

主論文の要旨

**E-cadherin expression is correlated with focal
adhesion kinase inhibitor resistance in Merlin-
negative malignant mesothelioma cells**

Merlin 陰性悪性中皮腫において E-カドヘリンの発現は
接着斑キナーゼ阻害剤の耐性と相関する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 呼吸器外科学分野

(指導：横井 香平 教授)

加藤 毅人

【緒言】

悪性中皮腫は胸膜や腹膜から発生する悪性度の高い腫瘍として知られており、かつては非常に稀な疾患であったが、アスベストの使用が広がるとともに世界中でその発生が増加したと言われている。日本における 2014 年の悪性中皮腫の年間死亡者数は約 1400 人であり、20 年前と比較して 3 倍に増加している。また診断後の平均生存期間は化学療法を施行しても 9~12 カ月と非常に予後が悪く、新たな治療の開発が急務となっている。

Focal adhesion kinase (FAK) は接着斑に存在しインテグリンを介したシグナル伝達に重要な役割を果たす非受容体型チロシンキナーゼで、そのタンパク過剰発現が様々な癌で報告されている。VS-4718 は可逆的な FAK 阻害剤であり、その効果に関しては Merlin をコードする NF2 遺伝子の変異との関連が報告されている。そのため NF2 変異が約 40% に存在する悪性中皮腫における奏効が期待されるが、中皮腫に対する VS-6063 (defactinib として知られている FAK 阻害剤) 単独投与の第 2 相試験 (COMMAND 試験) が効果不十分で中断されており不明な点も多い。われわれは悪性中皮腫株における VS-4718 の抗腫瘍効果に関連するバイオマーカーについて検討した。

【対象および方法】

21 種類の悪性中皮腫細胞株および不死化中皮細胞株である MeT-5A 株に対してウェスタンブロットを行い Merlin、FAK のタンパク発現および FAK のリン酸化レベル (活性化) を確認した。上記中皮腫株に対して matrigel on top による培養を行った上で VS-4718 を投与して IC₅₀ を算出し、Merlin との関連性について検討した。また、Merlin 陰性株を MeT-5A を基準に high IC₅₀、low IC₅₀ に分類し、遺伝子発現の変化について microarray を利用して検討した。microarray は過去に当研究室で行われた実験データ (GSE34499) を利用し、統計解析は MultiExperiment Viewer を使用した上で Rank products 法にて行った。遺伝子導入実験および knockdown の実験はレンチウイルスを利用して行った。またアポトーシスを確認する実験として Hoechst 33342/PI 染色および cleaved caspase3 の免疫蛍光染色を行った。

【結果】

low IC₅₀ 株は、Merlin 陽性株では 3/8 株 (37.5%)、Merlin 陰性株では 8/13 株 (61.5%) 存在し、Merlin 陰性株で low IC₅₀ の傾向にあった。また NF2 遺伝子ホモザイガス欠株である Y-MESO-22 株においてレンチウイルスを利用して野生型 NF2 発現ベクター (Merlin WT) を導入したところ VS-4718 に対する感受性が低下し、また Merlin の C 末端付近のアミノ酸が 40 個欠失した変異型 NF2 発現ベクター (Merlin Δ40) を導入したところ感受性はほとんど変化しなかった (Figure 1)。同様の結果が Y-MESO-72 株でも確認された。これらの結果から Merlin と VS-4718 の効果には関連があると考えられた。

続いて Merlin 陰性株を high IC₅₀、low IC₅₀ に分類し、遺伝子の発現について microarray および Gene Ontology 解析を行った。統計解析の結果 278 の遺伝子において high IC₅₀、

low IC₅₀ の間で発現に有意差を認めた (Figure 2)。Gene Ontology 解析から 278 遺伝子の中では cell adhesion に関連する遺伝子の頻度が高いことが判明した。278 遺伝子の中で cell adhesion に関わる遺伝子で且つ Rank products 法における fold change が最も高かった E-cadherin を選び出した。Merlin 陰性株に対して Real-time PCR を行ったところ E-cadherin の発現と IC₅₀ との間に高い正の相関を認めた (Figure 3)。また E-cadherin 以外に上皮間葉移行と関連する N-cadherin, Snail, Slug, Twist についても同様に Real-time PCR を施行し遺伝子発現と IC₅₀ を比較したが、いずれも相関は認められなかった。

続いて 21 種類の中皮腫細胞株および MeT-5A 株に対してウェスタンブロットを行い E-cadherin のタンパク発現を確認すると 6 株 (27%) で強陽性であった。E-cadherin の発現が低い Merlin 陰性株である Y-MESO-22 株、NCI-H290 株と E-cadherin が高発現する Merlin 陰性株である Y-MESO-9 株、Y-MESO-12 株の VS-4718 投与時の p-FAK の変化についてウェスタンブロットにて比較したが、いずれの株においても p-FAK の活性の低下が認められた。また上記 4 株に対して Hoechst 33342 / PI 染色を行ったところ E-cadherin の発現の低い Y-MESO-22 株、NCI-H290 株において PI 染色の増強が認められ、アポトーシスの増強が確認された。

E-cadherin を高発現する Merlin 陰性株である Y-MESO-25 株に対してレンチウイルスを利用して E-cadherin の knockdown を行ったところ、VS-4718 に対する感受性の改善を認めた (Figure 4)。同様の結果が Y-MESO-45 株でも確認された。また Y-MESO-25 株に対して E-cadherin を knockdown した株とコントロールベクターを導入した株で VS-4718 の投与後の cleaved caspase3 の発現を免疫蛍光染色で確認したところ knockdown 株において cleaved caspase3 の増強が認められた。

【結語】

本研究の結果から Merlin 陰性悪性中皮腫株において E-cadherin の発現は FAK 阻害剤である VS-4718 に対する耐性と高い相関があることが判明した。Merlin 陰性悪性中皮腫において E-cadherin の発現を検討することで、VS-4718 の効果をより正確に予測できる可能性がある。E-cadherin の VS-4718 に対する効果予測のバイオマーカーとしての有用性は、今後臨床試験にて確認する必要があると考える。