

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：22304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10002

研究課題名(和文) 大腸癌に対するEGFR経路の抑制を基盤とした新たな分子標的放射線療法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular target radiation therapy based on suppression of EGFR pathway for colorectal cancer

研究代表者

原 孝光 (Hara, Takamitsu)

群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・教授

研究者番号：70464542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRの分子標的薬であるセツキシマブと放射線療法の併用により頭頸部癌において放射線増感効果を有することが報告されている。化学放射線療法は、EGFRを発現した大腸癌に対して有効な治療法と考えられる。そこで我々は、大腸がんにおいてもセツキシマブと放射線療法との併用が有効な治療法であると考えた。8種類のヒト大腸癌細胞株の放射線感受性およびセツキシマブによる放射線増感効果の有無をコロニー形成法により調べた結果、セツキシマブによる放射線増感効果を、8種類の細胞株のうち3種類の細胞株で認めた。増感効果はセツキシマブの後処理のみであった事より、セツキシマブが放射線損傷の回復を阻害している事が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chemoradiotherapy is considered as an enhanced effective therapy on colon cancers. It has already been reported improved outcome by combination of cetuximab, a molecular EGFR-targeted drug, and radiotherapy which has synergistic effect in head and neck cancers. Therefore, we hypothesized that combination of cetuximab and radiotherapy on colon cancers would be an effective therapy. First, radiation sensitivities of 8 human colon cancer cell lines were examined by colony formation method. Next, radiosensitizing effect of cetuximab on each cell lines were examined by colony formation method. RadioSensitizing effect of cetuximab was observed in 3 of the 8 cell lines. our data was suggested that cetuximab possibly inhibited the recovery from radiation damage, because all sensitizations were shown when cell lines were treated with cetuximab 24 h after irradiation.

研究分野：放射線生物

キーワード：EGFR セツキシマブ 大腸がん 放射線増感効果 DNA2重鎖切断 亜致死損傷回復 潜在的致死損傷回復 化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の放射線治療を行う場合において大腸自身がリスク臓器となっており、IMRTなどの技術を用いても投与線量の増加を図ることは困難である。そこで薬剤を併用することにより腫瘍に対してのみ放射線増感効果を誘導できれば有効な治療法となる。大腸癌の多くは上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor:以下、EGFR とする) を発現していることが報告されており<sup>1)</sup>、また EGFR の発現は腫瘍増殖、進行病期、再発リスクの増加、放射線抵抗性、予後不良に關与していることがわかっている<sup>2)</sup>。EGFR を標的とした分子標的薬として cetuximab などがあり、既に頭頸部癌では cetuximab と放射線治療の併用により放射線増感効果が得られ、治療成績が向上することが報告されている<sup>3)</sup>。

2. 研究の目的

頭頸部癌では放射線治療との併用により増感効果が得られていることが既に報告されている cetuximab が、大腸癌においても X 線照射と併用することで放射線増感効果が得られるかを検討する事を第一の目的とし、放射線増感効果が得られた場合はその増感効果をもたらすメカニズムの解明を第二の目的とした。

3. 研究の方法

最初に遺伝子背景が異なっている 8 種類のヒト大腸癌細胞株のそれぞれに対する cetuximab 単独の殺細胞効果をアラマーブルー法で Al-Nasiry らの方法<sup>4)</sup>に準じて測定した。細胞生残率が 80%を示す cetuximab の濃度を求め、その後の放射線との併用実験に使用した。放射線感受性はコロニー形成法を用いて測定した。方法は Hara<sup>5)</sup>らの方法に準じて行った。Cetuximab の処理は 24 時間とし細胞播種後 24 時間から X 線照射直前までの処理を pre treat とし、X 照射直前から照射後 24 時間までの処理を post treat とした。

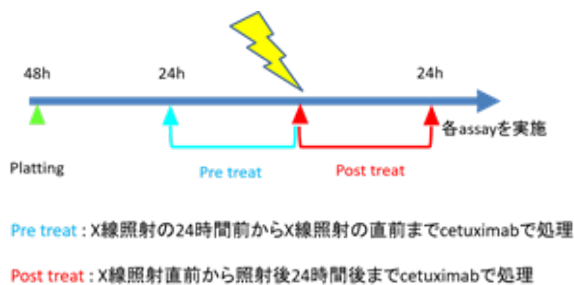


図1 コロニー形成法のプロトコール

また、ヒト大腸癌細胞株の EGFR の発現量は Hara<sup>6)</sup>らの方法に準じて western blot で評価を行った。同様に放射線照射後の DNA 二重鎖切断の継時的修復状態への cetuximab の影響も放射線障害からの亜致死損傷回復 (SLDR)、潜在的致死損傷回復 (PLDR) における cetuximab の影響も Hara<sup>5)</sup>らの方法に準じて評価した。

4. 研究成果

4-1 cetuximab 単独での各大腸癌細胞株に対する殺細胞効果

8 種類のヒト大腸癌細胞株の cetuximab に対する薬剤単独での感受性を AlamerBlue 法で調べた。グラフは縦軸に細胞生残率、横軸に cetuximab 濃度を取っている。図 2 が示すように cetuximab の濃度は 0.0001 μM から 1 μM まで変化させた。薬剤感受性は各細胞株において似たような傾向を示し、0.01 μM 前後から細胞生残率が減少し始めた。今回は cetuximab を放射線増感剤と使用することにした。つまり放射線照射と薬剤の併用においては、臨床応用において正常組織に与える影響を考えたとき、薬剤単独での作用がなるべく少ない濃度が理想的と考えた。従って、肩に近い部分である、80%以上の細胞生残率を与える薬剤濃度を用いることにした。以上より、図 2 から、放射線照射と併用する薬剤濃度は

- 0.05 μM (LS174T, LoVo)
  - 0.1 μM (HT29, RKO, SW480, CoCM-1, RCM-1)
  - 0.15 μM (HCT116)
- の 3 種類に決定した。

Cetuximab単独での殺細胞効果 (alamerblue法)

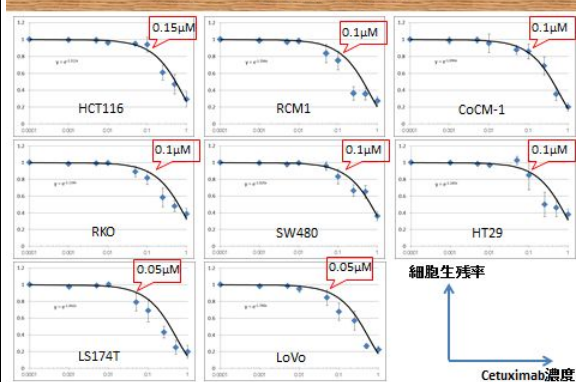


図2 cetuximab 単独での殺細胞効果

4-2 各種大腸癌細胞株における EGFR 発現量と遺伝子変異

次に各種ヒト大腸癌細胞株における EGFR 発現量を western blot 法で、遺伝子状態をがん細胞のデータベース Catalogue of somatic mutation in cancer :COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) および文献にて調べた。

初めに遺伝子情報を表 1 に記す。調べた遺伝子は EGFR とそのシグナル伝達経路に關係する K-Ras, B-Raf, PIK3CA, PTEN, TP53 の 6 種類である。

野生型を wt(wild type)、変異型を mut(mutation)で表している。

EGFR に関しては判明した細胞株すべてにおいて wt であった。一方、EGFR のシグナル伝達に關係する遺伝子はどの細胞株においても必ず 1 つは mut が入っていた。つまり、すべての細胞株で EGFR のシグナル伝達経路がどれか一つは必ず常時活性化している状

態であることが分かった。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Genes	HT29	HCT116	LS174T	LoVo	RKO	SW480	CoCM-1	RCM-1
EGFR	wt	wt		wt	wt			wt
K-Ras	wt	mut	mut	mut	wt	mut	wt	mut
B-Raf	mut	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt
PIK3CA	mut	mut	mut	wt	mut	wt	mut	wt
PTEN	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
TP53	mut	wt	wt	wt	wt		mut	mut

表 1 各種大腸がん細胞株の遺伝子状態

次に各種ヒト大腸がん細胞株における EGFR 発現量を western blot 法で調べた結果を図 3 に示す。今回、細胞内標準は GAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) を用いた。EGFR が高発現していたのは SW480 と LoVo であった。その次は HCT116 で、さらに次に発現量が高いグループとして RCM-1、HT29、LS174T、RKO が同程度の発現量となっていた。一方、CoCM-1 に関しては EGFR の発現が認められなかった。この様に EGFR の発現量は細胞株によって異なることが分かった。

EGFR expression status of cells

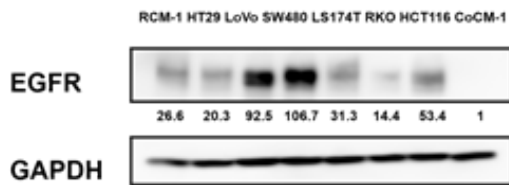


図 3 各細胞株の EGFR 発現量 (示されている数値は、CoCM-1 における EGFR 発現量を 1 とした場合の比率)

#### 4-3 各種ヒト大腸がん細胞株の放射線感受性

次に各種ヒト大腸癌細胞株における内因性の放射線感受性はコロニー形成法で調べた結果を図 4 に示す。

各種細胞株における放射線感受性は異なっていた。8 種類の細胞株で最も放射線抵抗性を示したのは RCM-1 と HT29 であった。一方、最も放射線感受性が高かったのは CoCM-1 であった。この放射線感受性と図 3 の EGFR 発現量と比較すると今回使用した細胞株の EGFR 発現量と放射線感受性に関して相関がないことが分かった。しかし、EGFR を発現している細胞 (HCT116) と EGFR を発現していない細胞 (CoCM-1) の細胞生残率を t 検定で比較したとき、2-8Gy においてそれぞれ、 $P < 0.04$ 、 $P < 0.04$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.02$  となり有意に EGFR を発現していない細胞が放射線に対して高感受性であることが分かった。

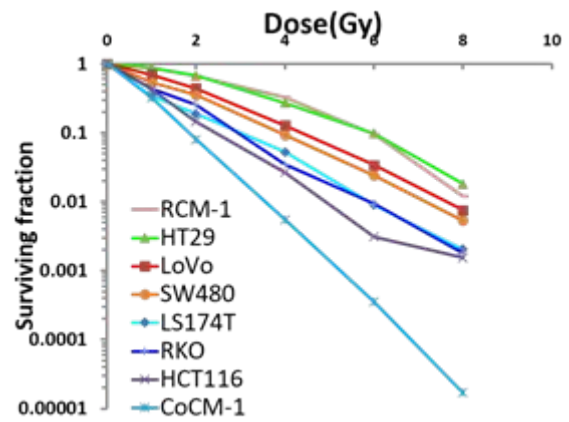


図 4 投与線量と各種ヒト大腸癌細胞株の細胞生残率の関係

#### 4-4 cetuximab による放射線感受性への影響

次に cetuximab が放射線感受性に与える影響をコロニー形成法で調べた結果を図 5 に示す。緑色の実線は X 線照射単独、青色の実線は cetuximab を X 線照射の前に 24 時間処理した pre treat、赤の実線は X 線照射後に cetuximab を 24 時間処理した post treat を表している。

図 5 中の HT29、HCT116、RCM-1 において、cetuximab を post treat した場合に細胞生残率が X 線照射単独に比べて減少しており、放射線増感効果が認められた。X 線照射単独と X 線照射と cetuximab の post treat の併用療法の 8Gy における細胞生残率を t 検定で評価すると HT29 ( $p < 0.002$ )、HCT116 ( $p < 0.02$ )、RCM-1 ( $p < 0.0005$ ) となり、増感効果は有意であることが分かった。

また、10%細胞生残率における D.M.F 値は HT29=1.2、HCT116=1.3、RCM-1=1.4 となった。Pre treat に関しては X 線照射単独と比べて差が見られなかった。上記の 3 つの細胞株以外については X 線照射単独、cetuximab の pre treat および post treat といった 3 群において細胞生残率に差が見られないことが分かった。

放射線と cetuximab 併用時の殺細胞効果 (colony 形成法)

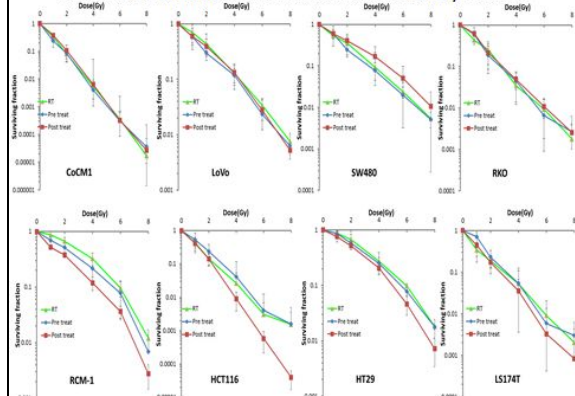


図 5 cetuximab による放射線感受性への影響

#### 4-5 cetuximab による DNA の 2 重鎖切断修復阻害

次に放射線増感効果のメカニズムを調べることにした。我々は、放射線増感効果を示したのはすべて post treat であるという共通点に着目した。これは cetuximab が放射線によって作られた DNA 損傷の修復を阻害している、つまり回復を阻害していると考えられる。そこで、DNA の 2 重鎖切断のマーカーである H2AX を使って免疫蛍光染色することで DNA の 2 重鎖切断修復阻害について調べた。結果を図 6 に示す。

放射線単独では X 線照射後時間が経過すると DNA2 重鎖切断が減少したが、放射線と cetuximab 併用したものは DNA の 2 重鎖切断が時間経過しても放射線単独に比べて多く残存した。よって、cetuximab が DNA2 重鎖切断の修復阻害していることが示唆された。

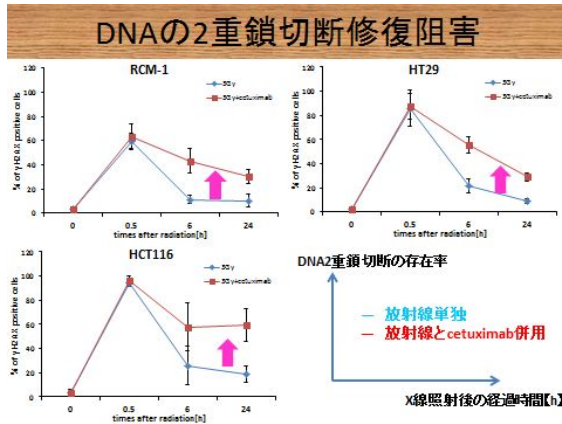


図 6 cetuximab による DNA の 2 重鎖切断修復阻害

#### 4-6 cetuximab による亜致死的損傷回復 (SLDR) への影響

結果 4-5 DNA の 2 重鎖切断修復阻害より、実際に DNA 損傷からの細胞回復が cetuximab によって影響を受けるか調べることにした。放射線障害からの細胞回復には亜致死損傷回復 (SLDR) と潜在的致死損傷回復 (PLDR) が存在する。初めに亜致死損傷回復を調べることにした。cetuximab が亜致死損傷回復にどのように影響を及ぼしているのかコロニー形成法を用いて調べた結果を図 7 に示す。グラフは縦軸に細胞生残率、横軸に 1 回目の X 線照射から 2 回目の X 線照射までのインターバル時間を取っている。また、それぞれのグラフにおいて青の実線は X 線照射単独、赤の実線は X 線照射と cetuximab の併用を表している。3 つの細胞株すべてにおいて X 線単独では 1 回目の照射と 2 回目の照射時間の間隔が伸びるに従って細胞生残率が上昇し、6 時間から 24 時間で最大となり、SLDR が起こっていることが示唆された。一方、X 線照射後に cetuximab の処理を行うと X 線単独照射では見られた細胞生残率の上昇が阻害され、

1 回目の照射と 2 回目の照射の間隔が 24 時間になっても細胞生残率の上昇は見られなかった。t 検定にて cetuximab の SLDR に及ぼす影響を評価すると 1 回目の X 線照射と 2 回目の X 線照射のインターバル時間が 6 時間以上になると、3 つの細胞株すべてにおいて  $p < 0.04$  以下となり、有意差をもって cetuximab により SLDR が阻害されることが分かった。

#### CetuximabによるSLDRの阻害

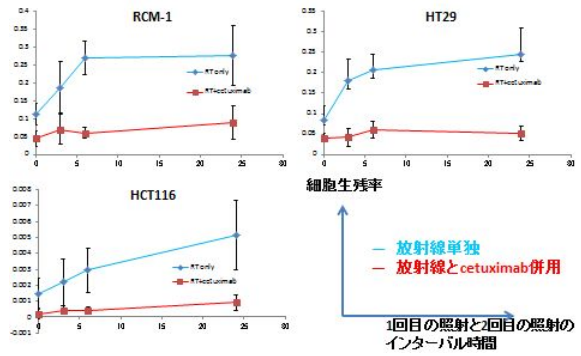


図 7 cetuximab による亜致死損傷回復の阻害

#### 4-7 cetuximab による潜在的致死損傷回復 (PLDR) の阻害

次に放射線障害からの細胞回復における潜在的致死損傷回復をコロニー形成法によって調べた。結果を図 8 に示す。放射線単独では放射線照射後にすぐに再播種したものに比べ、細胞周期が停止した状態に 24 時間置いたものは細胞生残率が上昇し PLDR が確認された。一方、放射線と cetuximab を併用すると、放射線照射後すぐに再播種したものと、細胞周期が停止した条件下に 24 時間置いてから再播種したものを比較しても cetuximab を併用したことにより細胞生残率の上昇が抑制され、PLDR が認められなかった。よって、cetuximab による PLDR 阻害が示唆された。

#### CetuximabによるPLDRの阻害

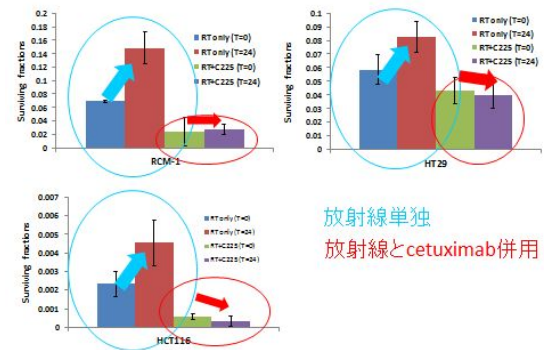


図 8 cetuximab による潜在的致死損傷回復の阻害

以上の結果より、我々は、今回使用した 8 種類のヒト大腸癌細胞株の内 3 つで cetuximab と X 線の併用で放射線増感効果があることを見出した。放射線増感効果を示した機序に関して、細胞の遺伝子変異との関連は不明であったが、増感効果の原因としては増感効果を示したのはすべて post treat であった事より、cetuximab が放射線損傷からの回復を阻害していることが示唆された。先行研究<sup>7)</sup>において EGFR は放射線照射後に核移行して転写活性因子として働くことが報告されている。そして核移行後 DNA-PK と結合して放射線による DNA の二重鎖切断修復を促進する。我々の研究において得られた知見も先行研究の結果と一致することが示唆された。従って cetuximab による X 線の殺細胞効果を増強するメカニズムとして、X 線照射後におこる EGFR の核移行を cetuximab が阻害することにより、X 線により生じた DNA の 2 重鎖切断の修復が阻害され、細胞死が増強する事が原因と考えられる。

今後は上記のメカニズムを証明すべく、更に研究を進めていきたい。

#### <引用文献>

- 1) Spano JP1, Lagorce C, Atlan D, Milano G et al., Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.*,2005; 16(1);102-8.
- 2) Ang KK1, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.*,2002; Vol.62(24);7350-6.
- 3) Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.*2010; Vol.11(1); 21-8.
- 4) S. Al-Nasiry, N. Geusens, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg, The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* ;2007;22; 1304-1309.
- 5) T. Hara, M. Omura-Minamisawa, Y. Kang, C. Cheng, T. Inoue, Flavopiridol potentiates the cytotoxic effects of radiation in radioresistant tumor cells in which p53 is mutated or Bcl-2 is overexpressed, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2008);71: 1485-1495.
- 6) Hara T, Omura-Minamisawa M, Chao C, et al. Bcl-2 inhibitors potentiate the cytotoxic effects of radiation in Bcl-2 overexpressing radioresistant tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:517-528.
- 7) David J. Chen and Chaitanya S. Nirodi, The Epidermal Growth Factor Receptor: A Role in Repair of Radiation-Induced DNA Damage. *Clin Cancer Res* 2007;13(22) :6555-6560.

#### 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)

Hara T, Iwadate M, Tachibana K, Waguri S, Takenoshita S, Hamada N. Metastasis of breast cancer cells to the bone, lung, and lymph nodes promotes resistance to ionizing radiation. *Strahlenther Onkol.* 2017 Oct;193(10):848-855.

doi: 10.1007/s00066-017-1165-2.

査読有

[学会発表](計 10 件)

青木武生、小森涼、金城裕斗、原孝光、大野由美子、高橋昭久、対馬義人：腫瘍細胞における EGF 受容体内在化機構の遺伝子発現による検証、日本放射線腫瘍学会 第 55 回生物部会学術大会 2017 年 6 月

青木武生、原孝光、大野由美子、高橋昭久、対馬義人：腫瘍細胞における EGF 受容体内在化機構の解明、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017 年 10 月

小森涼、金城裕斗、青木武生、原孝光、瀬川篤記、大野由美子、高橋昭久、対馬義人：マウスの臓器に関する放射線の効果とゲニスタインの効果について、第 105 回日本解剖学会関東支部学術集会、2017 年 11 月

金城裕斗、小森涼、原孝光、大野由美子、青木武生、高橋昭久、対馬義人：腫瘍細胞における放射線が惹起する EGF 受容体内在化機構および DSB と核異形成との関連性の検討、日本放射線技術学会第 64 回関東支部研究発表大会、2017 年 12 月

篠崎友、原孝光、青木武生、舟山知夫、佐藤浩央、田巻倫明、鈴木義行、岡崎篤、中野隆史：大腸がん細胞株における cetuximab の放射線増感効果、日本放射線腫瘍学会 第 55 回生物部会学術大会 2017 年 6 月

Hara T, Aoki T, Sato H, Funayama T, Tamaki T, Suzuki Y, Okazaki A, Nakano T: Enhancement of radiation effect by cetuximab on colon cancer cell line. 第 76 回日本癌学会学術集会、2017 年 9 月

原孝光、青木武生、佐藤浩央、舟山知夫、田巻倫明、鈴木義行、岡崎篤、中野隆史：大腸がん細胞株における cetuximab の放射線殺細胞効果の増強、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017 年 10 月

Hara T, Aoki T, Sato H, Funayama T,

Tamaki T, Suzuki Y, Okazaki A, Nakano T: Enhancement of radiation effect by cetuximab on colon cancer cell line. 17<sup>th</sup> Asia Oceania Congress of Medical Physics. 2017年11月

原孝光、青木武生、佐藤浩央、舟山知夫、田巻倫明、鈴木義行、岡崎篤、中野隆史：大腸がん細胞株における cetuximab の放射線殺細胞効果の増強、日本放射線腫瘍学会第30回学術大会、2017年11月

Hara T, Aoki T, Sato H, Funayama T, Suzuki Y, Okazaki A, Nakano T : Enhancement of radiation effect by cetuximab on colon cancer cell line. Word Congress on Medical Physics & Biomedical Engineering. 2018年6月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原孝光 (Hara Takamitsu)  
群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・教授  
研究者番号：70464542

### (2) 研究分担者

伊藤浩 (Ito Hiroshi)  
福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授  
研究者番号：20360357

隈元謙介 (Kumamoto Kensuke)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60457778

中神佳宏 (Nakagami Yoshihiro)  
国立研究開発法人国立がん研究センター  
・東病院・医長  
研究者番号：80347341