

## 論文内容の要旨

Fluvastatin exerts an anti-tumor effect in vemurafenib-resistant melanoma cells  
(Fluvastatin は vemurafenib 耐性悪性黒色腫細胞株において抗腫瘍効果をもたらす)  
(西谷匡央, 安平進士, 柴崎晶彦, 及川浩樹, 増田知之, 前沢千早)  
(Anti-Cancer Drugs 2019 年掲載予定)

## I. 研究目的

悪性黒色腫の治療は、免疫のチェックポイント阻害薬とドライバー遺伝子の変異を標的としたシグナル伝達阻害薬の登場により大きなパラダイムシフトを迎えている。両者の併用はお互いの作用を補完するばかりでなく相乗効果も期待され、進行期悪性黒色腫の最も効果的な治療法として臨床試験が進んでいる。ドライバー変異 BRAF V600E に対する選択的阻害薬 vemurafenib は、切除不能な悪性黒色腫に対して初期には劇的な腫瘍減量効果を示すにも関わらず、早期から薬剤耐性を獲得する症例が多い事が問題視されてきた。この耐性獲得には、PI3K/AKT/mTOR や Hippo-YAP/TAZ 経路の活性化など、別のシグナル伝達系が活性化し、ドライバー変異の迂回経路として作用している事が報告されている。vemurafenib 耐性克服のためには、個別の腫瘍で生じている耐性分子機構を明らかにし、作用点の異なる別経路のシグナル伝達阻害薬を併用する事が検討されている。

本研究は、皮膚悪性黒色腫における vemurafenib 耐性株の樹立と、その耐性分子機構を明らかにするとともに、AKT ならびに YAP/TAZ の活性阻害効果を持つ HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (fluvastatin) が、vemurafenib と相乗効果を持つか検証した。

## II. 研究対象ならび方法

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 (C32, HMY-1, SK-MEL-28) から vemurafenib 耐性 (vemurafenib-resistant; VR) 細胞の樹立を試みた。各々の VR 株の耐性機構についてウェスタンブロッティング法および real time PCR 法、免疫染色により分子生物学的に検討した (CRAF や COT の過剰発現, AKT の活性化, PTEN の不活性化, YAP/TAZ の局在および活性の変化など)。さらに、vemurafenib と fluvastatin の殺細胞効果を WST assay で解析し、Chou (Cancer Res. 2010) の方法に準じて併用による相加/相乗効果を検討した。また、耐性関連分子の発現変化についても解析を行った。取得した VR 細胞において遺伝子工学的に YAP/TAZ の発現を変化させた際の vemurafenib 感受性の変化についても解析した。

### III. 研究結果

1. 3種のヒト悪性黒色腫細胞株より VR 細胞を取得した。
2. 親株では, vemurafenib により MAPK 経路の抑制を確認したが, VR 細胞では vemurafenib を投与しても抑制されなかった. HMY1 と SK-MEL-28 を親株とする VR 細胞 (HMY-1/VR, SK-MEL-28/VR) において, リン酸化 AKT の増加を確認した. CRAF や COT の過剰発現および PTEN の不活性化は取得した VR 細胞では認めなかった。
3. VR 細胞において YAP および TAZ の mRNA はごく軽度の増加しか認めなかったが, YAP/TAZ の転写標的遺伝子である ANKRD1 の mRNA は過剰発現していた. 免疫染色では VR 細胞の YAP/TAZ は親株に比して, 核に集積する傾向にあったものの強い相関は認めなかった。
4. VR 細胞において YAP/TAZ の mRNA の発現を低下させた際の vemurafenib 感受性を検討したが, 約 5-20% の改善にとどまった。
5. 全ての VR 細胞において vemurafenib と fluvastatin の併用による相乗効果を認めたが, いずれの親株においても相加・相乗効果を認めなかった。
6. VR 細胞において, fluvastatin の濃度依存性にリン酸化 AKT の発現が減少することを確認した. また, fluvastatin 単独投与よりも vemurafenib と fluvastatin を併用することで, AKT の活性化がより抑制されることを確認した。

### IV. 結 語

取得した VR 細胞 3 種のうち, HMY-1, SK-MEL-28 の耐性細胞では AKT の活性化による耐性獲得が示唆された. いずれの耐性細胞においても, vemurafenib と fluvastatin を併用することで相乗効果を認め, リン酸化 AKT の減少が確認された. また, 取得した VR 細胞においては YAP/TAZ の抗がん薬抵抗性責任遺伝子としての貢献は軽微であると考えられた. AKT が活性化している VR 細胞において, statin の投与により AKT のリン酸化を抑制することで vemurafenib 感受性を改善できることが示唆された.

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 板持 広明 (産婦人科学講座)  
副査 教授 増田 友之 (病理学講座病理病態学分野)  
副査 教授 伊藤 薫樹 (臨床腫瘍学講座)

BRAF 阻害剤 vemurafenib は, BRAF 変異 (V600) を有する悪性黒色腫に対して著明な腫瘍縮小効果を示すものの, 早期から耐性を獲得することが多く, その耐性克服が喫緊の課題である. 本研究論文は, vemurafenib 耐性皮膚悪性黒色腫細胞株 (VR 細胞) を樹立し, その耐性分子機構を明らかにするとともに, HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (fluvastatin) と vemurafenib との併用効果を検討した論文である. 樹立した 3 種の VR 細胞では, vemurafenib 添加により MAPK 経路の抑制がみられず, 2 株ではリン酸化 AKT の増加が認められた. VR 細胞において, YAP/TAZ の mRNA 発現抑制による vemurafenib 感受性の増加は軽度であったが, vemurafenib と fluvastatin との併用により相乗効果がみられた. また, fluvastatin の濃度依存性にリン酸化 AKT の発現低下が観察されるとともに, fluvastatin 単剤に比して vemurafenib との併用添加では AKT 活性化が著明に抑制された. このことは, AKT が活性化している VR 細胞において, fluvastatin 添加により AKT 活性化を抑制することで vemurafenib 感受性を改善できる可能性を初めて示した論文である.

本論文は, BRAF 変異を有する悪性黒色腫に対する vemurafenib と fluvastatin の併用療法の有効性を示した研究といえる. 学位に値する論文である.

### 試験・試問の結果の要旨

Fluvastatin の YAP/TAZ 経路への作用, vemurafenib 耐性克服機序, AKT 活性化の抑制, 実地臨床における将来展望や, vemurafenib と AKT 阻害剤との併用療法の可能性について試問を行い, 適切な解答を得た. 学位に値する学識を有していると考えられる. また, 学位論文の作成にあたって, 剽窃・盗作等の研究不正はないことを確認した.

### 参考論文

1) ADAM17 は肝星状細胞上のアンギオテンシン II による EGFR の transactivation を媒介する (及川浩樹 他 8 名と共著)

A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells.

Life Sci, 97 巻, 2 号 (2014) : p137-144.

2) パクリタキセル誘導性の異常有糸分裂および有糸分裂の slippage は, 古典的なアポトーシスおよび p53 に関わらず, 効率的に増殖性の死に至る (安平進士 他 2 名と共著)

Paclitaxel-induced aberrant mitosis and mitotic slippage efficiently lead to proliferative death irrespective of canonical apoptosis and p53.

Cell Cycle, 15 巻, 23 号 (2016) : p3268-3277.