

【要約】

Drug resistance originating from a TGF- β /FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an *EGFR* mutation

(*EGFR* 遺伝子変異を有するヒト肺腺癌細胞株における TGF- β /FGF-2 誘導性上皮間葉転換による薬剤耐性化とその克服)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：瀧口 裕一教授)

栗本 遼太

【目的】

上皮間葉転換 (EMT) は悪性腫瘍の浸潤、転移の際に重要な役割を担っており、同時に化学療法抵抗性や免疫応答からの逃避にも深く関与している。TGF- β は、smad3、PI3K/Akt/mTOR、MEK/Erk 経路の活性化を介して癌細胞を EMT へ誘導することが知られている。さらに、TGF- β と FGF-2 を同時に曝露することによってより強力に EMT へ誘導することが知られている。

化学療法は、殺細胞性抗がん薬の他に分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬などの新たな治療薬が確立されてきている。非小細胞肺癌でも *EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子などの治療標的となる遺伝子変異を有した症例においては、分子標的治療薬によって劇的な奏効を得られるようになってきた。その一方で、こうした効果のある症例においてもそのほとんどが耐性化することが知られている。この耐性化機序は十分には解明されていない。EMT はこの薬剤耐性化機序の一つであると考えられている。EMT を克服することで、肺癌の薬剤耐性化の克服が期待される。

本研究では、*EGFR* 遺伝子変異を有するヒト肺腺癌細胞株において、EMT を効果的に誘導及び回復させる方法を検討し、それらが薬剤感受性や免疫応答への反応へ与える影響を検証した。

【方法】

EGFR 遺伝子変異を有するヒト肺腺癌細胞株 (PC-9、HCC-827) を用いて検討を行った。

これらの細胞に TGF- β (10 ng/mL) と FGF-2 (10 ng/mL) を同時曝露 (48 時間) することで EMT を誘導した。EMT の表現型を RT-PCR 法、蛍光免疫染色法、細胞移動能 (wound-healing アッセイ法) とフローサイトメトリー法を用いた細胞周期解析によって検討した。

さらに、EMT を誘導した後に mTOR 阻害剤 (PP242)、メトフォルミン、DMSO を 72 時間

曝露させることにより EMT を回復させ、同様に表現型の検討を行った。また、gefitinib、cisplatin への薬剤感受性変化を MTT アッセイ法とフローサイトメトリー法を用いたアポトーシスの解析によって検討した。免疫応答への反応を、PD-L1 の発現を RT-PCR 法と蛍光免疫染色法によって検討した。これらの機序を検討するため、ウェスタンブロット法を用いてシグナル伝達経路の解析を行った。

【結果・考察】

EMT への誘導

EMT の表現型を、上皮型マーカー (E-cadherin) の低下と間葉型マーカー (vimentin、fibronectin)、転写因子 (slug) の上昇を指標として RT-PCR 法を用いて検討した。HCC-827 細胞株においては、TGF- β と FGF-2 の同時曝露により E-cadherin の低下と vimentin、fibronectin、slug の上昇が認められた。PC-9 細胞株においては、E-cadherin の低下は見られなかったが、vimentin と fibronectin、slug の上昇が認められた。蛍光免疫染色により細胞表面の E-cadherin 発現と細胞質内の fibronectin 発現を検討し、同様の傾向が認められた。また、HCC-827 細胞株は TGF- β と FGF-2 の同時曝露により紡錘形で接着性の低い細胞へと変化した。しかし、PC-9 細胞株は曝露前からすでに紡錘形で接着性の低い細胞であり、形態変化は認められなかった。wound-healing アッセイ法では、2 種類の細胞株ともに TGF- β と FGF-2 の同時曝露により細胞移動能が上昇した。また、細胞周期解析により、2 種類の細胞株ともに TGF- β と FGF-2 の同時曝露により G0/G1 期の細胞が多く認められた。これらの結果から、2 種類の細胞株ともに TGF- β と FGF-2 の同時曝露により EMT が効率的に誘導されたと考えられる。

EMT の抑制

TGF- β と FGF-2 の同時曝露により誘導された EMT に対して、PP242、メトフォルミン、DMSO を投与し、EMT の抑制効果を検証した。RT-PCR 法において、PC-9 細胞株では E-

cadherin の上昇は見られなかったが、HCC-827 細胞株では PP242 とメトフォルミンによって E-cadherin 発現が上昇した。さらに、2 種類の細胞株において、PP242、メトフォルミン、DMSO はいずれも vimentin、fibronectin、slug 発現を低下させた。蛍光免疫染色においても同様の結果が得られた。さらに、PP242、メトフォルミン、DMSO は、いずれも EMT による細胞移動能、細胞周期の変化を抑制した。

EMT に関連するシグナル伝達経路

TGF- β と FGF-2 により誘導された EMT とその抑制の機序を解明するために、EMT において主として活性化していると考えられている smad3、mTOR-C1/p70S6K、mTOR-C2/Akt、MEK/Erk 経路の検討を、ウェスタンブロット法を用いて行った。PC-9 細胞株においては、TGF- β と FGF-2 の同時曝露により smad3 のリン酸化が亢進した。HCC-827 細胞株においては、TGF- β と FGF-2 の同時曝露により smad3、mTOR-C1/p70S6K、mTOR-C2/Akt、MEK/Erk 経路のリン酸化が亢進した。PP242、メトフォルミン、DMSO は、それぞれ異なる機序によりこれらの活性化したリン酸化を抑制した。

薬剤感受性変化と PD-L1 発現変化

EMT 及びその抑制による薬剤感受性変化を、MTT アッセイ法とアポトーシス解析により検討した。いずれの解析においても、2 種類の細胞株において gefitinib の薬剤感受性が低下し、HCC-827 において cisplatin の薬剤感受性が低下した。これらの変化は、PP242、メトフォルミン、DMSO の曝露によって部分的に回復した。

さらに、RT-PCR 法及び蛍光免疫染色を用いて PD-L1 発現の変化を検討した。EMT の誘導によって、2 種類の細胞株において PD-L1 発現が上昇した。この変化は PP242、メトフォルミン、DMSO の 3 剤による EMT の抑制により、部分的に抑制された。

【結論】

2種類の異なるヒト非小細胞肺癌細胞株において、TGF- β と FGF-2 の同時曝露は効率的に薬剤耐性と PD-L1 高発現を有した EMT を誘導した。さらに、PP242、メトフォルミン、DMSO は、それぞれ異なる機序でこの EMT と EMT による薬剤耐性、PD-L1 発現を抑制した。EMT の抑制はがん治療における有望な標的の一つであると考えられる。