

機関番号：14051

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791195

研究課題名(和文) EGFR阻害剤とDNA二重鎖切断修復に関する基礎的研究

研究課題名(英文)

EGFR inhibitor and DNA double strand breaks

研究代表者

西村 英輝 (NISHIMURA HIDEKI)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：80444610

研究成果の概要(和文)：Gefitinib 存在下における MTT アッセイでは、Gefitinib の濃度依存性に細胞生存曲線が低下することが確認された。放射線照射と Gefitinib の併用による Colony forming アッセイを行ったが、Gefitinib による放射線照射との併用効果は明らかでなかった。癌種による EGFR の発現に変化が大きいことが予想され、EGFR 発現ライブラリーの作成を行った。EGFR は細胞腫により発現が大きく異なり、EGFR 阻害と DNA 二重鎖切断との関係の解明にはより複雑な実験系での検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：MTT assay revealed the cell toxicity dependent on the concentration of gefitinib. However, colony forming assay could not demonstrate the synergistic effect of gefitinib and ionizing irradiation. The expression of EGFR was quite differ between cell lines. To accurately and intensively explore the relation between EGFR and DNA breaks, highly sophisticated and complicated experimental condition is warranted.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：EGFR、抗EGFR抗体、EGFR-TKI、放射線治療

1. 研究開始当初の背景

EGFR は上皮成長因子(EGF)のチロシンキナーゼ型受容体で、細胞膜を貫通して存在する膜タンパクである。細胞膜上にあるこの受容体にEGFが結合すると受容体は活性化し、各経路のシグナル伝達を介して細胞を分化、増殖させる。EGFR のシグナル伝達経路として、Ras/Raf/MAPK 経路、PI3K/Akt 経路、STAT 経路等のいくつかの経路が示されている。これらのシグナル伝達の結果、癌細胞にはアポトーシスの抑制や、分化・増殖・浸潤が促進さ

れ化学療法や放射線治療に対する抵抗性が獲得されることが考えられる。多くの悪性腫瘍でEGFR 過剰発現や構造異常が見られ、これらはリガンドの結合がなくても活性化しており、癌の分化・増殖・浸潤や治療抵抗性に関与していることが示されている。

抗EGFR抗体やEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)は癌細胞に強発現するEGFRを阻害し、ガン細胞の分化・増殖・浸潤を抑えることにより抗腫瘍効果をもたらすと考え

られている。臨床試験においても、EGFR が強発現する癌腫においてこれら抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI による治療の有用性が報告されている。

抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI は単独で使用方法の抗腫瘍効果は限定されているものの、頭頸部癌等において放射線治療との併用で放射線治療単独と比較してより高い抗腫瘍効果が得られることが示されている。これは、単に腫瘍に強発現した EGFR を阻害することにより腫瘍の分化・増殖・浸潤を抑えるのみならず、DNA 損傷修復の阻害等の機序により放射線治療との相乗効果が得られている可能性が考えられる。

一方、放射線治療は癌細胞の DNA に修復不能な二重鎖切断を引き起こすことにより抗腫瘍効果をもたらすと考えられている。放射線によって引き起こされた DNA 二重鎖切断は全てが致死的となるわけではなく、細胞が持つ DNA 二重鎖切断修復機能により多くの二重鎖切断は修復されるものと考えられる。DNA 二重鎖切断の修復には、主に二つの経路が存在すると考えられている。一つは非同源的末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)と呼ばれ、切断された DNA 末端同士を結合する方法である。もう一つは、相同組換え(homologous recombination: HR)と呼ばれるもので、切断された DNA をもう一対の姉妹染色体の正常な DNA を鋳型にしてコピーし、組換えによって元に戻す方法である。これらの DNA 二重鎖切断修復機構により放射線照射により引き起こされた DNA 二重鎖切断の修復がおこり、放射線治療に対する抵抗性が獲得されるものと考えられている。

DNA 二重鎖切断には複数のタンパクが複雑に関与しているが、これまでの in vitro の研究において抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI は NHEJ の中心的役割を果たす DNA-PK の活性化を抑制し、DNA 二重鎖切断修復能を低下させることが報告されている。この DNA 二重鎖切断修復能の低下は EGFR の活性化から引き続く PI3K/Akt 経路を抑制することにより DNA-PK の活性を抑制することによるものと考えられているが、その詳細に関しては十分に解明されておらず、また DNA 二重鎖切断修復のもう一方の重要な経路である相同組換えとの関係に関しても十分な研究はなされていない

2. 研究の目的

本研究では、抗 EGFR 抗体・EGFR-TKI が DNA 二重鎖切断修復に対してどのように関与するかを明らかとすることを目的とする。抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI はがん治療における重要な位置を占めており、構造の異なる無数の

薬剤が利用もしくは臨床試験にて研究されている。いくつかの基礎的研究において抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI が DNA 損傷修復を阻害することが示されているが、放射線との併用における増感作用の機序は未だ十分には理解されていない。特に放射線照射による DNA 二重鎖切断修復との関連に関してはその分子機序は不明の部分が多い。また、これらの多くの抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI は EGFR に対する作用機序が微妙に異なり、シグナル伝達の阻害のプロフィールにも差違が存在することが示唆される。これらの薬剤を適正に組み合わせることで、より効率的に EGFR および下流のシグナル伝達を阻害し、放射線治療との相乗効果を期待できる。抗 EGFR 抗体や EGFR-TKI と DNA 二重鎖切断修復との関係が明らかになることにより、抗 EGFR 抗体・EGFR-TKI 単独では十分な効果が得にくい癌腫や放射線治療単独では十分な効果が得られない癌腫においても、これらの組み合わせにより効果的な放射線治療のストラテジーを確立することが可能になるものと考えられ、より多くの癌腫で効率的な治療法の確立に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

EGFR-TKI として Gefitinib を使用し、Gefitinib 反応下による MTT アッセイを行った。使用した細胞は結腸癌由来 HCT116 において p53 変異を有する HCT-/-、p53 ワイルドタイプの HCT+/-、子宮癌由来の HeLa 細胞を利用した。Gefitinib の濃度を 0, 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100uM とした。実験条件は下記のとおり

Day1 細胞を播種

Day2 上記濃度の Gefitinib およびコントロールとなる DMSO を同濃度で作成し、培地に添加

Day3-4 37°C で Incubate

Day5 3mg/ml MTT を添加し 2 時間 Incubate
Micro plate reader (Bio Rad Model680)
540nm にて吸光度測定

放射線と Gefitinib の併用効果の観察のために Colony forming assay を行った。使用した細胞は上記 MTT アッセイと同様に HCT+/- と HeLa 細胞。実験条件は下記のとおり

Day0 6cm ディッシュに細胞を播種し、コンフルエントの状態まで培養

Day1 0, 2.5, 5, 10uM に調整した試薬 (Gefitinib) を培地に添加し 24 時間培養

Day2 0~8Gy の放射線照射し再播種

Day3 培地交換

Day15 固定・染色・細胞数カウント

Histone H2X フォーカスに対する免疫蛍光染色を用いて放射線照射後の DNA 二重鎖切断の観察を行った。使用した細胞は HeLa および HCT116^{-/-}。

チャンバースライドガラス上に細胞を播種し、24 時間培養後に Gefitinib 10 μ M を添加。さらに 24 時間の培養後に放射線を 8Gy 照射し 1 次抗体を Histone H2X、2 次抗体 FITC を用いて蛍光顕微鏡下で観察を行った。

EGFR 発現ライブラリ作成を行った。使用した細胞は下記の通り

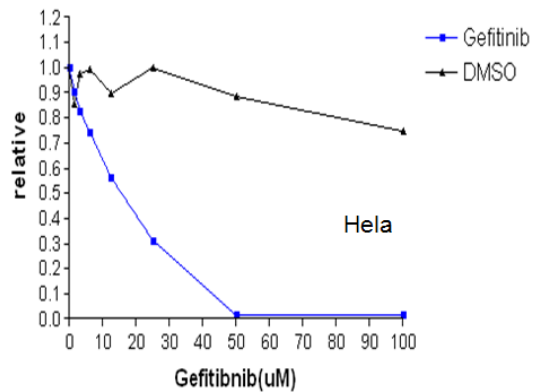
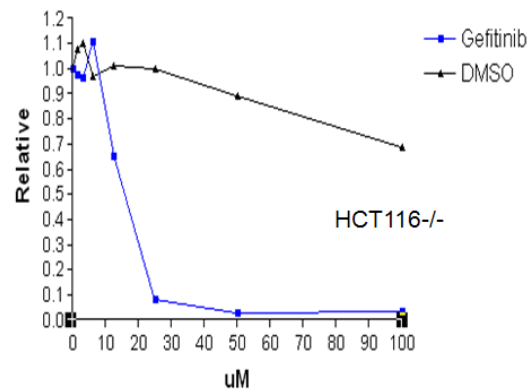
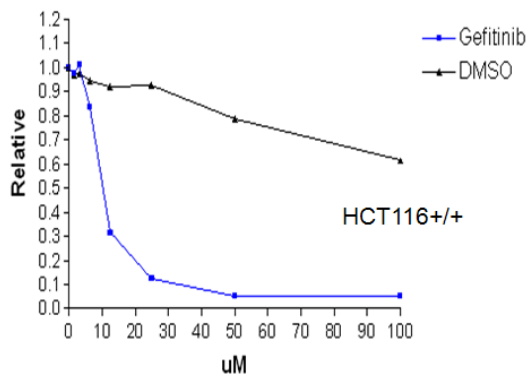
- A431：ヒト上皮癌由来
- BxPC3：ヒト膵臓癌由来
- MIAPaca2：ヒト膵臓癌由来
- Panc1：ヒト膵臓癌由来
- HeLa：ヒト子宮頸癌由来
- MCF7：ヒト乳癌由来

免疫染色によって EGFR の発現パターンを確認した。免疫染色の手技は下記のとおり

- ・細胞株を 12 ウェルに播き、80%コンフルエントになるまで 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂環境下で培養した
- ・固定：4%PFA リン酸緩衝液
- ・ペルオキシダーゼブロック：
- ・1 次抗体 rabbit anti-EGFR
- ・2 次抗体：DAKO anti-rabbit HRP K4003

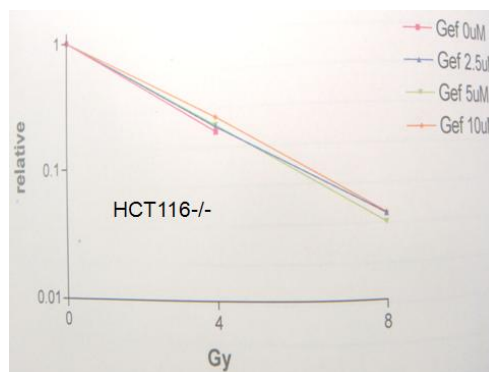
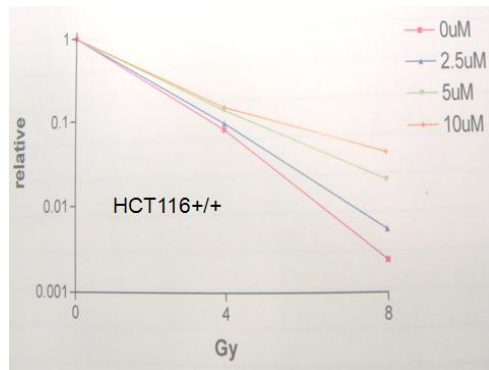
4. 研究成果

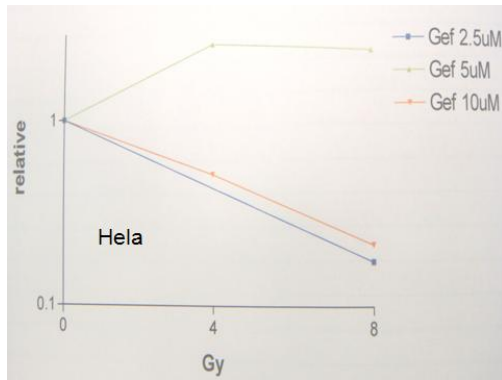
MTT アッセイ



HCT116^{-/-}、HCT116^{+/+}、HeLa いずれの細胞株においても Gefitinib の濃度依存性に細胞の viability の低下を認めた。

コロニーアッセイ

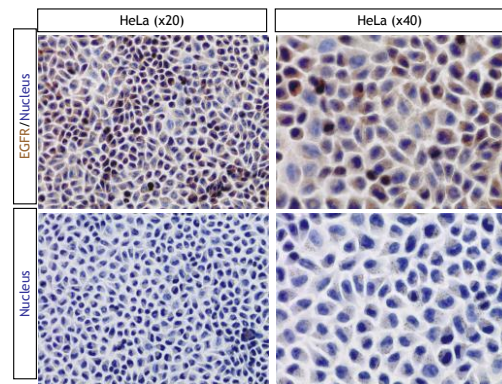
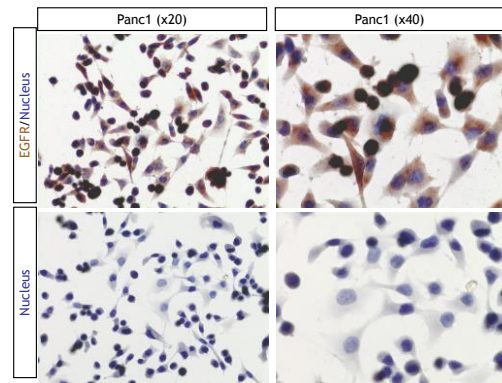
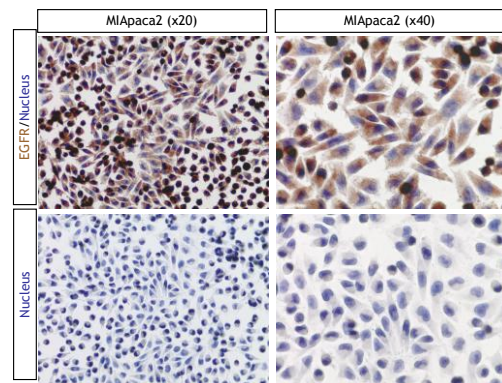
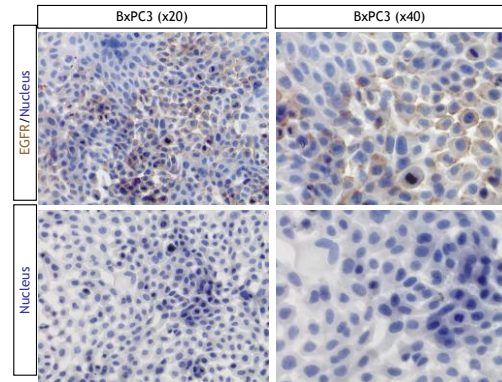
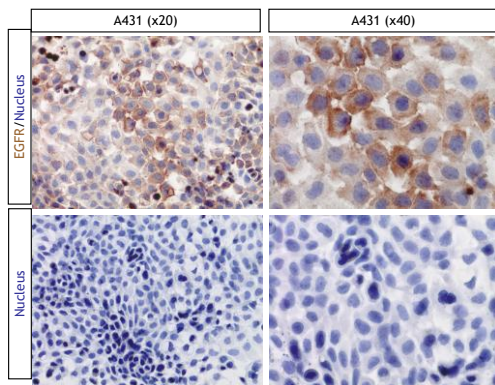


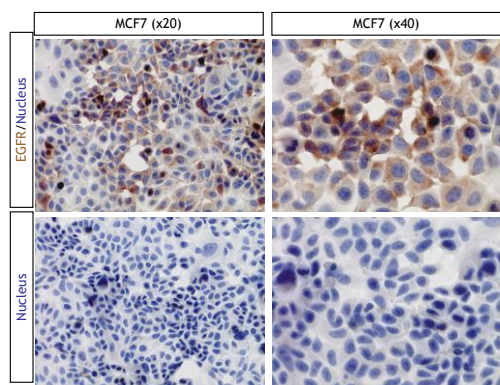


HCT116+/+, HCT116-/-, HeLa いずれの細胞株においても Colony forming アッセイ上は放射線照射と Gefitinib との明らかな相乗効果を認めることが出来なかった。原因に関しては現在検討をすすめているが、細胞腫による EGFR 発現の相違や、細胞の播種の状態、照射と薬剤添加のタイミング等が関係しているものと想定さる。

Histone H2X のフォーカス形成の観察を用いた DNA 二重鎖切断と修復に関しては Gefitinib の存在の有無による DNA 二重鎖切断の発生および修復能に明らかな違いを観察できなかった。コロニーアッセイと同様に細胞腫による EGFR 発現の相違や、照射と薬剤添加のタイミング等が関係しているものと想定された。

EGFR 発現ライブラリ





| 細胞株 | EGFRの発現 | 発現細胞の割合 | 発現強度 | 接着度 |
|----------|---------|---------|-------|-------|
| A431 | yes | +++++ | ++++ | +++++ |
| BxPC3 | yes | ++ | + | +++++ |
| MIAPaca2 | yes | +++++ | +++++ | ++ |
| Panc1 | yes | +++++ | +++++ | + |
| HeLa | yes | ++++ | +++++ | +++++ |
| MCF7 | yes | +++ | ++ | +++++ |

細胞腫により EGFR の発現量は大きく異なることが示された。EGFR の発現量と DNA 二重鎖切断および修復との関係は細胞腫により大きく異なることが示唆され、EGFR 阻害と DNA 二重鎖切断との関係の解明にはより複雑な実験系での検討が必要と考えられた。

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 4 件)

- ① 西村英輝, 佐々木良平, 吉田賢史, 宮脇大輔, 大月直樹, 齊藤幹, 清田尚臣, 副島俊典, 杉村和朗, 丹生健一 局所進行下咽頭癌に対する術後放射線療法の遡及的検討. 頭頸部癌. 2011;37(1):62-66 査読有
- ② Amalia H, Sasaki R, Suzuki Y, Demizu Y, Bito T, Nishimura H, Okamoto Y, Yoshida K, Miyawaki D, Kawabe T, Mizushima Y, Sugimura K: Vitamin K2-derived compounds induce growth inhibition in radioresistant cancer cells. Kobe J Med Sci 2010 56:E38-49. 査読有
- ③ Yoshida K, Sasaki R, Nishimura H,

Okamoto Y, Suzuki Y, Kawabe T, Saito M, Otsuki N, Hayashi Y, Soejima T, Nibu K, Sugimura K Nuclear factor-kappaB expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer. Head Neck. 2010 May;32(5):646-655. 査読有

- ④ Shimizu M, Sasaki R, Miyawaki D, Nishimura H, Demizu Y, Akagi T, Suga D, Sakamoto H, Murakami M, Sugimura K, Hishikawa Y. Physiologic reactions after proton beam therapy in patients with prostate cancer: significance of urinary autoactivation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009;75(2):580-586. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 吉田賢史, 西村英輝, 宮脇大輔, 村岡修, 橋本直樹, 佐々木良平, 長谷川信吾, 清田尚臣, 丹生健一 局所進行外自動扁平上皮癌に対する 3 剤 (TPF) 併用化学放射線療法の経験. 日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会 2010 年 11 月 東京
- ② 宮脇大輔, 上原和之, 西村英輝, 吉田賢史, 原田文, 橋本直樹, 村岡修, 中山雅央, 篠山隆, 佐々木良平 当院で放射線治療を施行した悪性神経膠腫の再発形式に関する検討 日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会 2010 年 11 月 東京
- ③ 佐々木良平, 椋棒英世, 辻村利明, 具英成, 鈴木陽子, 吉田賢史, 宮脇大輔, 西村英輝 ゲムシタピン・放射線併用療法におけるオートファジーの役割に関する基礎的研究 日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会 2010 年 11 月 東京
- ④ D. Miyawaki, Y. Demizu, K. Terashima, M. Mima, O. Fujii, Y. Niwa, K. Yoshida, H. Nishimura, R. Sasaki, M. Murakami Particle-Beam Radiation Therapy for Skull Base Chordomas: A Retrospective Study 第 52 回米国放射線腫瘍学会 (ASTRO) 2010 年 10 月 サンディエゴ
- ⑤ K. Yoshida, H. Nishimura, D. Miyawaki, T. Kawabe, Y. Okamoto, K. Nakabayashi, S. Yoshida, R. Sasaki, K. Sugimura Radiotherapy for Elderly Patients with Cervical Cancer 第 52 回米国放射線腫瘍学会 (ASTRO) 2010 年 10 月 サンディエゴ
- ⑥ 吉田賢史, 西村英輝, 宮脇大輔, 河辺哲也, 佐々木良平, 中林幸士, 森田宏紀, 吉田茂樹, 山田秀人, 岡本欣晃 I/II 期子宮頸癌に対する根治的放射線治療の遡及的検討 第 48 回日本癌治療学会学術大会 2010 年 10 月 京都

- ⑦ 河辺哲也, 石原武明, 宮脇大輔, 吉田賢史, 西村英輝, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一, 佐々木良平 当院における中咽頭癌の放射線治療成績 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑧ 石原武明, 西村英輝, 吉田賢史, 河辺哲也, 宮脇大輔, 上園玄, 佐々木良平, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一 当院における頭頸部腺様嚢胞腺癌に対する術後放射線治療の遡及的検討 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑨ 吉田賢史, 西村英輝, 宮脇大輔, 河辺哲也, 佐々木良平, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一, 清田尚臣, 岡本欣晃 原発不明癌頸部リンパ節転移に対する治療経験 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑩ 柴田智久, 米澤宏一郎, 森本浩一, 土井清司, 山下大介, 長谷川信吾, 井上博之, 大月直樹, 吉田賢史, 西村英輝, 佐々木良平, 丹生健一 T 当科における耳下腺癌の治療成績 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑪ 西村英輝, 吉田賢史, 河辺哲也, 宮脇大輔, 丹生健一, 齋藤幹, 大月直樹, 清田尚臣, 副島俊典, 佐々木良平 下咽頭癌に対する術後放射線治療の遡及的検討 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑫ 宮脇大輔, 村上昌雄, 出水祐介, 丹羽康江, 寺嶋千貴, 美馬正幸, 西村英輝, 吉田賢史, 河邊哲也, 森本浩一, 丹生健一, 菱川良夫, 佐々木良平 嗅神経芽細胞腫に対する粒子線治療成績 第 34 回頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京
- ⑬ 西村英輝, 佐々木良平, 吉田賢史, 河辺哲也, 宮脇大輔, 上園玄, 石原武明, 丹生健一, 副島俊典, 杉村和朗 局所進行下咽頭癌に対する術後照射の遡及的検討 第 69 回日本医学放射線学会 2010 年 4 月 横浜
- ⑭ 河辺哲也, 佐々木良平, 石原武明, 上園玄, 宮脇大輔, 吉田賢史, 西村英輝, 西原賢在, 岡本欣晃, 甲村英二, 杉村和朗 頭蓋内 germ cell tumor に対する放射線治療成績 第 69 回日本医学放射線学会 2010 年 4 月 横浜
- ⑮ 石原武明, 吉田賢史, 佐々木良平, 西村英輝, 河辺哲也, 宮脇大輔, 上園玄, 篠山隆, 甲村英二, 杉村和朗 当院における中枢神経原発悪性リンパ腫に対する放射線治療の遡及的検討 第 69 回日本医学放射線学会 2010 年 4 月 横浜
- ⑯ 吉田賢史, 中林美日, 佐々木良平, 西村英輝, 河辺哲也, 岡本欣晃, 宮脇大輔, 上園玄, 石原武明, 長谷川信吾, 大月直樹, 丹生健一, 杉村和朗 聴器扁平上皮

癌に対する治療経験 第 47 回日本癌治療学会学術大会 2009 年 10 月 横浜

- ⑰ 神垣隆, 高瀬至郎, 中村哲, 角泰雄, 山下公大, 西村英輝, 佐々木良平, 今西達也, 鈴木知志, 黒田大介, 横崎宏, 杉村和朗, 具英成 リンパ節転移制御能からみた T3/T4 下部直腸癌に対する術前化学放射線療法 of 検討 第 47 回日本癌治療学会学術大会 2009 年 10 月 横浜
- ⑱ 佐々木良平, 西村英輝, 吉田賢史, 河邊哲也, 宮脇大輔, 杉村和朗, 清田尚臣, 奥野達哉, 南川勉, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一 頭頸部癌に対する集学的治療の取り組み中での放射線生物学の役割 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会 2009 年 7 月 富山

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/rad/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 英輝 (NISHIMURA HIDEKI)
神戸大学・医学部附属病院・特命講師
研究者番号：80444610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし