

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Exosome-derived miR-210 involved in resistance to osimertinib and epithelial-mesenchymal transition in *EGFR*-mutant non-small cell lung cancer cells

エクソソーム由来の microRNA-210 は *EGFR* 変異陽性非小細胞肺癌細胞におけるオシメルチニブ耐性および上皮間葉移行に関与する

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野

大学院生 久金 翔

Thoracic Cancer 2021年 掲載

DOI: 10.1111/1759-7714.13943

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対して、*EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬 (*EGFR*-TKI) は有効な治療効果を示すが、薬剤耐性克服が大きな課題となっている。*EGFR*-TKI の薬剤耐性に上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) が関与することが報告されている。エクソソームは細胞外小胞の一種で、主な構成成分はタンパク質や micro RNA (miRNA) などの核酸であり、悪性腫瘍の浸潤や転移などに関与することが明らかになってきている。本研究は、第3世代 *EGFR*-TKI であるオシメルチニブ耐性に関与するエクソソーム由来 miRNA の意義を明らかにすることを目的とした。

EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞株でオシメルチニブ感受性である HCC827、PC-9 を用いて、ステップワイズ法にてオシメルチニブ耐性株 (HCC827-OR、PC-9-OR) を樹立した。オシメルチニブ感受性および耐性細胞の細胞上清から高速遠心法を用いてエクソソームを分離した。エクソソームの同定は、エクソソーム特異的マーカーである CD63 と TSG101 を用いたウエスタンブロッティングと透過型電子顕微鏡およびナノ粒子トラッキング解析を用いて行った。エクソソームから miRNA を抽出分離し、マイクロアレイを用いてエクソソーム内のオシメルチニブ耐性に関わる miRNA 解析を施行した。

オシメルチニブ耐性細胞は、感受性細胞と比較してリン酸化 *EGFR* 発現低下を認めるが、リン酸化 *AKT* 発現上昇、*E-cadherin* 発現低下、*vimentin* 発現上昇を認め、*EGFR* シグナルに非依存的な EMT が薬剤耐性に関与していることが示唆された。耐性細胞上清と共培養した感受性細胞では、間葉系細胞増加、*E-cadherin* 発現低下と *vimentin* 発現上昇を認め、EMT が誘導されていることを認めた。miRNA マイクロアレイ解析にて、感受性細胞由来エクソソームと比較し耐性細胞由来エクソソームにて共通に発現が上昇していた miRNA の中から、

EMTに関連する miR-210 を同定した。耐性細胞における miR-210 発現上昇は、定量的 RT-PCR 法において確認した。HCC827-OR 由来エクソソームを HCC827 の細胞培養液に投与すると、間葉系細胞増加、E-cadherin 発現低下および vimentin 発現上昇がみられ、EMT 誘導とともにオシメルチニブへの薬剤感受性が低下した。さらに、HCC827 に miR-210 を過剰発現させると、EGFR シグナル伝達経路のタンパク発現に影響を及ぼさなかった一方で、間葉系細胞が増加し、EMT 誘導因子 TGF- β 刺激に関わらず E-cadherin 発現低下と vimentin 発現上昇がみられ、EMT 誘導とともにオシメルチニブ薬剤感受性が低下した。

本研究により、オシメルチニブ耐性株由来エクソソーム内の miR-210 が、EGFR および TGF- β シグナル伝達経路非依存的なバイパス経路を介して、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞のオシメルチニブ耐性と EMT に関与することが示された。miR-210 は複数の癌腫において主に腫瘍促進型 miRNA として作用し、EMT 関連因子 E-cadherin が標的タンパク質の 1 つであると考えられている。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の腫瘍微小環境において、細胞間情報伝達の重要な担い手であるエクソソームを介して、miR-210 がオシメルチニブの耐性化および EMT に関与することが示唆され、新規治療標的としての可能性が示された。

第二次審査では、耐性細胞のヘテロ不均一性、第 1、2 世代 EGFR-TKI との交差耐性、エクソソーム内の miR-210 以外の耐性因子、C797 変異などの既知のオシメルチニブ耐性機序との関係、新規治療法開発への展望などに関する幅広い質疑が行われ、いずれも的確な回答が得られた。本研究は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する新規治療法開発への可能性など今後の臨床応用が期待される意義ある論文と考えられた。

以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。