

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790742

研究課題名（和文） ガンマセクレターゼインヒビターと放射線併用による治療効果の検討

研究課題名（英文） γ -secretase Inhibitor Enhances Antitumor Effect of Radiation in Notch Expressing Lung Cancer

研究代表者

榊原 純（小西 純）(SAKAKIBARA JUN)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：50374278

研究成果の概要（和文）：Notch 発現肺癌細胞株におけるガンマセクレターゼインヒビター（GSI）と放射線併用療法の抗腫瘍効果は治療スケジュールに依存していることが示された。放射線治療後に GSI を投与すると最も高い抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* ともに認めたが他の同時治療、GSI 後放射線照射では併用効果を認めなかった。併用治療は MAPK pathway や Bcl-2 ファミリー蛋白を介して肺癌細胞株をアポトーシスへ誘導することがわかった。さらに放射線治療後に活性化された Notch は GSI 投与により抑制されたことから GSI 投与により Notch が誘導する放射線抵抗性を改善することが示された。

研究成果の概要（英文）：We discovered that the antitumor effect of combining GSI (γ -secretase inhibitor) and radiation was dependent on treatment schedule. GSI administration after radiation had the greatest growth inhibition of lung cancer *in vitro* and *in vivo*. We showed that the combination induced apoptosis of lung cancer cell lines through the regulation of MAPK and Bcl-2 family proteins. Furthermore, activation of Notch after radiation was ameliorated by GSI administration, suggesting that treatment with GSI prevent Notch-induced radiation resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

Notch は肺癌の腫瘍増殖において重要な役割を果たしている事が報告されており、その inhibitor である γ -secretase inhibitor (GSI) は肺癌の apoptosis を誘導し細胞増殖を抑制する事を既に我々は報告してきた。一方で放射線治療は肺癌治療における重要な治療法の一つであるが、放射線により Notch の発現

が誘導され放射線抵抗性の一因になっていることが示唆されていることから、GSI との併用により治療抵抗性の改善とより高い腫瘍効果を示すと考えられる。しかし、GSI と放射線治療の併用に関する肺癌における報告は乏しくより詳細な検討が必要とされていた。

2. 研究の目的

1に述べた背景から Notch 発現肺癌細胞株における GSI と放射線の併用治療における抗腫瘍効果やその機序について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Notch 発現肺癌細胞株として HCC2429、H460、A549 を使用した。また Notch 発現のない肺癌細胞株として H1395 を使用した。GSI は *in vitro* で GSI I と GSI XX を *in vivo* では GSIXX を使用した。

in vitro において GSI と放射線治療の併用効果を検討するために MTT assay と clonogenic assay を用いた。放射線治療により Notch の発現が誘導されることから併用時の治療スケジュールの検討も行った。併用機序として apoptosis によるものか cell cycle arrest によるものか flow cytometry を使用し検討する。前述したように Notch の抑制による apoptosis において Bim の重要性をすでに報告しており、今回併用時における Bim の発現また他の apoptosis 関連蛋白の発現を Western blot にて検討する。

また *in vivo* における抗腫瘍効果の検討のためにヌードマウスを用いて肺癌細胞株を皮下に接種後 GSI 投与、放射線治療を開始し腫瘍のサイズを測定する。副作用の検討のために体重測定と治療後のマウス腸管の組織標本を作成し goblet cell の過形成の有無などを検討する。

4. 研究成果

Notch 発現肺癌細胞株における GSI と放射線併用療法の抗腫瘍効果は治療スケジュールに依存していることが示された。放射線治療後に GSI を投与すると最も高い抗腫瘍効果を認めた (図 1) が他の同時治療、GSI 後放

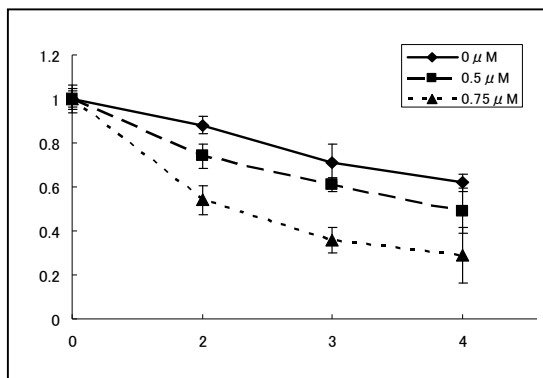


図 1. HCC2429 における clonogenic assay データ

単独治療と比較して放射線後 GSI 投与により高い抗腫瘍効果を示す。
横軸：放射線量、縦軸：survival fraction

射線照射では併用効果を認めなかった (図 2)。

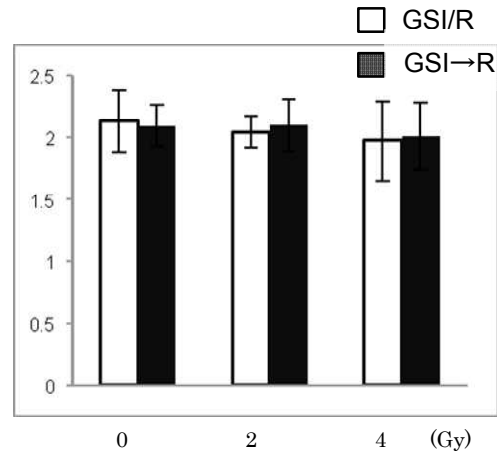


図 2：各治療スケジュールにおける IC50(μM) GSI/R:同時併用、GSI→R:GSI 投与後放射線照射においては併用効果を認めない。

一方で Notch 陰性の肺癌細胞株においては放射線治療と GSI の併用効果は認められず今回認められた併用効果は Notch 依存性であることが示された (図 3)。

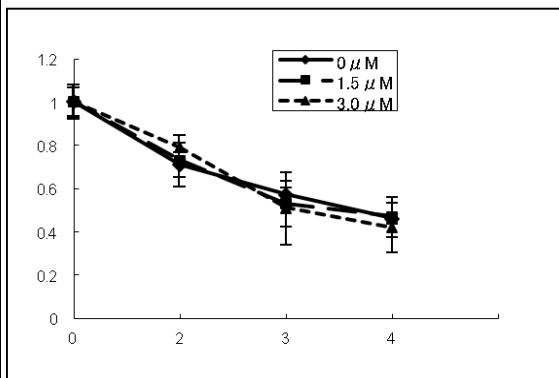


図 3：H1395 における clonogenic assay データ

Notch 陰性細胞においては併用効果が認められない。

横軸：放射線量、縦軸：survival fraction

併用治療の機序として Notch 蛋白の発現を検討したところ放射線照射後に Notch と Notch の標的遺伝子である HEY-1 の発現亢進を認め放射線照射により誘導された Notch

の活性は GSI 投与により抑制されたことから Notch pathway が放射線抵抗性に関与し GSI 投与が抵抗性の改善を引き起こしていることが示唆された (図 4)。

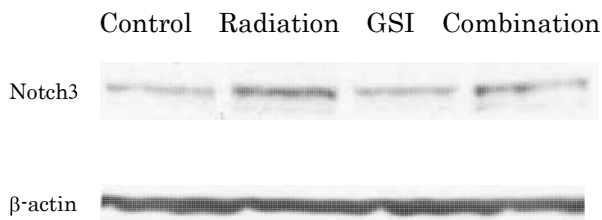


図 4: H460 における Notch3 の蛋白発現
放射線照射による亢進した Notch3 はその後の
GSI 投与 (Combination) により抑制される。

さらに併用治療は MAPK pathway や Bcl-2 ファミリー蛋白 (Bim) を介して肺癌細胞株を apoptosis へ導くことが認められた。

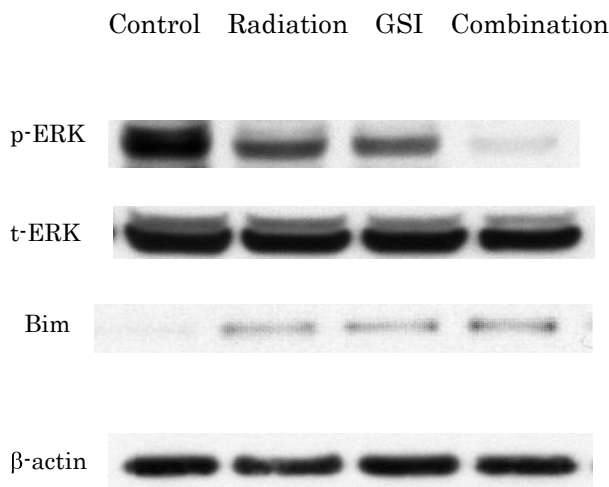


図 5. 各治療により p-ERK の抑制、Bim の発現上
昇を認めた。特に併用治療で影響を強く認めた。

また *in vivo* において放射線、GSI 単独治療はコントロールと比較して抗腫瘍効果を認めさらに併用治療において腫瘍の増大スピードは有為に単独治療と比較して抑制された (図 5)。治療に伴うマウスに体重減少や

腸管の goblet cell の過形成なども認められず重篤な副作用の発生はなかった。

これらの結果より放射線と GSi 併用治療は

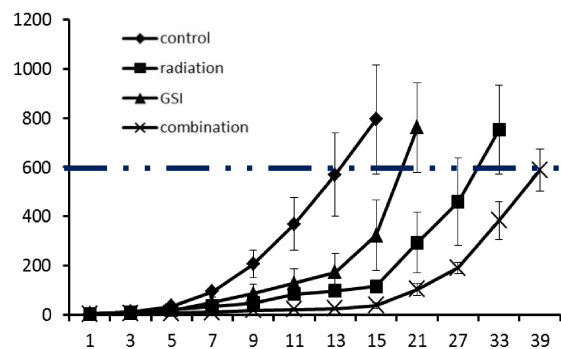


図 5. H460 における *in vivo* での併用治療効果
単独治療と比較して併用治療において明らかな腫瘍
増殖の抑制を認める。

縦軸：腫瘍サイズ (mm²)、横軸：日数 (日)

肺癌における新しい治療の選択肢となりうる
ことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Hidenori Mizugaki, Jun Sakakibara-Konishi, et al. γ -secretase Inhibitor enhances antitumor effect of radiation in Notch expressing lung cancer. *British Journal of Cancer* 106 (4) 1953-1959, 2012. 査読あり

2) Konishi J, Yi F, Chen X, Vo H, Carbone DP, Dang TP. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene*. 29(4) 589-596, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1) 水柿 秀紀, γ -secretase inhibitor と放射線照射併用による肺癌細胞に対する抗

- 腫瘍効果の検討、北海道癌談話会、2010年10月23日、北海道大学（札幌）
- 2) 水柿 秀紀、 γ -secretase inhibitor と放射線照射併用による肺癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討、日本臨床腫瘍学会、2010年3月18日、東京ビッグサイト（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 純 (SAKAKIBARA JUN)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：50374278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし