

## 【背景】

肺癌は日本人のがん死亡原因の第 1 位を占め、特に非小細胞肺癌は、肺癌の中でも頻度が高く、進行期の治療成績は十分なものではない。近年、非小細胞肺癌においては EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子などのドライバー遺伝子変異が発見され、それらをターゲットとした分子標的治療が発展し、既存の化学療法に対して優れた治療成績を示している。しかしながら、分子標的治療の効果の多くは一時的であり、耐性化が問題となっている。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の耐性機序としては、EGFR 遺伝子 2 次変異 T790M、MET 遺伝子増幅、小細胞肺癌転化などの耐性化機序が発見され、その耐性克服の戦略が構築されつつある。分子標的製剤の 1 つである MET 阻害薬は、様々ながん腫において、基礎研究、臨床試験にて有効性が報告されている。これまでに、MET 阻害薬の耐性機序として、KRAS 遺伝子増幅、MET 遺伝子 2 次変異などが報告されているが、新規耐性メカニズム解明およびその耐性克服が望まれている。

## 【目的】

非小細胞肺癌に対する MET 阻害薬耐性機序を明らかにし、その耐性克服法を確立することを目的とした。

## 【方法】

10 種類の非小細胞肺癌細胞株 (A549, LC-2/ad, PC-9, PC-14, ABC-1, HCC-827, NCI-H441, NCI-H1648, RERF-LC-MS, EBC-1) を用いた。各細胞株に対する 2 種類の MET 阻害薬 (PHA665752, Crizotinib) に対する感受性を MTS assay 法にて評価し、IC<sub>50</sub> により、感受性株を同定した。感受性株に MET 阻害薬を低濃度から徐々に濃度を上げて暴露し続け、耐性株を樹立した。感受性株、耐性株に対し DNA マイクロアレイ、リン酸化キナーゼアレイ、microRNA アレイにより両群で発現差のある因子を網羅的にスクリーニングし、ウェスタンブロット、real time RT-PCR 法を用いて検証した。

## 【結果】

10 種類の非小細胞肺癌細胞株のうち、EBC-1 のみが MET 阻害薬に対して著しい感受性を示す感受性株であった。EBC-1 は、MET 遺伝子増幅を有する細胞株であり、ウェスタンブロット法にて、MET, p-MET の高発現を確認した。EBC-1 に対して PHA665752 を持続暴露し、MET 阻害薬耐性株 (EBC-1R) を樹立した。ウェスタンブロットにて、EBC1-R においては、EBC-1 と比較して p-MET, MET, KRAS, p-AKT, p-MEK の高発現を認めた。また、EBC1-R では、FISH 法にて KRAS 遺伝子、EGFR 遺伝子のコピー数増加、リン酸化キナーゼアレイにて、FGFR1,2 の高発現を認めた。

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にて、EBC1-R において ABCB1 遺伝子の有意な発現上昇を認め、ウェスタンブロット、real time RT-PCR にてその高発現を確

認した。ABCB1 遺伝子は、薬剤の細胞外への排出に関わる因子であるとともに、癌幹細胞マーカーの1つであることが知られている。耐性株に対し Sphere formation assay を施行し、sphere 数の増加を認めた。また、上皮間葉移行 (EMT) 関連マーカーをウェスタンブロットにて検討したところ、EBC1-R において、間葉系マーカーである Vimentin の上昇を認め、EBC1-R が、幹細胞および EMT の特徴を有する耐性株であることを明らかにした。

MicroRNA アレイでは、ABCB1 遺伝子発現を制御する miR-138 と miR-374a 発現が EBC1-R で低下しており、miR-138 を EBC1-R に過剰発現させることにより、ABCB1 発現抑制および Vimentin 発現低下を認め、ABCB1 は miR-138 の標的遺伝子であることが示された。

EBC1-R に対し、ABCB1 の発現を siRNA および ABCB1 阻害薬 Elacridar にて抑制し、MET 阻害薬に対する感受性を MTS assay にて評価した結果、PHA665752 に対する感受性の回復が得られた。さらに ABCB1 の抑制により、sphere 数減少、E-cadherin 発現上昇、Vimentin 発現低下が認められ、ABCB1 が癌幹細胞および EMT 形成に強く関与し、MET 阻害薬耐性化に寄与していると考えられた。

#### 【結論】

ABCB1 高発現が癌幹細胞および EMT 形成に強く関与し、非小細胞肺癌の MET 阻害薬耐性化に寄与している。ABCB1 阻害は非小細胞肺癌の MET 阻害剤耐性克服の新たな治療戦略になり得ると考えられる。