブ耐性誘導能はHGFが最も強いと記載されているが、他のがん細胞でも同様なことが言えるのか答えよ。</li> <li>11. エヌトレクチニブは細胞の増殖を抑制しているのか、細胞を殺しているのか答えよ。また、殺しているなら、チロシンキナーゼの阻害で細胞がアポトーシスを起こす機序を説明せよ。</li> <li>12. 図1aでエヌトレクチニブによる細胞生存率が0%に到達していないが、濃度を上げれば完全に死滅するのか、それとも一部増殖を停止したまま生存し続けるのか答えよ。</li> <li>13. HCC78においてHGF刺激によるMETのリン酸化がみられなかった理由として、細胞を溶解するタイミングを挙げているが、これについて詳細を説明せよ。</li> <li>14. 結果にHCC78は高レベルでMETを発現していると記載されているが、図1bの写真ではそのように見えない。これについて説明せよ。</li> <li>15. エヌトレクチニブ投与群のマウスに移入した癌細胞は、17日目以降も増殖は抑制されるのか？やがて増殖するのか？MET阻害剤投与群ではどうなるのか説明せよ。</li> <li>16. 分子標的薬の初期耐性機序として腫瘍内の線維芽細胞から分泌されるHCGの可能性を考察しているが、癌患者の血中HGF濃度を測定することについてどのように考えるか答えよ。</li> <li>17. 今回の結果が、使用したがん細胞株特異的でないことを示すにはどうしたら良いか答えよ。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 内匠 陽平

## 論 文 題 目

MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. (MET 阻害薬は、NTRK1 または ROS1 融合遺伝子を有する腫瘍において、肝細胞増殖因子により誘導されるエントレクチニブに対する抵抗性を克服する)

## 要 旨

【緒言】 エントレクチニブは、NTRK 融合遺伝子を有する固形癌および ROS1 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療に有効な薬剤である。しかし、その有効性は、耐性や獲得抵抗性によって制限されており、そのメカニズムは完全には解明されていない。腫瘍関連線維芽細胞が産生する肝細胞増殖因子 (HGF) など、腫瘍の微小環境が産生する成長因子は、分子標的薬の感受性に決定的な影響を与えることが報告されている。微小環境に存在する腫瘍関連線維芽細胞が産生する成長因子が、エントレクチニブに対する感受性に影響を与えるかどうかを検討した。

【研究対象および方法】 NTRK1 融合遺伝子を有する大腸癌細胞株 (KM12SM) および ROS1 融合遺伝子を有する NSCLC 細胞株 (HCC78) を用い、① HGF によるエントレクチニブ耐性誘導、HGF 産生源として線維芽細胞との共培養、② MET 阻害薬 (カプマチニブ) 併用による細胞増殖抑制試験とシグナル解析、③ in vivo でのエントレクチニブと MET 阻害薬併用の治療実験を行なった。

【結果】他の成長因子と比較して、HGF は、その受容体である MET を活性化することで、KM12SM 細胞および HCC78 細胞に対して、最も強力にエヌトレクチニブ抵抗性を誘導した。HGF によるエヌトレクチニブ耐性は、in vitro では活性型 HGF 特異的大環状ペプチド HiP-8 と MET 阻害薬であるカプマチニブにより回復した。Western blot によるシグナル解析では、エヌトレクチニブ存在下でも、HGF を投与することで、MET のリン酸化が上昇し、下流シグナルである ERK・AKT のリン酸化も上昇したが、カプマチニブを併用により、MET シグナル経路は抑制された。さらに、HGF を産生する線維芽細胞は、in vitro において、エヌトレクチニブ耐性を促進し、その効果は抗 HGF 抗体によりキャンセルされた。KM12SM と HGF 産生線維芽細胞を接種した皮下腫瘍モデルでは、エヌトレクチニブ単剤では、腫瘍の増殖速度は抑制できたが、縮小には至らなかった。カプマチニブの使用により、腫瘍は縮小し、エヌトレクチニブ抵抗性が克服された。

【結語】 HGF などの腫瘍微小環境における成長因子が、NTRK1 や ROS1 融合遺伝子を有する腫瘍において、エヌトレクチニブに対する耐性を誘発する可能性を示唆した。さらに、抵抗性を誘発する成長因子の阻害薬を最適に併用することで、エヌトレクチニブの治療効果を最大化できる可能性が示唆された。