

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18269

研究課題名（和文）甲状腺癌に対する分子標的薬併用内/外放射線治療法の開発

研究課題名（英文）Development of combination therapy with molecular targeted drugs and internal/external radiation therapy for thyroid cancer

研究代表者

酒井 遥（SAKAI, Haruka）

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80757609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では甲状腺癌に対する放射線療法と分子標的薬レンバチニブの相乗効果に着目し、両者の併用による抗腫瘍効果とそのメカニズムについての基礎的検討をおこなった。甲状腺癌細胞株（K1、FTC-133）とその担癌マウスを用いた実験で、放射線外照射とレンバチニブの併用療法により高い抗腫瘍効果が得られることが示され、そのメカニズムとしてアポトーシスの誘導、G2/M期における細胞周期の停止、照射後の腫瘍細胞内におけるレンバチニブ濃度の上昇が寄与している可能性が示唆された。本研究の発展により、難治性甲状腺癌に対する新たな分子標的薬併用放射線療法の開発とその臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳頭癌や濾胞癌などの分化型甲状腺癌は一般的に予後良好であるが、再発・転移性甲状腺癌の予後は不良である。分子標的薬や放射線治療（外照射、放射性ヨウ素内用療法）は単独でのみ用いられるがその治療効果は限定的であり、新たな治療法の開発が望まれている。分子標的薬と放射線治療を併用することで、より高い治療効果が得られ、再発・転移を伴う難治性甲状腺癌でも根治できる可能性がありその社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focus on the synergistic effects of radiation therapy and lenvatinib, a molecularly targeted drug, on thyroid cancer and investigate a preclinical study on the antitumor effect and its mechanism of combination therapy. In experiments using thyroid cancer cell lines (K1, FTC-133) and their xenograft mice, we demonstrated that the combination therapy with external beam radiation and lenvatinib achieved a high antitumor effect, induced by apoptosis, cell cycle arrest in the G2/M phase, and an elevated concentration of lenvatinib in the irradiated tumor cells. The development of this study could lead to the establishment of a new combination therapy with molecular-targeted drugs and radiation therapy and its clinical application for refractory thyroid cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：甲状腺癌 外照射 I-131 分子標的薬 レンバチニブ 併用療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分化型甲状腺癌(乳頭癌および濾胞癌)は一般に予後良好とされるが、高リスク群(進行癌)では局所再発や遠隔転移がしばしば認められる。こうした再発・転移性甲状腺癌の治療選択肢としては従来再手術と放射性ヨウ素($I-131$)内用療法があるが、高リスク群の10年生存率は60~70%に留まる。さらに2014年から分子標的薬(VEGFRやFGFRを阻害するレンバチニブなど)が保険適応となったが、一定の延命効果を示すに過ぎない¹⁾。頭頸部扁平上皮癌においては化学放射線療法や分子標的薬併用放射線療法が奏効しており^{2,3)}、乳癌のXenograftモデルにおいてはアイソトープ治療と化学療法の相乗効果が報告されている⁴⁾。甲状腺癌再発薬に対しても同様の治療を行えばより高い治療効果を得られることが推察されるが、分子標的薬と放射線の併用療法はこれまで検討されていない。甲状腺癌の罹患数は近年増加傾向にあり、再発・転移性甲状腺癌も今後増えることが予想され新たな治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、甲状腺癌に対する放射線療法(外照射あるいは $I-131$)と分子標的薬レンバチニブの相乗効果に着目し、両者の併用による抗腫瘍効果とそのメカニズムについて甲状腺癌細胞株と甲状腺癌モデルマウスを用いて検討した。これにより、甲状腺癌に対する新たな分子標的薬併用放射線療法の確立とその臨床応用に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌に対する放射線外照射とレンバチニブ併用療法の検討

放射線外照射とレンバチニブの併用による細胞増殖抑制効果の検討(*In vitro*):

分化型甲状腺癌細胞株(K1、FTC-133)に対し、ガンマセル放射線照射器($Cs-137$)を用いた外照射(0、3Gy)およびレンバチニブ(0、3、10、20 μ M)の投与を行い、単独群、併用群における細胞増殖率を経時的に評価した。また、上記処理を施行した細胞に対して細胞増殖マーカーKi-67(マウスモノクローナル抗体)を用いた蛍光免疫染色を行った。

甲状腺癌モデルマウスを用いた併用療法による抗腫瘍効果の検討(*in vivo*):

K1もしくはFTC-133細胞(5M)を皮下に移植したヌードマウス(甲状腺癌モデルマウス)をA. コントロール、B. レンバチニブのみ(10mg/kg/日)、C. 外照射のみ(3Gy \times 3回)、D. 外照射(3Gy \times 3回)+レンバチニブ(10mg/kg/日)の4群に分け、各群における経時的な腫瘍体積計測および摘出時の腫瘍重量により抗腫瘍効果を比較検討した。

併用療法による抗腫瘍効果のメカニズムの検討(*In vitro*):

外照射(0、3Gy)およびレンバチニブ(0、20 μ M)投与後の腫瘍細胞のアポトーシス(AnnexinV、7-AADで標識)、細胞周期(PIで標識)についてフローサイトメトリー(FACS Calibur)を用いて解析した。さらに、液体クロマトグラフィー-質量分析法(Liquid chromatography and mass spectrometry: LC-MS/MS)を用いて外照射施行後の腫瘍細胞内におけるレンバチニブ濃度を解析した。照射なしと3Gy照射後のK1細胞をプレートに播種し、翌日から20 μ Mレンバチニブを24時間から72時間投与し、細胞ライセートを回収した。80%アセトンで除タンパクを行ったのち、上清中に含まれるレンバチニブ濃度をLC-MS/MSを用いて解析した。

(2) 甲状腺癌に対する $I-131$ とレンバチニブ併用療法の検討

$I-131$ とレンバチニブの併用による細胞増殖抑制効果の検討(*In vitro*):

K1細胞またはK1細胞にナトリウム-ヨウ素共輸送体(sodium-iodide symporter: NIS)をコードするSLC5A5遺伝子を導入しNISを強発現させた細胞(K1-NIS)に対し、 $I-131$ (3.7MBq/ml、30分間)とレンバチニブ(20 μ M、6日間)の投与を行い、単独群、併用群における細胞増殖抑制効果をコロニー形成アッセイにて比較検討した。

甲状腺癌モデルマウスを用いた併用療法による抗腫瘍効果の検討(*in vivo*):

K1-NIS細胞(5M)を皮下に移植したNOD/SCIDマウス(甲状腺癌モデルマウス)をA. コントロール、B. レンバチニブのみ(10mg/kg/日)、C. $I-131$ のみ(3.7MBq、経静脈投与)、 $I-131$ (3.7MBq、経静脈投与)+レンバチニブ(10mg/kg/日)の4群に分け、各群における経時的な腫瘍体積計測および摘出時の腫瘍重量により抗腫瘍効果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 甲状腺癌に対する放射線外照射とレンバチニブ併用療法の検討

放射線外照射とレンバチニブの併用による細胞増殖抑制効果の検討(*In vitro*):

K1、FTC-133いずれの細胞株においても放射線外照射あるいはレンバチニブ単独投与により用量依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。培養開始7日後の時点で、放射線外照射とレンバチニブの併用群において細胞増殖抑制効果は顕著であり、両者の併用による相乗効果が示唆された。また、Ki-67を用いた蛍光免疫染色では併用療法群においてKi-67の発現が有意に低下しており、併用療法による細胞増殖能の抑制が示唆された。

甲状腺癌モデルマウスを用いた併用療法による抗腫瘍効果の検討(*in vivo*):

K1 および FTC-133 細胞いずれのモデルマウスにおいてもレンバチニブ + 放射線外照射併用群において特に腫瘍増殖抑制効果は顕著であり(図1) 摘出時の腫瘍重量も有意に軽い結果であった。以上より、レンバチニブ + 放射線外照射併用療法の相乗効果が *in vivo* においても示された。なお、マウス体重はいずれの群でも有意な差を認めず、動物実験において併用療法による明らかな副作用は認めなかった。

併用療法による抗腫瘍効果のメカニズムの検討 (*In vitro*):

アポトーシス解析では K1、FTC-133 いずれの細胞株においても外照射 (3Gy) あるいは 20 μ M レンバチニブの単独投与でアポトーシスの誘導を認めなかったが、両者の併用によりアポトーシス細胞の比率が有意に上昇した。細胞周期解析では、K1 細胞において外照射 (3Gy) あるいは 20 μ M レンバチニブの単独投与で有意な変化を認めなかったが、両者の併用により G2/M 期細胞の比率が有意に上昇し、G2/M 期における細胞周期の停止が示唆された。さらに、LC-MS/MS を用いた腫瘍細胞内レンバチニブ濃度の解析では、外照射 (3Gy) 処理後の細胞においてレンバチニブ投与後 48~72 時間でコントロール (照射なし) と比べ細胞内レンバチニブ濃度の有意な上昇を認めた (図2)。これらの結果より、併用療法によるアポトーシス誘導、G2/M 期における細胞周期の停止、および腫瘍細胞内へのレンバチニブ取り込みの亢進が高い抗腫瘍効果に寄与している可能性が示唆された。

(2) 甲状腺癌に対する I-131 とレンバチニブ併用療法の検討

I-131 とレンバチニブの併用による細胞増殖抑制効果の検討 (*In vitro*):

K1、K1-NIS いずれの細胞株においても I-131 とレンバチニブの併用によりコロニー形成は有意に抑制されたが、特に K1-NIS においてその効果は顕著であった (図3A)。I は NIS の働きにより細胞内に取り込まれることが報告されており、NIS を発現する甲状腺癌において、特に併用療法の効果が高くなることが示唆された。

甲状腺癌モデルマウスを用いた併用療法による抗腫瘍効果の検討 (*in vivo*):

甲状腺癌モデルマウス (K1-NIS) を用いた検討において、I-131 とレンバチニブの併用療法群では他の治療群と比べ有意に高い抗腫瘍効果を認めた (図3B)。

本研究において、甲状腺癌に対する放射線 (外照射および I-131) とレンバチニブの併用による相乗効果が *in vitro* と *in vivo* の双方において示された。併用療法による効果が得られれば、再発・転移性甲状腺癌に対しても延命効果に留まらず根治が可能となる可能性がある。また、相乗効果が強ければ低用量の I-131 による外来通院治療が可能となり、より多くの患者に恩恵をもたらせる。今後さらなる研究の発展により、難治性甲状腺癌に対する新しい治療法の開発が期待される。

< 引用文献 >

1. M Schlumberger, M Tahara, LJ Wirth, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* 372: 621-630, 2015.
2. JP Pignon, A le Maitre, E Maillard, et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 92: 4-14, 2009.
3. JA Bonner, PM Harari, J Giralt, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-578, 2006.
4. L Tian, Q Chen, X Yi, et al. Radionuclide I-131 Labeled Albumin-Paclitaxel Nanoparticles for Synergistic Combined Chemo-radioisotope Therapy of Cancer. *Theranostics* 7(3): 614-623, 2017.

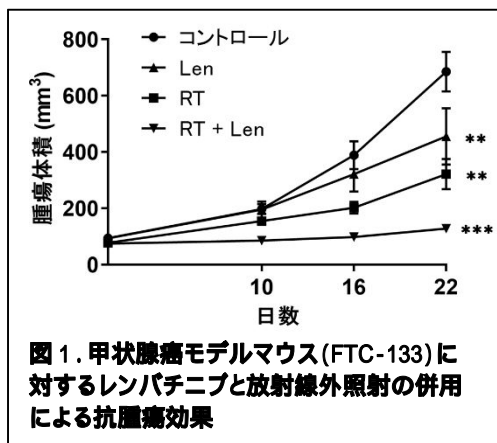


図1. 甲状腺癌モデルマウス(FTC-133)に対するレンバチニブと放射線外照射の併用による抗腫瘍効果

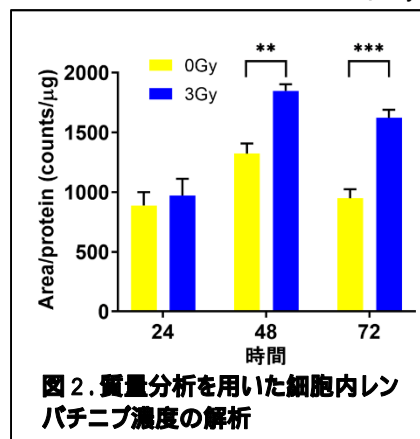


図2. 質量分析を用いた細胞内レンバチニブ濃度の解析

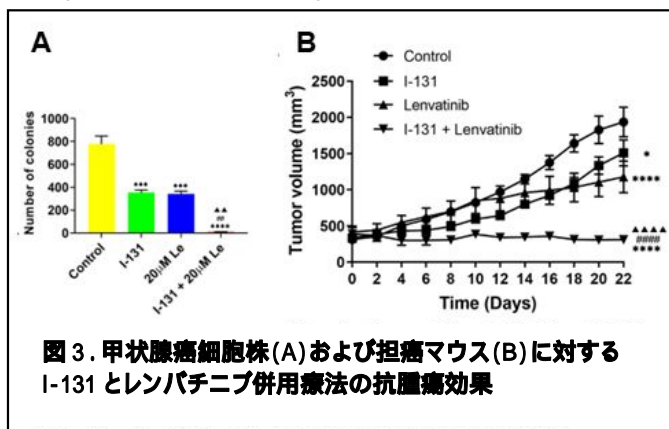


図3. 甲状腺癌細胞株(A)および担癌マウス(B)に対するI-131とレンバチニブ併用療法の抗腫瘍効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Kensuke Suzuki, Hiroshi Iwai, Keita Utsunomiya, Yumiko Kono, Tadashi Watabe, Yoshiki Kobayashi, Dan Van Bui, Shunsuke Sawada, Yasutaka Yun, Akitoshi Mitani, Kenta Fukui, Haruka Sakai, Hanh Hong Chu, Nguyen Manh Linh, Noboru Tanigawa and Akira Kanda	4. 巻 23(17)
2. 論文標題 Efficacy of Combination Therapy with Lenvatinib and Radioactive Iodine in Thyroid Cancer Preclinical Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23179872	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 -

1. 著者名 鈴木 健介, 岩井 大, 宇都宮 啓太, 河野 由美子, 小林 良樹, 尹 泰貴, 三谷 彰俊, 福井 研太, 酒井 遥, 谷川 昇, 神田 晃	4. 巻 73
2. 論文標題 レンパチニブ併用放射線療法による新たな甲状腺癌治療の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 関西医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5361/jkmu.73.1	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 -

1. 著者名 鈴木 健介, 岩井 大, 宇都宮 啓太, 河野 由美子, 小林 良樹, Dan Van Bui, 澤田 俊輔, 尹 泰貴, 三谷 彰俊, 福井 研太, 酒井 遥, 谷川 昇, 神田 晃	4. 巻 35
2. 論文標題 レンパチニブ併用放射線療法を用いた甲状腺癌治療に向けての基礎研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 73-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 健介, 岩井 大, 宇都宮 啓太, 河野 由美子, 三谷 彰俊, 酒井 遥, 福井 研太, 谷川 昇
2. 発表標題 基礎研究からみた甲状腺癌に対するレンパチニブ併用放射線療法の可能性
3. 学会等名 第57回日本医学放射線学会秋季臨床学会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 健介, 岩井 大, 宇都宮 啓太, 河野 由美子, 小林 良樹, Dan Van Bui, 澤田 俊輔, 尹 泰貴, 三谷 彰俊, 福井 研太, 酒井 遥, 谷川 昇, 神田 晃
2. 発表標題 レンパチニブ併用放射線療法を用いた甲状腺癌治療に向けての基礎研究
3. 学会等名 第38回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2021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
研究協力者	鈴木 健介 (SUZUKI Kensuke) (80533182)		
研究協力者	岩井 大 (IWAI Hiroshi) (10232638)		
研究協力者	神田 晃 (KANDA Akira) (70375244)		
研究協力者	宇都宮 啓太 (UTSUNOMIYA Keita) (20193914)		
研究協力者	河野 由美子 (KOUNO Yumiko) (10598957)		

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
---------	---------