

主論文の要旨

Lapatinib sensitivities of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines

〔 2種類の新しい Trastuzumab 抵抗性を持った HER2
遺伝子増幅胃癌細胞株に対する Lapatinib の感受性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

大島 由記子

【緒言】

HER2 陽性胃癌の患者に対して抗 HER2 モノクローナル抗体である Trastuzumab(以下 Tmab)を化学療法と併用投与することにより全生存期間が延長することが確認されたが、今後 Tmab に対する治療の抵抗性の獲得は HER2 陽性胃癌の患者にとって解決すべき主要な問題になると考えられる。しかしながら HER2 遺伝子増幅乳癌細胞とは違い、現在 Tmab 抵抗性をもった HER2 遺伝子増幅胃癌細胞の基礎モデルは入手することができない。今回の研究では *in vivo selection* 法にて 2 種類の Tmab 耐性 HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株を新しく樹立した。またそれらの細胞株に対する EGFR,HER2 両方のチロシンキナーゼインヒビターである Lapatinib の抗腫瘍効果を評価し、Tmab 耐性を獲得した HER2 陽性胃癌に対する Lapatinib の有用性の可能性につき示した。

【方法】

日本人の胃癌肝転移巣より樹立された HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株(GLM-1,GLM-4)を用いて nude mouse の腹膜播種巣を作成した。その Nude mouse の腹腔内に Tmab を 4 週間投与し、残った腹膜播種巣の培養を繰り返す *in vivo selection* 法にて新しい細胞株(GLM-1HerR2(3),GLM-4HerR2)を樹立した (Fig.1c)。またそれらの Tmab 耐性細胞株に対する Lapatinib の抗腫瘍効果を評価した。

【結果】

今回 nude mouse の腹膜播種モデルを使用した *in vivo selection* 法を用いて 2 種類の Tmab 耐性胃癌細胞株を分離培養することに成功した。

樹立した Tmab 耐性胃癌細胞株は親株と比較すると組織形態はより平面化し(Fig.2a)、*in vitro* での増殖速度は速くなった(Fig.2b)。

また親株では皮下腫瘍モデルに対する Tmab による腫瘍増殖抑制が有意に認められたが(Fig.3a)、Tmab 耐性株では Tmab による腫瘍増殖抑制は認められず(Fig.3b)、*in vitro* および *in vivo* 両方での Tmab 耐性を確認した。親株および耐性株の HER2 発現に大きな違いはなく(Fig.4a,b,c)、さらに腫瘍表面の Tmab 結合の差も調べたが大きな差はなかった(Fig.4d)。これらのことより Tmab 耐性のメカニズムは HER2 発現の低下や HER2 結合の低下によるものではないと考えられた。

Tmab 耐性獲得における p95HER2 および MUC4 の役割を調べるためにこれらの蛋白の発現を調べた。p95HER2 の発現は耐性株でも増加がみられなかった(Fig.5a)。MUC4 は耐性株の GLM-1HerR3 細胞では発現が増加していたが、GLM-4 と GLM-4HerR2 では反対に減少していた(Fig.5b,c)。

次にこれらの耐性株も含めた HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株に対する Lapatinib の感受性を調べた。親株、耐性株ともに Lapatinib による細胞増殖抑制が認められた(Fig.6a)。

Lapatinib 作用後の細胞周期を比較すると親株、耐性株ともに G1 期での停止を認め、アポトーシス誘導も両細胞間で差はなかった(Fig.6b,c)。

Tmab および Lapatinib の各細胞株でのシグナル伝達経路に対する作用を western blotting にて調べたところ、Tmab では認められなかったが、Lapatinib では親株、耐性株ともに PI3K/Akt および MAPK 経路を同程度に抑制した(Fig.6d)。

HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株およびその Tmab 耐性株に対する Lapatinib の抗腫瘍効果は細胞周期の G1 期での停止と PI3K/Akt および MAPK 経路の遮断によるアポトーシス誘導によるものと考えられた。

最後に親株および耐性株の Tmab および Lapatinib の抗腫瘍効果および抗転移効果を調べた。耐性株の皮下腫瘍モデルおよび腹膜播種モデルでともに Lapatinib は著明な腫瘍増殖抑制作用を認めた(Fig.7a,b)。

【考察】

この研究では HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株より Trastuzumab 耐性 HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株を 2 種類樹立することに成功した。これらの細胞は以下の点で特異的である。1) BT474,SKBR-3 など Tmab 耐性 HER2 陽性乳癌細胞株は存在するが、HER2 遺伝子増幅かつ Tmab 耐性をもった胃癌細胞株はまだ報告されておらず、今回の細胞は in vivo selection 法にて樹立された Tmab 耐性胃癌細胞株の初めてのものである。

2) HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株は in vitro では Tmab の影響が限定的であり(Fig.1a)、これは Tmab が Akt リン酸化を増加させることにより細胞周期の G1 期での停止がおこる乳癌細胞株とは違っていた。よって胃癌細胞株と乳癌細胞株では Tmab 耐性のメカニズムが違うと考えられ、胃癌細胞株では抗体依存性細胞障害など他のメカニズムがより重要であると考えられた。

3) 日本人の胃癌転移巣より樹立された HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株である GLM-1,GLM-4 は、白色人種由来の胃癌細胞株である NCI-N87 よりも明らかに Tmab 抵抗性を獲得した。この結果は、日本人に限定した TOGA study のサブセット解析で、Tmab 治療をうけた患者で生存率は改善したが Tmab の効果は世界的解析と比較すると劣っていたとの結果と矛盾しないものと考えられた。これらの結果より、日本人と白色人種の HER2 陽性胃癌の Tmab 感受性は人種間で差がある可能性が示された。よって今回樹立した HER2 遺伝子増幅および Tmab 耐性をもった胃癌細胞株は、Tmab 耐性の獲得の詳しいメカニズムの解明に加え、HER2 陽性胃癌の日本人患者での Tmab 耐性の獲得を克服するための新しい分子標的治療開発に有用であると考えられる。

また今回の研究でもう一つ興味のある結果が、Tmab 耐性胃癌細胞は Lapatinib に対して感受性があることである。Lapatinib は HER2,EGFR 両方のチロシンキナーゼのリン酸化を阻害することにより、MAPK,PI3K/AKT といったシグナル伝達経路を阻害する。Lapatinib は Tmab 治療後の HER2 陽性転移性乳癌の患者で効果があることが報告されており、胃癌でも同様の効果があると考えられる。これまでも HER2 遺伝子増幅胃癌細胞に対する Lapatinib の抗腫瘍効果が報告されていたが、Tmab 耐性を獲得した HER2 遺伝子増幅胃癌細胞に対するものは知られていなかった。今回 Tmab 耐性を獲得した HER2 遺伝子増幅胃癌細胞に対しても Lapatinib の抗腫瘍効果が確認された

ことで、Lapatinib は単独または Tmab（または化学療法）併用で Tmab 耐性を獲得した転移性 HER2 陽性胃癌に対する新しい分子標的治療法となり得ることが示唆された。これらの細胞の Tmab 耐性の獲得のメカニズムとしては HER2 陽性乳癌の研究をもとにするといくつかの可能性があげられる。この研究では 3 つの可能性について調べた。1)HER2 発現の減少とそれによる HER2 への Tmab の結合の低下については、Tmab 抵抗をもった細胞は親株と比較して形態や増殖可能性の変化は認めしたが HER2 発現や Tmab 結合に明らかな違いは認めなかった。2)乳癌では p95HER2 陽性の患者は Tmab 抵抗性のため予後が悪い。今回の 2 つの HER2 遺伝子増幅胃癌細胞では p95HER2 の発現を認めしたが、Tmab 抵抗をもった細胞では p95HER2 の発現過剰や p95HER2 のリン酸化の増加は認めず、胃癌細胞での Tmab 抵抗性への p95HER2 の関わりの可能性は今回の研究では指摘できなかった。3)MUC4 は HER2 の細胞外のドメインに結合して HER2 リン酸化のトリガーとなりシグナル伝達を活性化させる。MUC4 の過剰発現も Tmab 耐性獲得の可能性としてあげられるが、今回の Tmab 耐性胃癌細胞株では GLM-1HerR3 で MUC4 の mRNA とタンパクレベルが親株より高まったが、Tmab の細胞表面への結合に差は認めなかった。GLM-4HerR2 では反対にレベルが下がっており、胃癌細胞の Tmab 耐性に対する MUC4 の役割は解明すべき問題である。HER2 陽性胃癌の Tmab 抵抗性のメカニズムの解明にはさらなる研究が必要であると考えられる。

【結語】

今回日本人由来の HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株より Tmab 耐性胃癌細胞株を樹立した。この Tmab 耐性胃癌細胞株は Lapatinib に対して感受性のあることが確認された。Tmab 耐性胃癌細胞株は HER2 陽性胃癌の Tmab 耐性獲得の作用メカニズムを理解し、また Tmab 耐性を獲得した HER2 陽性胃癌に対する新しい分子標的治療の開発のためにすぐれたモデルとなることが示唆された。