

氏 名 (本籍)	やま どり ただ ひろ 山 鳥 忠 宏 (大 阪 府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6238 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	Molecular mechanism of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small cell lung cancers (非小細胞肺癌における Nrf2 依存性細胞増殖の分子機構)
主 査	筑波大学教授 医学博士 浦 山 修
副 査	筑波大学准教授 博士 (医学) 森 下 由紀雄
副 査	筑波大学准教授 医学博士 鬼 塚 正 孝
副 査	筑波大学准教授 博士 (医学) 柳 川 徹

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2) は細胞レベルの酸化ストレスや親電子ストレス応答において基幹となる分子であり、非小細胞肺癌においては高頻度に活性化が認められる。著者らはこれまでに Nrf2 がヒト肺癌細胞の増殖と抗癌剤への耐性を促進することを報告してきた。本研究では、培養細胞を用いて、非小細胞肺癌における Nrf2 の活性化及び Nrf2 依存性の細胞増殖の分子機構を明らかにするとともに、臨床検体も用いて特に上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) を介するシグナリング機構について検討した。

(対象と方法)

3 種類の非小細胞肺癌細胞株 NCI-H292 細胞、PC-9 細胞、及び A549 細胞を用いた。各細胞の Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1、Nrf2 抑制タンパク) と EGFR の遺伝子変異を直接シーケンス法により解析した。EGFR リガンド刺激後の Nrf2 活性化、各シグナル分子のリン酸化はウエスタンブロット、細胞増殖は MTT アッセイで調べた。酸化ストレス刺激としてタバコ抽出液 (CSE) を各細胞に添加し、増殖に対する影響を検討した。Nrf2 及び Keap1 の mRNA を RNA 干渉法で抑制し、細胞増殖に対する影響を検討した。非小細胞肺癌患者からの組織標本の DNA を抽出し、Keap1 及び EGFR 遺伝子変異を確認するとともに、免疫染色で Nrf2 の活性化や標的遺伝子の発現を検討した。

(結果)

1) NCI-H292 細胞では Keap1 と EGFR 遺伝子はともに野生型であった。PC-9 細胞の Keap1 遺伝子は野生型であったが、EGFR 遺伝子に EGFR 阻害剤感受性変異が認められた。また A549 細胞では Keap1 遺伝子にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が認められた。2) NCI-H292 細胞では EGFR リガンド刺激に応じて Nrf2 活性化及び細胞増殖が促進された。これらは EGFR 阻害剤及び MEK1/2 阻害剤で抑制されたが、PI3K/AKT 阻害剤では抑制されなかった。PC-9 細胞では EGFR 非刺激で Nrf2 の活性化が見られたが、EGFR 阻害剤投与により同活性化は細胞増殖とともに顕著に抑制された。A549 細胞では Nrf2 の恒常的活性化が見られ、

EGFR 阻害剤による細胞増殖抑制は見られなかった。3) Nrf2 特異的 siRNA の導入により全ての細胞の増殖が抑制された。4) NCI-H292 細胞に対する CSE 曝露では EGFR リガンド刺激と相加的な細胞増殖が促進されるとともに EGFR 阻害剤に対する感受性の低下が認められた。PC-9 細胞では CSE 曝露による細胞増殖の促進は見られなかったが、EGFR 阻害剤に対する感受性の低下が認められた。A549 細胞では CSE 曝露による細胞増殖への影響は認められなかった。5) EGFR 阻害剤感受性 EGFR 遺伝子変異を有する臨床例で、肺病変には EGFR 阻害剤が有効であったが脳転移巣には無効であり、Keap1 遺伝子変異が脳転移巣でのみ検出された。

(考察)

本研究では、Nrf2 活性化が非小細胞肺癌の細胞増殖に重要な役割を演じていること、さらに Nrf2 依存性の細胞増殖が、野生株細胞 (NCI-H292) と EGFR 活性化遺伝子変異含有細胞 (PC-9) と Keap1 変異含有細胞 (A549) を用いて、EGFR と Keap1 のシグナリングの二重支配を受けていることが示された。Keap1 に異常を伴う細胞では Nrf2 が恒常的に活性化され EGFR 阻害剤や酸化ストレス誘導性抗癌剤に耐性を示すことと臨床検体の結果を併せると、Keap1 の機能異常を伴う Keap1 遺伝子変異は EGFR 阻害剤耐性の一因になるものと考えられ、Keap1 遺伝子変異の検索が EGFR 阻害剤感受性遺伝子診断に応用できる可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、非小細胞肺癌の 3 種類の細胞株を用いて、Nrf2 依存性の細胞増殖が EGFR と Keap1 のシグナリングの支配を受けていることを明らかにした点、さらには Keap1 の機能異常を伴う Keap1 遺伝子変異が EGFR 阻害剤感受性の一因と考えられることから Keap1 遺伝子変異の解析が EGFR 阻害剤感受性の遺伝子診断に応用できる可能性を示唆した点で大いに評価できる。臨床検体による今後の研究の発展に期待したい。

平成 24 年 1 月 6 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。