

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659937

研究課題名（和文）EGFR/FGFR デュアルインヒビターによる放射線耐性克服強化療法の開発

研究課題名（英文）Development of the radioresistance conquest reinforcement therapy by an EGFR/FGFR dual inhibitor.

研究代表者

鵜澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

研究成果の概要（和文）：放射線療法を含む従来の治療法は扁平上皮癌を治すことができず、新しい治療法が必要とされている。我々は扁平上皮癌の放射線治療抵抗性克服のため、口腔癌細胞株にて放射線耐性関連遺伝子(EGFR および FGFR) を同定した。マウスを用いた実験系で、EGFR および FGFR の阻害剤 (PD173074) を併用した放射線照射が効果的な腫瘍抑制を示したため、本結果は放射線増強療法開発にとって非常に有益なデータと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Conventional therapies including radiation therapy cannot cure squamous cell carcinoma and new treatments are clearly required. We identified the radiation resistance related gene (EGFR and FGFR) in the oral cancer cell line to overcome radiotherapy resistance for squamous cell carcinoma. In vivo, irradiation with dual inhibitor (PD173074) of EGFR and FGFR showed effective tumor suppression. Therefore it is considered to be very meaningful for the development of the radiation-enhancing treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1)口腔癌、(2)放射線治療、(3)EGFR、(4)FGFR、(5)デュアルインヒビター、(6)PD173074

1. 研究開始当初の背景

放射線耐性遺伝子や因子は現在世界中で研究が盛んに行われているが、耐性克服法にまで至った研究はほとんどない。私たちのグループは、平成 15 年から 19 年まで千葉大学で行われた 21 世紀 COE プログラムにおける研究において、放射線耐性遺伝子を網羅的に検索し、25 種類の放射線耐性遺伝子候補を同定した。これらの候補遺伝子の中で、EGFR と FGFR は非常に多くの放射線耐性腫瘍において発現が高いことを多くの臨床材料で明らかにしてきた。今回、EGFR と FGFR のデュアルインヒビターである低分子化合物

PD173074 (sigma-aldrich 社) を見つけたので、siRNA による遺伝子治療に加えて、薬剤併用治療法の開発を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

放射線治療は重要な癌治療法であるが、放射線に耐性を示す腫瘍にしばしば遭遇する。一方、放射線感受性の腫瘍を治療する場合でも、人体は放射線に弱いため、線量に制限があると同時に限局した狭い範囲にしか照射ができないので、再発時などに放射線治療を繰り返して行えない。本研究は、①放射線に対する耐性を克服するとともに、②低線量で

十分な殺腫瘍効果が得られる強化療法を開発し、さらに、③広範囲照射や繰り返し照射治療が可能となる新しい放射線治療法に道を開くことを目的とした、ブレークスルーを狙った研究である。

3. 研究の方法

(1) EGFR、FGFR 発現量の評価

悪性腫瘍の由来組織、病理学的組織型などの違いによるEGFRとFGFRに発現量に違いがあるため、各種癌由来培養細胞（扁平上皮癌:HSC-2、HSC-3、腺癌:A549、悪性黒色腫:G361、肉腫:HS-Os-1）におけるEGFRとFGFRの発現量をReal-time PCR法で明らかにする。

(2) 放射線耐性・感受性株の評価

それらの全ての細胞株にX線の照射量を段階的に増やして照射し、照射に対するサバイバルカーブを求める。

(3) *in vitro*における siRNA 併用 X線感受性効果

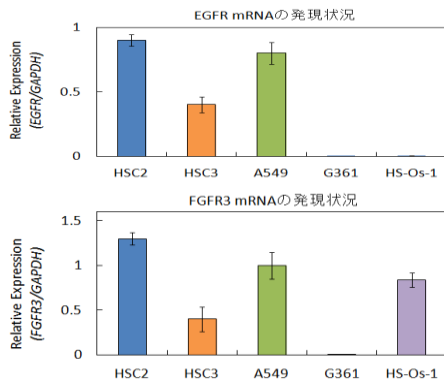
siRNAを併用した状態でX線を段階的に増やして照射し、各細胞株の*in vitro*における遺伝子抑制によるX線感受性の変化を明らかにする。

(4) *in vitro*における PD173074 併用 X線感受性効果

PD173074を併用した状態でX線を段階的に増やして照射し、各細胞株の*in vitro*における遺伝子抑制によるX線感受性の変化を明らかにする。

(5) *in vivo*における X線感受性効果

*in vivo*においてPD173074とX線併用による感受性の変化を確認する。この実験では、薬剤濃度を段階的に変えて実験を行い、PD173074の併用至適濃度を定める。なにも行わない群(control)、PD173074のみを投与した群(PD173074 alone)、X線のみ照射した群(radiation alone)、PD173074と放射線を併用した群(radiation + PD173074)のそれぞれ腫瘍サイズの変化を確認した。

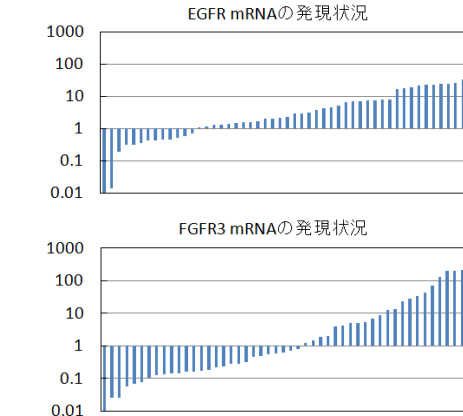


4. 研究成果

(1) EGFR、FGFR 発現量の評価

各種癌由来培養細胞におけるEGFRおよびFGFRのmRNA発現量をReal-time PCR法で確認したところ、悪性黒色腫細胞株で発現が低かった。(図1)

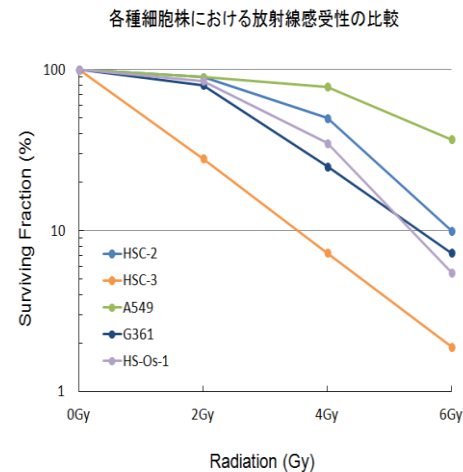
(図1、各種細胞株におけるEGFR、FGFR3の



mRNA 発現の比較)

また、臨床検体50例におけるEGFRとFGFR3の発現は正常組織と比較して口腔癌組織においてEGFRで74%、FGFR3で46%の症例で発現亢進を認めた。(図2)

(図2、臨床検体におけるEGFR、FGFR3のmRNA発現状況)



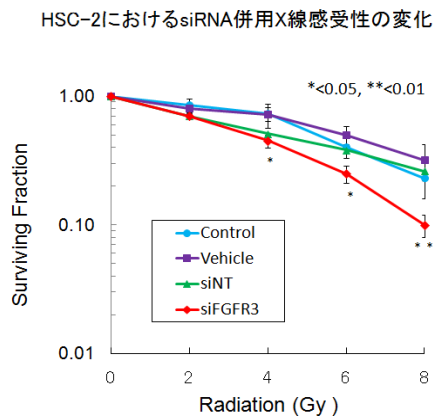
(2) 放射線耐性・感受性株の評価

各種株に放射線を段階的に照射し、その生存率で耐性を評価した。口腔癌細胞株のうち放射線耐性が高いものはHSC-2であった。(図3)

(図3、各種細胞株における放射線感受性の比較)

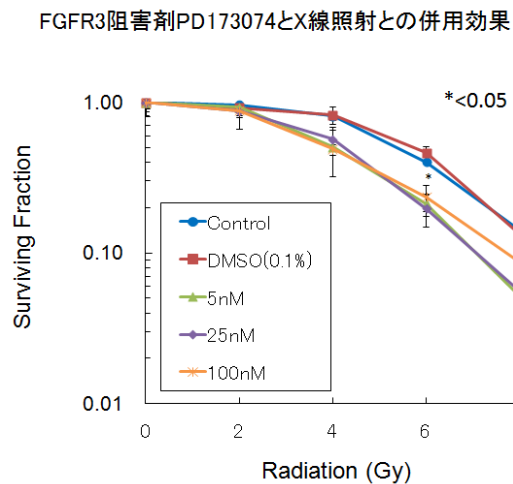
(3) *in vitro*における siRNA 併用 X線感受性

効果



放射線耐性細胞株（HSC-2）に対して siRNA による FGFR3 発現抑制を行った。FGFR3 遺伝子を抑制することにより、コントロール細胞と比較して X 線に対する感受性が増すことが確認された。（図 4）

（図 4、HSC-2 における siRNA 併用 X 線感受性の変化 * < 0.05, ** < 0.01）



(4) *in vitro*における PD173074 併用 X 線感受性効果

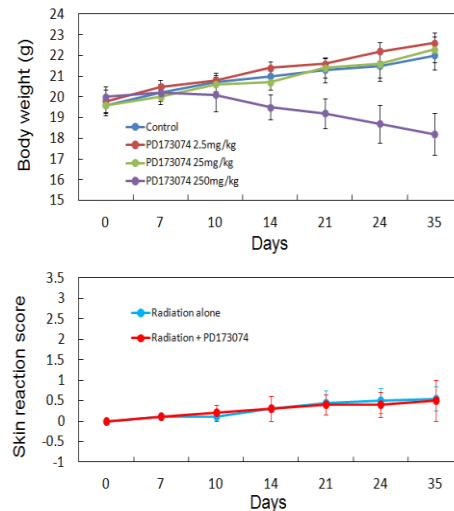
FGFR3 阻害剤 PD173074 投与した細胞群では X 線照射による放射線耐性株（HSC-2）の抗アポトーシス阻害効果が認められた。（図 5）

（図 5、HSC-2 における FGFR3 阻害剤 PD173074 と X 線照射との併用効果 * < 0.05）

(5) *in vivo*における X 線感受性効果

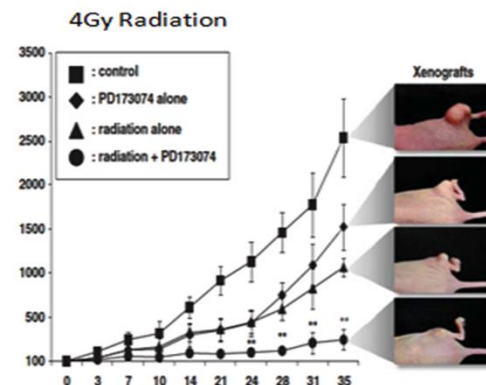
予備実験として PD173074 を 2.5mg/kg, 25mg/kg, 250mg/kg で投与したところ、250mg/kg で投与すると体重減少を認めた。よって至適濃度を副作用のない 25mg/kg として動物実験を行った。また、放射線照射は 4 Gy

PD173074投与および放射線照射に対する副作用の評価



とし、スキンリアクションスコアで副作用を評価したところ、コントロールと比較して有意差は認められなかった。（図 6）

マウス移植腫瘍に対するPD173074併用放射線照射の腫瘍増殖抑制効果



（図 6、PD173074 投与および放射線照射に対する副作用の評価）

*in vitro*と同様に動物実験においても、PD173074 併用 X 線照射群が最も強い腫瘍増殖抑制効果が認められた。（図 7）

（図 7、マウス移植腫瘍に対する PD173074 併用放射線照射の腫瘍増殖抑制効果）

[まとめ]

網羅的遺伝子発現解析および IPA により、口腔扁平上皮癌における放射線耐性関連候補遺伝子を 25 遺伝子選出し、その中から阻害剤を有する EGFR と FGFR3 に着目し、EGFR と FGFR のデュアルインヒビターである低分子化合物 PD173074 を用いて実験を行った。本実験では主に FGFR をターゲットとした。

siRNA 処理をした放射線耐性細胞 HSC-2 は X

線照射に対する感受性がみられた。また、FGFR3 阻害剤 PD173074 投与した細胞群でも X 線照射による放射線耐性株の抗アポトーシス阻害効果が口腔癌細胞株および肺癌細胞株で認められた。さらに、*in vivo*においても PD173074 併用 X 線照射により、強い腫瘍増殖抑制効果が認められた。

以上の結果より、今後、薬剤併用放射線療法は新しい放射線治療法として大いに期待できる。さらに、EGFR についても実験を進めれば、さらなる適応範囲が広がるであろう。

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 1 件)

Oncogene. 2011 Oct 27;30(43):4447-52.
Uzawa K, Ishigami T, Fushimi K, Kawata T, Shinozuka K, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Ito H, Tanzawa H.
Targeting fibroblast growth factor receptor 3 enhances radiosensitivity in human squamous cancer cells. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

第 70 回日本癌学会学術総会
平成 23 年 10 月 3~5 日 (名古屋)
石毛俊作、伊豫田学、伏見一章、石上享嗣、笠松厚志、鵜澤一弘、丹沢秀樹
FGFR3 を標的としたヒト扁平上皮癌細胞の放射線感受性回帰

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：30302558

(2) 研究分担者

神津 由直 (KOUZU YUKINAO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70400942

(3) 連携研究者

()

研究者番号：