

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 何 小平 (HE XIAOPING)

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器内科学

審 査 員

主 査	横浜市立大学大学院	医学研究科	消化器・腫瘍外科学	教 授	遠藤 格
副 査	横浜市立大学大学院	医学研究科	がん総合医科学	准教授	小林 規俊
副 査	横浜市立大学大学院	医学研究科	分 子 生 物 学	講 師	廣瀬 智威

博士の学位論文審査結果の要旨

EGFR inhibition reverses resistance to Lenvatinib in hepatocellular carcinoma cells

(EGFR阻害は肝細胞癌細胞におけるLenvatinibに対する耐性を克服する)

『背景』

肝細胞癌（HCC）は、世界的に癌関連死亡の主要な原因となっている。Lenvatinib は、切除不能な肝細胞癌に対する第一選択薬として承認されている。Lenvatinib はその耐性の出現により治療抵抗性となるが、根本的なメカニズムは不明である。

『方法』

Lenvatinib 耐性細胞を樹立するために、Hep3B 細胞を最初に $3\mu\text{M}$ の Lenvatinib で処理した。その後、週ごとに $1\mu\text{M}$ または $0.5\mu\text{M}$ ずつ徐々に濃度を上げ、Lenvatinib 初投与から 2 ヶ月後に $7.5\mu\text{M}$ に到達した。これらの細胞の生物学的特性を、MAPK シグナル経路の ERK 活性化およびヒトホスホレセプターチロシンキナーゼ（RTK）抗体アレイによって解析した。Lenvatinib 耐性に関連すると思われる因子は阻害剤を用いて、その影響を解析した。

『結果』

Lenvatinib に長期暴露することにより、Lenvatinib 耐性 HCC 細胞（LR 細胞）を樹立した。Lenvatinib は親細胞の ERK 活性を低下させたが、LR 細胞では低下しなかった。RTK アレイ解析の結果、LR 細胞では EGFR と IGF1R/INSR の活性が著しく上昇していたが、他の RTK の活性は変化していなかった。広く使用されている EGFR 阻害剤である Erlotinib は、LR 細胞の ERK 活性化を抑制した。Lenvatinib と Erlotinib との併用では LR 細胞の ERK 活性化の抑制に加えて、細胞増殖も抑制した。一方、IGFR/INSR の阻害は、ERK の活性化や細胞増殖に影響を与えなかった。活性酸素種（ROS）の消去は、LR 細胞における EGFR 活性化の亢進を改善した。

『結論』

Lenvatinib 耐性細胞では、活性酸素（ROS）の蓄積を介した EGFR 活性化の亢進により、Lenvatinib 耐性が誘導されることが判明した。これらの知見は、今後、肝細胞癌に対する Lenvatinib と erlotinib の併用療法の開発を可能にすると思われる。

審査にあたり以上の論文要旨の説明に続いて、以下の質疑応答が行われた。

まず副査の廣瀬先生により以下の質問、ご指導がなされた。

- 1) この研究ではさまざまな HCC 細胞株が試されましたが、最終的に樹立された Lenvatinib 耐性細胞株が LR7.5-3B だけであり、この研究の限界につながった。今回の研究では HepG2 細胞が Lenvatinib に対して自発的な耐性を持っていると考えられるため、HepG2 細胞が特別な Lenvatinib 耐性細胞として用い、LR7.5-3B と同じ結果が得られれば、この限界を克服すると思えないか。
- 2) 細胞増殖実験の解析では、Hep3B 細胞と LR 細胞の増殖曲線の縦座標が一致しないことを見出した。親細胞と比べて、LR 細胞の増殖が低下しているか？このような現象が起こる理由は何か。
- 3) 蛍光プローブ DCFH-DA を使用して 2 種類の細胞の ROS レベルを測定する場合、細胞全体で測定された ROS をパーセンテージで表すのが最適である。また、その後 NAC で活性酸素を除去した後に、2 種類の細胞を再び蛍光プローブ DCFH-DA で処理すると、それぞれの活性酸素濃度はどうなるのか。
- 4) ROS はどのように EGFR の活性化を制御するか。
- 5) LR 細胞で ROS 含有量が増加するのはなぜか。そして、そのメカニズムはどのようなものか。

以上の質問と指導に対して、以下の通り回答がなされた。

- 1) 今後もし機会があれば、この提案をもとにさらに研究を続けたいと思う。
- 2) 確かに LR 細胞の増殖は低下していた。一般的に、LR 細胞は親細胞に比べて耐性細胞として活性が高いはずである。しかし、実際の細胞培養過程では、顕微鏡観察により、LR 細胞の増殖速度は同時期に親細胞よりも低く、LR 細胞は多数の細胞死を示さないことが判明した。この現象の理由は、ROS が LR 細胞の増殖に関与し、細胞死を引き起こすことなく増殖が遅くする可能性があることが示唆された。
- 3) この研究では廣瀬先生が示唆されたように ROS の検出率は測定されなかったが、この結果は 2 種類の細胞の数がほぼ同じ場合に観察された。このアプローチには未解明の機序が存在するかもしれないが、最終的な結果への影響は重大ではないと考えている。廣瀬先生の提案で Image-J を使って測定したところ、親細胞である Hep3B 細胞の ROS の検出率は 9.9%、LR 細胞の検出率は 42%であった。抗酸化剤として、NAC は実験室で ROS を除去するためによく使用されており、ROS 除去に対するその効果は多くの研究で確認されているため、この研究では NAC のみで処理した細胞の ROS の状態を観察しなかった。
- 4) ROS について研究では、チロシンホスファターゼの活性化を抑制すると報告されている。その上で、EGFR / ERK シグナル伝達経路にさらに影響を与えている。
- 5) これまでのところ、ROS 含有量の増加の理由とその発生メカニズムはわかっていない。

次に、副査の小林先生により以下の質問、コメントがなされた。

- 1) 今回の研究で仮定されたシグナル伝達経路において、細胞が Lenvatinib に耐性を示すと、細胞増殖に関連するシグナル伝達経路が完全に変化することを意味するのか？
- 2) これら 2 種類細胞における mTOR などの他のシグナル伝達経路の違いを調べたか？
- 3) この研究で動物実験が行われなかったのはなぜか？
- 4) 『今後の展望』で言及された非ウイルス性 HCC 患者に関する研究では、Lenvatinib が『Atezolizumab + Bevacizumab』療法より優れていることを示唆するデータがあるが、どのようなものか？

以上により、以下の通り回答がなされた。

- 1) この研究では、LR 細胞の PDGFR などの媒介経路が細胞増殖を誘導する可能性があるが、細胞増殖への影響は親細胞と比較して減少していると考えている。また、LR 細胞では、PDGFR などと比べて、EGFR を介した経路が細胞増殖に強い影響を及ぼす。したがって、これら 2 つのシグナル伝達経路が同時に阻害された場合にのみ、LR 細胞の増殖を阻害することができる。
- 2) 今回の研究では、Akt のリン酸化レベルを Western 実験で調べた。しかし、細胞が Lenvatinib で処理されたかどうかに関係なく、正常な HCC 細胞株の p-Akt の活性化レベルに有意な差がないことを示した。
- 3) 実際、この研究中に、in vivo 試験を実施してみた。Hep3B 細胞を一定濃度でヌードマウスの背部皮下に移植し、約 1 ヶ月観察したところ、肉眼で見える皮下の腫瘍が認められた。ある濃度の LR 細胞をヌードマウスの皮下に接種し、移植したところ、培養 3 ヶ月後に肉眼で観察できる皮下塊が認められ、その大きさは Hep3B 細胞を用いた皮下塊よりも小さかった。薬剤と時間のコストを考慮して、in vivo 試験はこの研究に追加しなかった。
- 4) 今年 10 月に ESMO Open ジャーナルに掲載された『Atezolizumab plus bevacizumab versus lenvatinib or sorafenib in non-viral unresectable hepatocellular carcinoma: an international propensity score matching analysis』論文では、NAFLD/NASH 集団において、Atezolizumab と Bevacizumab の併用療法と比較して、Lenvatinib 治療は OS および PFS の延長と関連していたことが示された。

最後に主査の遠藤先生より

- 1) 講演の中で『REVERSE』とあるのは、LR 細胞の EGFR シグナル伝達経路の活性化を阻害することで、LR 細胞を再び Lenvatinib に感受性にすることなのか。
- 2) Lenvatinib は LR 細胞における細胞周期の特定の段階で異常を引き起こし、細胞増殖を低下させますか？ この研究で提案された仮説を理解しやすいのために、序文に可能な薬剤耐性

メカニズムの説明を追加することを勧める。

これらの質問と指導に対して、以下の回答を得ました。

- 1) Erlotinib と Lenvatinib を組み合わせて細胞に投与すると、Hep3B 細胞の p-ERK の活性化がさらに抑制された。また、細胞の増殖も Lenvatinib だけ処理するときよりも抑制された。耐性細胞では、Lenvatinib に対する感受性が高まり、正常な HCC 細胞株と同様に細胞増殖が阻害された。すなわち、耐性細胞における、Erlotinib は EGFR の高発現を阻害し、それによって下流の MAPK シグナルにおける ERK のリン酸化を低下させると考えると想定される。それに、Lenvatinib と併用すると、Lenvatinib に対する耐性株の感受性を回復させる可能性がある。確かに表現が理解しにくいと思うが、REVERSE よりは、薬剤耐性や Lenvatinib 耐性が解除された、と言った方が適切かもしれない。
- 2) Lenvatinib が HCC の治療に使用される前に、甲状腺がんの治療に関連する研究で、Lenvatinib と甲状腺乳頭がんに対する他の化学予防薬との併用療法における細胞周期と細胞周期関連タンパク質との関連性が報告されている。さらに、最近の HCC における Lenvatinib の抗腫瘍効果に関する研究では、Lenvatinib 感受性の HCC 細胞において、Lenvatinib が細胞周期調節タンパク質である Cyclin D1 細胞周期停止を調節することにより、G0/G1 を誘導することが指摘された。これに加えて、この研究は、HCC 細胞およびエクソソームの miRNA を調節することにより、HCC 細胞に対する Lenvatinib の抗増殖効果を検証した。したがって、私たちの研究では、細胞周期に対する Lenvatinib の効果は観察されなかったが、細胞増殖実験を通じて親細胞と耐性細胞の違いを観察することに焦点を当てたものである。

上記以外にも、審査員からの質問に対して適切な返答を得た。『EGFR inhibition reverses resistance to Lenvatinib in hepatocellular carcinoma cells』は学位論文の水準に達しており、申請者が専門分野の知見と研究能力を有している。審査員による協議の結果、申請者は博士（医学）学位を授与されるに値すると総合的に判断された。