

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08080

研究課題名（和文）肺癌の定位放射線治療における個別化ゲノム医療の探求

研究課題名（英文）Exploring Personalized Medicine in Radiotherapy for Lung Cancer

研究代表者

田中 秀和（Tanaka, Hidekazu）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30509782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌定位照射例はイベント発生が少なく全脳照射例にて解析した。EGFR変異陽性例では陰性例に比べ頭蓋内制御率が有意に高かった。in vitroの解析ではEGFR遺伝子変異を有する細胞株3種と変異を有さない細胞株2種に対しコロニー形成試験を行い、変異陽性株は有意にコロニー形成が少なかった。H2AXを用いてDNA二重鎖切断の評価を行い変異陽性株と陰性株は照射後30分時点ではfoci数に差はなく、24時間時点においては陽性株で有意に多くfociが残存していた。臨床例、in vitroとも変異陽性の方が陰性に比べ放射線感受性が高いという結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物療法は腫瘍の遺伝子情報に応じて治療薬を選択することが当たり前になっている。しかし放射線治療はまだ遺伝子情報により治療内容が選択されることはない。本研究では遺伝子情報により放射線感受性が異なることを明らかにした。この結果をもとに感受性が高い遺伝子変異を有する場合、照射の線量を落とせる可能性がある。それにより有害事象を低減できる可能性がある。さらに今後、遺伝子情報に基づいて放射線治療の照射線量や照射範囲を決定する個別化放射線治療の礎となり得る。

研究成果の概要（英文）：Because stereotactic radiotherapy for lung cancer had fewer local recurrences, whole-brain radiotherapy cases were analyzed. The intracranial control rate was significantly higher in EGFR mutation-positive patients than in negative patients. For in vitro analysis, colony formation was tested in three cell lines with EGFR mutations and two cell lines without mutations, the mutation-positive cell lines showed significantly fewer colonies. DNA double-strand breaks were evaluated using H2AX. Although there was no difference in the number of foci between mutation-positive and mutation-negative cell lines at 30 minutes after irradiation, significantly more foci remained in the positive cell lines at 24 hours. The mutation-positive tumors were more radiosensitive than the mutation-negative tumors both in clinical and in vitro.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療 EGFR変異 肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌発症に深く関与する遺伝子異常 (Driver mutation) が次々と同定されている。その一つである上皮成長因子受容体 (EGFR: Epidermal growth factor receptor) の変異は最も頻度が高くアジア人、女性、非喫煙者に多くみられ、日本人の肺腺癌患者の 40%以上が変異を有するとされる。放射線治療は腫瘍の DNA を損傷することにより治療効果を発揮するが、EGFR は DNA 損傷の修復に関連し、放射線感受性に影響すると想定される。IV 期肺癌患者の治療方針を選択する際、肺癌診療ガイドラインによればドライバー遺伝子変異 / 転座に応じた治療を行うことが強く推奨されている。ドライバー遺伝子変異 / 転座を有する患者はその変異 / 転座に対応した分子標的薬が高い確率でよく奏効するためである。しかし放射線治療を行う際、ドライバー遺伝子変異 / 転座の有無が放射線治療効果に与える影響すら明らかになっておらず、極めて重要なバイオマーカーであるにも関わらず、その情報が放射線治療戦略に利用されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では肺癌のドライバー遺伝子変異 / 転座のうち、もっとも頻度の高い EGFR 遺伝子変異に着目し、その変異の有無により放射線感受性が異なるか否かを明らかにし、治療バイオマーカーとなりうるかを臨床および基礎の両面からアプローチする。それにより将来的には腫瘍の遺伝子情報に基づき放射線治療の線量や照射範囲などを最適化する個別化放射線治療 (Precision radiotherapy) の礎とすることである。

3. 研究の方法

(1) 臨床例における EGFR 遺伝子変異の有無と局所制御率の関係

対象は病理学的に非小細胞肺癌と診断されている患者のうち放射線治療単独治療が施行された患者とした。EGFR 遺伝子変異陽性例と陰性 / 不明例の 2 群において照射野内の制御率を Kaplan-Meier 法にて求め、ログ・ランク検定で比較する。

(2) *in vitro* における EGFR 遺伝子変異の有無とコロニー形成試験

EGFR 遺伝子変異を有する細胞株として HCC4006, PC-9, NCI-H1975 の 3 種、変異を有さない細胞株として A549, VMRC-LCD の 2 種の、合わせて 5 種の細胞株に対してコロニー形成試験を行う。各細胞株を培養し 10cm dish に撒いた状態で 0 (control), 2, 4, 8 Gy の照射を行い、その後 2 週間培養する。2 週間経過した時点でクリスタルバイオレット溶液にて染色を行いコロニー形成数をカウントする。EGFR 遺伝子変異陽性株と陰性株で各線量群毎にコロニー形成数に差があるかを評価する。

(3) *in vitro* における EGFR 遺伝子変異の有無と DNA 二重鎖切断の評価

上述の 5 種の細胞株を用いる。各細胞株に 4Gy の照射を行い照射後 30 分の時点で H2AX による免疫染色を行い foci をカウントすることで DNA 二重鎖切断の評価を行い、両群を比較する。また照射後 24 時間の時点でも改めて H2AX による評価を行い DNA 二重鎖切断の修復具体を評価し、両群を比較する。

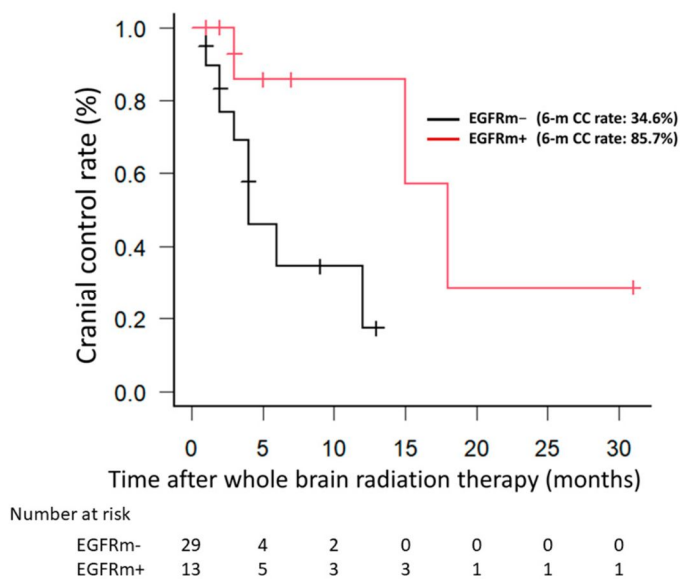
4. 研究成果

(1) 臨床例における EGFR 遺伝子変異の有無と局所制御率の関係

当初は放射線治療単独で治療が行われる症例として定位放射線治療例 (原発巣が 5cm 以下かつ cNOMO) を想定していたが、定位放射線治療は局所制御率が高いが故に局所再発イベントがほとんどなく統計学的な解析を行うためにはかなり多くの症例登録数が必要になる判断した。そこで同じ放射線治療単独で治療が行われる全脳照射例を対象とすることとした。全脳照射は神経毒性に配慮し化学療法は併用しないことが通常である。

病理学的に非小細胞肺癌と診断されている患者で転移性脳腫瘍により全脳照射が施行された症例の 42 例が登録された。男性 28 例 (66.7%)、女性 14 例 (33.3%) で年齢中央値は 68 歳 (範囲, 33-84 歳) であった。腺癌が 34 例 (81.0%) と最多であった。EGFR 遺伝子変異陽性例は 13 例 (31.0%) であった。経過観察期間中央値は 4 ヶ月 (範囲, 1-35 ヶ月) で、頭蓋内再発は 14 例 (33.3%) に

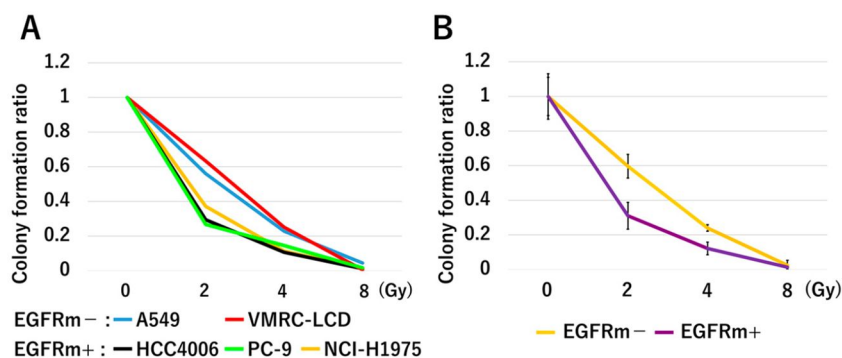
認められた。経過観察期間中に 39 例(92.9%)の症例が死亡した。EGFR 遺伝子変異陽性例の頭蓋内制御率は陰性 / 不明例のそれより有意に良好であった (下図, $p = 0.021$)。EGFR 遺伝子変異不明例を除いた解析でも同様の結果であった ($p = 0.014$)。



EGFR 遺伝子変異陽性例ではチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)がよく奏効することが知られている。TKI による影響を除外するため EGFR 遺伝子変異陽性例に限り、全脳照射後に TKI が使用された群と TKI が使用されなかった群に分けて評価したところ、両群の頭蓋内制御率に有意差は見られなかった ($p = 0.527$)。また全脳照射後に TKI が使用されていない患者に限り、EGFR 遺伝子変異陽性群と陰性 / 不明例で頭蓋内制御率を比較すると有意差はないものの($p = 0.168$)、EGFR 遺伝子変異陽性群では頭蓋内再発が 1 例も見られず頭蓋内制御率が良い傾向であった。

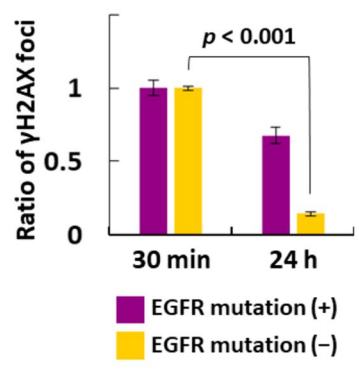
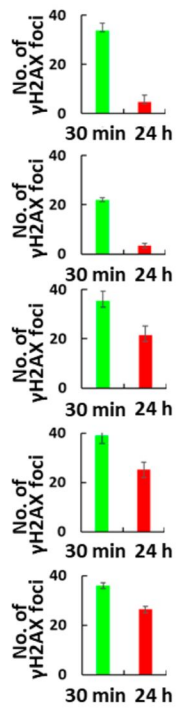
(2) *in vitro*における EGFR 遺伝子変異の有無とコロニー形成試験

EGFR 遺伝子変異を有する細胞株である HCC4006, PC-9, NCI-H1975、変異を有さない細胞株である A549, VMRC-LCD の 5 種に対して 0 (control), 2, 4, 8 Gy の照射を行い、2 週間後のコロニー形成数をカウントした。0 (control) Gy のコロニー形成数を 1 とし 2, 4, 8 Gy 照射後のコロニー数の比を求めた。EGFR 遺伝子変異陽性群では変異陰性群に比べ 2, 4 Gy 照射後のコロニー形成数が有意に低かった (下図, $p = 0.002, 0.002$)。



(3) *in vitro*における EGFR 遺伝子変異の有無と DNA 二重鎖切断の評価

各細胞株に 4Gy の照射を行い照射後 30 分および 24 時間の時点で H2AX による免疫染色を行い foci をカウントした。30 分時点の foci を 1 として 24 時間時点の foci 数の比をとると、EGFR 遺伝子変異陽性群は変異陰性群に比べ有意に foci が多く残存していた(下図, $p < 0.001$)。すなわち DNA 二重鎖切断の残存が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka H., Karita M., Ueda K., Ono T., Manabe Y., Kajima M., Fujimoto K., Yuasa Y., Shiinoki T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Difference in Radiosensitivity Depending on the Presence and Absence of EGFR Mutations: Clinical and In Vitro Analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Oncology Biology Physics	6. 最初と最後の頁 e63 ~ e63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijrobp.2023.06.785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hidekazu, Karita Masako, Ueda Kazushi, Ono Taiki, Kajima Miki, Manabe Yuki, Fujimoto Koya, Yuasa Yuki, Shiinoki Takehiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Differences in Radiosensitivity According to EGFR Mutation Status in Non-Small Cell Lung Cancer: A Clinical and In Vitro Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 25 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm14010025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tanaka H, Karita M, Ueda K, Ono T, Manabe Y, Kajima M, Fujimoto K, Yuasa Y, Shiinoki T
2. 発表標題 Difference in radiosensitivity depending on the presence and absence of EGFR mutations: Clinical and in vitro analyses
3. 学会等名 ASTRO annual meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	椎木 健裕 (Shiinoki Takehiro) (30610456)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------