

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791215

研究課題名(和文)

胃癌における分子標的治療薬と放射線併用療法

研究課題名(英文)

Combination of target therapy and radiation for gastric cancer

研究代表者

白石 悠 (SHIRAIISHI YU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00445339

研究成果の概要(和文)

2種の胃癌細胞、NCI-N87とMKN-45について、HER2発現の確認を行い、real time PCR法により、HER2/newの発現量を判定量的に比較検討した。その結果比較的強く発現している細胞2種を用いてその後の実験を行った。トラスツズマブを種々の濃度で各細胞に添加し、MTT法によりトラスツズマブ単独での細胞増殖効果について検討し、トラスツズマブにより細胞増殖はわずかながら抑制される傾向にあった。一方、放射線照射単独による生存率がdose dependに抑制されたことを確認し、トラスツズマブ存在下、非存在下群の各々を放射線照射、非照射群に更に分け、放射線照射との相乗効果について解析した。HER2が強く発現している細胞では、放射線照射とトラスツズマブによる放射線感受性が増強される傾向がみられた。

研究成果の概要(英文):

In this study, we investigated the effect of Trastuzumab, which is a humanized monoclonal antibody that binds to the HER2 protein and mediates growth inhibitory properties on tumors that express HER2, on HER2-positive gastric cancer cells by exposing with X-irradiation. First, we chose 3 different level of HER2 expression on effect of Trastuzumab by real time PCR. Next, we investigated the effect of Trastuzumab on gastric cancer cells by MTT method. The result showed that the effect of Trastuzumab to HER2-expressing gastric cancer cells was tend to inhibit the growth of the cells. On the other hand, we checked the gastric cancer cells survival rate were decreased with dose-dependent of the X-irradiation. Then, we tested whether there is any correlation between the Trastuzumab and X-irradiation on HER2-expressing gastric cancer cells. Trastuzumab has been shown to be effective both as single agents and in combination with X-irradiation for the gastric cancer cells with high level of HER2 expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：分子標的治療薬、放射線治療、胃癌

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省発表によると、胃癌による年間死亡数は悪性新生物の死因では肺がんに次いで多い疾患である。進行性胃癌の標準治療では、外科的手術、化学療法、放射線療法がおこなわれている。また抗癌剤の開発により、進行癌の予後も改善してきたが、多くの抗癌剤は細胞傷害による腫瘍縮小、消失を期待したものであり、正常細胞も傷害を受け、副作用が問題となっている。近年、細胞増殖に関わる分子を阻害する分子標的治療薬が臨床応用されている。主に特異的に発現する分子を標的とする治療薬の開発により、より少ない副作用で腫瘍縮小効果が期待できる。そのひとつである抗 HER2 モノクローナル抗体製剤トラスツズマブは、ヒト癌遺伝子 HER2/neu(c-erbB-2) の遺伝子産物である HER2 タンパクに特異的に結合し、腫瘍縮小効果を発揮する。乳癌の 15%~25%前後に HER2 が発現しており、発現量の多い乳癌では増殖能が高く、予後も不良であることが知られている。HER2 発現進行乳癌に対して、トラスツズマブ単独、あるいは抗癌剤との併用にて腫瘍縮小、生存期間延長が報告されている。

一方、放射線治療は胃癌抵抗性と考えられてきたが、切除可能胃癌患者における術前化学放射線療法の有効性が示され、術後の補助治療としても期待される。近年、HER2 過剰発現している食道癌や乳癌に対して、トラスツズマブが放射線感受性を増加することが実験的に示された。更に乳癌細胞では放射線照射が HER2 発現を促進することも報告され、HER2 発現胃癌においてもトラスツズマブと放射線療法との併用効果が期待される。

2. 研究の目的

分子標的治療薬による胃癌細胞の放射線感受性に対する影響を解析する。放射線照射・分子標的治療薬投与による遺伝子発現の変化を解析し、放射線感受性に関する遺伝子を同定し、放射線抵抗性のメカニズム解明や新たな治療法の開発を最終的な目標とした。胃癌は長らく放射線抵抗性と考えられてきたが、切除可能胃癌患者における術前化学放射線療法の有効性が示され、現在では放射線治療は術後の補助療法としても期待されている。最近、分子標的治療薬の中に放射線増感作用が期待できるものがあると報告され、胃癌に対する分子標的治療薬併用放射線治療の基礎的研究を着想するに至った。未だ、胃癌の分子標的治療薬併用放射線治療に関する基礎研究の報告は見られず、本研究は、今後の臨床応用の基礎となる重要な研究となりうると考えている。

乳癌領域ではトラスツズマブはすでに一般的治療として確立されており、実験的に放射線感受性増強が示され、臨床的に放射線療法との併用効果が期待されている。胃癌領域では、術前化学放射線療法の有効性が示され、欧米では普及していることから、日本でも普及されることが予測される。が、胃癌細胞における HER2 発現と放射線感受性の関連性はまだ報告されていない。

本研究では、HER2 発現胃癌細胞に対するトラスツズマブの放射線感受性への影響を解析する。また、放射線照射による HER2 を中心とした発現遺伝子の変化、抗 HER2 抗体による発現遺伝子の変化をプロファイリングし、放射線感受性に対する影響を解析した。

3. 研究の方法

胃癌培養細胞の HER2 発現について：

トラスツズマブの放射線感受性を解析するため、数種類の HER2 発現量の異なる培養胃癌細胞を用い、FISH 法により蛍光標識した HER2/neu プローブで HER2 発現を確認した。更に real time PCR 法により、HER2/new の発現量を判定的に比較し、高発現している細胞、中等度発現している細胞を選択した。

トラスツズマブ単独の胃癌細胞増殖への影響について：

すでに HER2 が高発現していることが知られている乳癌細胞 SK-BR-3 を positive control として用いる。

HER2 発現量の異なる胃癌細胞と positive control を 96 穴に 3X10³ 個の細胞をまき、24 時間培養し、0.01, 0.1, 1, 10, 100mg/ml の濃度でトラスツズマブを添加し、72 時間培養する。MTT 法によりトラスツズマブ単独での細胞増殖効果について解析した。

放射線照射による HER2 発現量の変化について：

放射線照射した細胞、照射していない細胞より RNA を採取し、RT-PCR 法により HER2 発現を検討した。

トラスツズマブと放射線照射の相乗効果について：

上記の細胞についてコロニー法により、放射線照射単独での細胞増殖への影響を解析した。トラスツズマブの存在下、非存在下で、いくつかの dose にて放射線照射し、生存曲線を作成し、放射線照射との相乗効果について解析した。

トラスツズマブによる発現遺伝子の変化について：

放射線照射による HER2 発現変化の顕著な細胞について、トラスツズマブを添加し、培養する。DNA アレイ法により、発現遺伝子の変化をプロファイリングし、その遺伝子の発現変化につき、放射線感受性への影響を解析する。

4. 研究成果

初年度は、HER2 蛋白の発現量のことなる 2 種の胃癌細胞数種を用いてコロニー法を試みた。結果、当研究室にて保有していた細胞株を用いて実験を試みたが、過去の文献と同様の条件で繰り返すものの、コロニーを形成しなかった。そのため、新たに細胞株を輸入購入したところ、MKN-45 については、コロニー法にて P E = 20% 程度で、再現性を確認できた。NCI-N87、SMU-484 は、P E = 2 ~ 5% と非常に低いものの、再現性のある条件を求めることができた。

2 年度は、上記 3 種の細胞の HER2 発現を蛍光標識した HER2/neu プローブを用いて FISH 法により、HER2 発現の確認を行い、更に real time PCR 法により、HER2/new の発現量を判定的に比較検討した。結果すべての細胞において HER2 の発現は検出され、発現量は NCL-N87, SNU-484, MKN-45 の順でみられた。

乳癌細胞 SK-BR-3 を positive control として用い、HER2 発現量の異なる胃癌細胞にトラスツズマブを種々の濃度で添加し、MTT 法によりトラスツズマブ単独での細胞増殖効果について解析した結果、トラスツズマブ存在下は非存在下に比較すると、SNU-484, MKN-45 細胞では細胞増殖はわずかながら抑制される傾向にあった。

更に、3 種の胃癌細胞を用いてトラスツズ

マブ存在下、非存在下群の各々を放射線照射、非照射群に分け、放射線照射との相乗効果について解析した。HER2 が強く発現している SNU-484, MKN-45 細胞では、放射線 2Gy 照射とトラスツズマブ添加により、放射線感受性の増強がみられた。

今後、DNA アレイ法により、発現遺伝子の変化をプロファイリングし、その遺伝子の発現変化につき、放射線感受性への影響を解析をする予定である。更にヌードマウスの皮下に上記の細胞を移植し、in vivo でのトラスツズマブによる HER2 発現、および放射線照射との関連性を検討していきたいと思う。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

白石 悠 (SHIRAIISHI YU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 00445339

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし