

京都大学	博士（医学）	氏名	三谷 洋介
論文題目	<p><i>HER2</i>G776S mutation promotes oncogenic potential in colorectal cancer cells when accompanied by loss of APC function  (<i>HER2</i>G776S 変異は APC の機能喪失を伴うことで大腸癌細胞における悪性能を促進する)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>次世代シーケンサーの発達で癌ゲノム情報に基づく標的治療が可能になっている。HER2（ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2）は治療標的分子の一つで、遺伝子増幅や強発現を伴う胃癌、乳癌はそれぞれ約 20%、25%あり抗 HER2 治療が標準治療となっている。一方、<i>HER2</i> 遺伝子変異は希であり、大部分は病的意義が不明である。京都大学医学部附属病院のがんゲノム検査において、大腸癌患者組織から <i>HER2</i> pGly776Ser (G776S) 変異と <i>APC</i> ナンセンス変異が検出されたが、G776 変異の病的意義は明らかでなくこの症例に対し HER2 標的治療が妥当かどうかは不明であった。本研究では、大腸癌における <i>HER2</i>G776S 変異の機能的役割について、特に共存する APC 変異との関りに注目し検討した。さらに HER2 標的治療の有用性を検討した。</p> <p>変異 HER2(G776S)の機能を調べるため、野生型 HER2 と変異型 HER2 (G776S) を発現するプラスミドベクターを作成した。これらを HeLa 細胞に導入し、発現した野生型または G776S 変異蛋白を免疫沈降により抽出し、キナーゼ活性を調べた。G776S 変異蛋白は野生型蛋白よりキナーゼ活性は高かったが、既知の HER2 病的変異の蛋白(G776VC)と比較するとその上昇は軽微であった。</p> <p>次にこれらプラスミドを様々な細胞株に導入し HER2 経路の下流シグナルの変化や形質変化を調べた。大腸癌細胞 CACO-2 や COLO-320 細胞は G776S の導入で HER2 下流シグナル ERK, AKT のリン酸化が亢進し、さらにコロニー形成能試験で足場非依存的増殖能が亢進した。一方 HeLa 細胞や FHC 細胞ではそれらの変化は見られなかった。これら細胞の背景遺伝子変異を調べると前者の細胞は <i>APC</i> 変異を持つのに対し、後者の細胞は <i>APC</i> 野生型であった。</p> <p><i>APC</i> 変異と <i>HER2</i> 変異の関係性を調べるため、CRISPR-Cas9 技術を用い HeLa 細胞の <i>APC</i> 遺伝子を欠損させた <i>APC</i> ノックアウト (KO) 細胞を樹立した。<i>APC</i>-KO 細胞に G776S を導入すると ERK, AKT のリン酸化が亢進し、また足場非依存的増殖能が増加した。さらに <i>APC</i> 遺伝子変異をもつ COLO-320 細胞は G776S の導入で下流シグナル蛋白のリン酸化が亢進したが、G776S の導入と共に野生型 <i>APC</i> を強制発現するとこの下流シグナル蛋白のリン酸化は抑制された。</p> <p>次に <i>HER2</i> G776S 変異に対する HER2 標的治療の有用性を調べるため、HER2 (野生型または G776S) を導入した COLO-320 細胞に HER2 チロシンキナーゼ阻害薬であるアフマチニブを投与し、薬剤感受性を検討した。G776S 導入細胞はアフマチニブ投与により細胞増殖能及び足場非依存的増殖能が有意に抑制された。さらに <i>in vivo</i> で治療効果の評価すると G776S 導入 COLO-320 細胞由来の <i>Xenograft</i> 腫瘍はアフマチニブ投与により有意に腫瘍増殖能が抑制された。</p> <p>以上の研究により、<i>HER2</i> G776S 変異は <i>APC</i> 変異の共存下で HER2 下流シグナルの活性化や足場非依存的増殖能を獲得し、悪性能を促進することが示唆された。さらに HER2 標的治療が有効であることが示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は大腸癌患者のがんゲノム検査で検出された意義の未解明な *HER2* 変異 G776S について、共存する *APC* 変異との関りに注目しその機能的役割を検討し HER2 標的治療の有用性を評価した。

*HER2* G776S 及び野生型 *HER2* を発現するプラスミドベクターを作成し、大腸癌を含む複数の癌細胞株に導入し HER2 下流シグナルに及ぼす変化や形質変化を調べた。*APC* 変異のある大腸癌細胞株に *HER2* G776S を導入すると ERK, AKT のリン酸化及びコロニー形成が亢進したが *APC* 野生型細胞株ではそれらが見られなかった。*APC* 欠失細胞および *APC* 強制発現細胞に *HER2* G776S を導入することで、*APC* 変異が *HER2*G776S の癌遺伝子としての機能に影響を及ぼすか検証し、*HER2*G776S 変異は *APC* の機能喪失を伴うことで HER2 下流シグナルを活性化させコロニー形成を促進させることを示した。

*HER2* G776S に対する HER2 チロシンキナーゼ阻害薬の有効性に関し、*HER2* G776S を導入した大腸癌細胞 (*APC* 変異あり) にアフマチニブを投与すると細胞増殖及びコロニー形成が抑制され、*Xenograft* 腫瘍でも同様に腫瘍増殖が抑制され HER2 標的治療の有用性が示された。

以上の研究は大腸癌における *HER2* 変異と *APC* 変異との関係性の解明に貢献し、今後のがんゲノム医療や HER2 治療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 8 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降