

学位論文審査の結果の要旨

令和 4年 5月 20日

審査委員	主 査	辻 晃 仁		
	副 主 査	三 木 亨 弘		
	副 主 査	外 形 尚		
願 出 者	専攻	医学専攻	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)
	学籍 番号	18D721	氏名	濱谷 紗江
論 文 題 目	Characterization of cisplatin effects in lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma cells			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

〔 要 旨 〕

【背景と目的】本研究の目的は、レンバチニブ耐性の基礎的なメカニズムを解明し、レンバチニブ耐性肝細胞癌(LR HCC)の治療に貢献しうる薬剤を探索することである。

【方法】1) レンバチニブ耐性のない野生株(WT)のHuh7、Hep3B、Li-7をレンバチニブ存在下で長期培養して耐性株(LR)を樹立した。IC50値で耐性を確認し、Western blot法、リン酸化ヒト受容体チロシンキナーゼ(pRTK) array、micro RNA(miRNA)解析でその特性について検討した。2) LRに対するシスプラチンの抗腫瘍効果とその作用機序についてMTT assay、*in vivo*、flow cytometry、Western blot法、Angiogenesis array、miRNA解析で検討した。

【結果】1) レンバチニブを漸増・長期間暴露することで、LRの作成が可能であった。LRはWTより増殖能が高く、ERKの活性亢進を認めた。pRTKの発現に変化はなかったが、20の有意に異なる発現を示すmiRNAを同定した。2) 主にHuh7のLRにおいて、シスプラチンは*in vitro*と*in vivo*で抗腫瘍効果を示した。シスプラチンはATM/ATR signalingが活性化し、G2/M期細胞周期停止を誘導した。このことはATM/ATR阻害剤であるカフェインの投与によっても示された。Angiogenesis arrayではシスプラチンによりangiogenin、coagulation factor III、IL-8が抑制された。miRNAの発現変化ではシスプラチンによりmiR-15b-5p、miR-16-5p、miR-191-5pがWTとLRに共通して変化しており、抗腫瘍メカニズムに関与していることが示唆された。

【結語】LR HCC株を樹立し、ERKの活性やmiRNAの変化が耐性化メカニズムに関与していることが示唆された。また、シスプラチンはLRにも抗腫瘍効果を示し、シスプラチンを使用したレジメンはレンバチニブの後治療の選択肢となる可能性があり、進行肝細胞癌に対する集学的治療として、新たな併用療法の確立に寄与することが期待される。

令和4年5月20日行われた学位論文委員会において、以下に示す様々な質疑応答が行われた

(1) レンバチニブ以外の分子標的薬で耐性機序が明らかな報告はあるのか。

ソラフェニブの耐性肝細胞癌(HCC)の報告はあり、ERK系の活性亢進が報告されている。

(2) 最初から分子標的薬とTACEの併用を行う有効性などについてどう考えるか。

分子標的薬とTACEの併用の有効性は注目されているが、TACEにより肝予備能が低下するリスクもあるので、腫瘍の大きさや肝機能を考慮して、治療対象を選ぶ必要はあると思う。

(3) 提示された症例ではTACEを施行した後に、レンバチニブの耐性が落ちて、有効だったのか。

肝内病変はレンバチニブに耐性を示したが、転移巣に関してはレンバチニブ有効だったので、肝内病変のみシスプラチンを用いたTACEを行い、転移巣にはレンバチニブを継続できた症例である。

(4) LRを作成のため最大濃度10 μ Mとした根拠はなにか、また生体での濃度との関係はどうか。

LR作成における濃度設定に決まりはない。*in vitro*でVEGFR2を抑制した濃度が1 μ Mという報告や、生体での血中濃度が1 μ Mに近いことから、約10倍の濃度であれば十分な耐性を確立可能と考えた。

(5) ERKはリン酸化しているものを使用しているのか。

リン酸化されたERKを活性型として実験を進めている。

(6) レンバチニブ耐性株を作ったという他の先行論文はあるのか。

レンバチニブ耐性肝細胞癌の報告はまだ少ないが存在する。

(7) 提示された症例は原発性肝癌なのか。

転移を伴う原発性肝癌に対して、レンバチニブ治療中に肝内病変が出現し、シスプラチンを用いたTACEが奏功した症例であった。

(8) シスプラチンを用いたTACEはまだ一般的ではないということか。

一般的に分子標的薬はAdvanced stageに、シスプラチンを用いたTACEはIntermediate stageに行われる。提示した症例は分子標的薬の適応だが、腫瘍の大きさや耐性化などによっては両者を組み合わせた治療が有効な場合もある。

(9) 今回の研究でわかったmiRNAを用いた今後の展望は。

今回WTとLRに共通して変化の見られた3つのmiRNAを患者血清で発現を調べれば、あらかじめシスプラチンが有効かどうかを予測することが可能ではないかと考えている。

(10) レンバチニブが有効な株に、レンバチニブ濃度を上げることによってLRができた理由は。

レンバチニブは本来ERK系を抑制するので、LRでのERKの活性化が耐性メカニズムと関与すると考える。レンバチニブを投与し続けることで、上流のRAS-RAF系の変化や何らかのフィードバック作用などによりERKが亢進したと考えられる。しかし、そのような変化が起こるラインや他のERK系と関連する経路などについてはさらなる検討が必要である。

(11) 今回細胞周期に注目しているが、シスプラチンによりアポトーシスは出ないということか。

アポトーシスについての実験も一部行っている。シスプラチンによりWTではERKが活性化するが、LRでは元々活性化しているERKがさらに活性化することはなかった。シスプラチンはERK系の活性によりアポトーシスを起こすとの報告があり、アポトーシスで生じるCaspase-cleaved CK18をELISA法で検出すると、シスプラチンによりWTではアポトーシスが起り、LRでは起こらないことが示唆された。しかし、まだ検討が不十分であり、今後さらなる実験が必要である。

掲載誌名	Anticancer Research		第 42 巻, 第 3 号
(公表予定) 掲載年月	2022年 3月	出版社(等)名	International Institute of Anticancer Research

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。