

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791168

研究課題名（和文）

放射線照射後の腫瘍細胞の遊走能亢進作用に対するゲフィチニブの抑制効果の検討

研究課題名（英文）

Effect of gefitinib on radiation-induced migration in human lung cancer cells.

研究代表者

佐藤 友美 (SATO YUMI)

埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）

研究者番号：70511484

研究成果の概要（和文）：

EGFR変異有無によるヒト非小細胞肺癌細胞の放射線照射による細胞遊走能の変化とTKI(ゲフィチニブ)併用による、細胞遊走の抑制効果の検討した。

EGFR遺伝子の異なるヒト非小細胞肺癌由来の細胞株（A549；wild type, HCC827；mutant type）に、X線照射とゲフィチニブを併用し、wound healing assay法で放射線線量依存性、薬剤投与量依存性、両者併用による変化を検証し、HCC827ではゲフィチニブを併用した群で有意に遊走の抑制を確認した。Western blot法では遊走に関連のあるMAPK系シグナルタンパクとしてERKの発現を確認し、遊走抑制が認められたHCC827ゲフィチニブ投与群で発現低下を認めた。変化の認められたHCC827のみ遊走能の変化を時間的経過で観察したところ48時間以後では、細胞の遊走抑制だけでなく、細胞の接着低下を認めた。接着能の抑制、または細胞死の関与が考えられ、遊走因子以外の検討をした。ゲフィチニブ投与下でのHCC827の生存を確認するためWST-1法を用いた。24時間では変化を認めず、3日、7日経過で生存の低下を認めた。Western blot法ではA549, HCC827に対してcPARPを確認した。照射後2時間のHCC827はcPARPの発現増加を確認できたが、A549では明らかではなかった。TUNEL染色による細胞死の変化は24、48、72時間と時間的経過で有意な違いは認められなかった。

今回のこの結果から、ゲフィチニブはEGFR遺伝子変異のある細胞には遊走能シグナル系を抑制し、早期に遊走および接着能を低下させていた。細胞内の変化として、早期にアポトーシス反応を示すが、細胞死となり形態変化として認められるのに3日以上は要していた。今回の早期の遊走能低下は細胞死効果よりも、遊走シグナルの抑制が強く関与していると考えられた。EGFR変異のない細胞では効果が乏しく、変異があるものに限り顕著な効果が認められ、選択的効果が期待できると考える。正常細胞への影響を最小限にできると期待される。遊走抑制効果が早期に認められる点から、早期の浸潤や転移抑制、予防に有用な効果となる可能性が示唆されるが、その検証は今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to evaluate whether radiation induces migration in human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells with and without an EGFR mutation (A549; wild type, HCC827; mutant type). A further aim was to investigate the effects of radiation induced cell migration by the cells after blocking the EGFR and its downstream pathways by gefitinib *in vitro*. Cell migration of A549 cells and HCC827 cells was assessed using a wound healing assay. Cell growth and apoptosis were measured by the WST-1 assay and TUNEL assay, respectively. Cell cycle perturbation and EGFR signal transduction were analyzed by flow-cytometry and Western blotting. The migration distance of the HCC827 cells was significantly decreased by gefitinib and/or irradiation, and the death of the cells HCC827 cells was increased

with gefitinib and/or irradiation after 48hours or more in comparison to untreated the cells. There was no difference inthe behavior of A549 cells with the treatment. TheWST-1 assay showed that the HCC827 cells were sensitive to increasing concentrationsof gefitinib for 72 hours or more. A variation in the apoptotic pathway was revealed by Western blotting using specific antibodies with cleaved PARP irradiated 2hours after with or without gefitinib.The activation of the apoptosis pathway was confirmed by increased cleaved PARP in HCC827 cells treated with gefitinib. G2/M phase arrest and increased subG1 in cell cycle was seen in the combination gefitinib and irradiation treatment group of HCC827 cells. The gefitinib and/or irradiation combination treatment could inhibit the phosphorylated ratio of ERK by down-regulating the expression of ERK 1/2 proteins in HCC827 cells.No apoptosis was detected by the TUNEL method in the time course of 24h, 48h, or 72h.Consequently, gefitinib reduced the early migration adhesion ability, and early apoptosis in cells with a genetic mutation of EGFR. Gefitinibshowed a cytotoxic effect and inhibited cell migration in HCC827 cells. The tyrosine kinase receptor inhibitor, gefitinibcombined with radiotherapy may be cytotoxic to NSCLC cells with a genetic mutation of EGFR with subsequent inhibition of their cellular behavior, including proliferation, invasiveness, and metastatic activity.The tyrosine kinase receptor inhibitor-targeted combined radiotherapy regimen may provide a new treatment forthe prevention of early invasion and metastasis for advanced lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医師薬学系

科研費の分科・細目：

キーワード：遊走能・ゲフィチニブ・肺癌

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一は悪性腫瘍となっている。高齢化が進む社会においてはその傾向は顕著になるものと考えられる。癌治療は手術、放射線治療、化学療法が三本柱であるが合併症が多く、体力的にも劣る高齢者にとっては侵襲の少ない放射線治療が第一となることが少なくはない。また、近年の放射線治療においても技術的進歩による物理学的な高精度化が著しいが高精度に大線量を投与して

も治癒に至らないこともまれではなく、放射線生物学的なアプローチの必要性が再認識されている背景がある。従来、放射線による腫瘍の転移促進作用の可能性が指摘されており、実際に放射線治療後の経過において腫瘍がいびつな形態を呈し、周囲への浸潤傾向を示し、まるで放射線治療を契機に悪性度が増した印象を受ける症例に遭遇することがある。培養細胞を用いた系ではX線照射により、腫瘍細胞の遊走能が亢進する現象が報告されている。この現象の分子生物学的な機序

を解明することは放射線生物および放射線治療の新たな局面を切り開く可能性がある。実験的に強い細胞遊走活性を持つ蛋白として laminin-5 が知られており、扁平上皮癌細胞株を用いた検討では上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の増幅の程度と laminin-5- γ 2 鎖の発現に相関が報告されている。

一般に EGFR を介するシグナル伝達経路は多くの癌細胞で活性化されており、細胞増殖や浸潤、転移、腫瘍血管の新生などと相関があるといわれている。

近年、分子標的治療薬といった特定の分子機能を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する薬剤が開発され、癌の増殖、転移に対して有効性が臨床の場で実証されている。ゲフィチニブは肺癌に対する分子標的治療薬として認可され、特に EGFR 遺伝子変異例に対して高い有効性が報告されている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブが X 線照射後の腫瘍細胞の遊走能を抑制することを確認しており、その機序について分子生物学的に検討することで、X 線照射が腫瘍細胞の遊走能におよぼす影響を解明することおよびゲフィチニブを併用した場合の効果の検討を目的とする。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた実験系において、EGFR 遺伝子の異なるヒト非小細胞肺癌由来の細胞株 (A549 ; wild type, HCC827 ; mutant type) を、放射線 (X 線) 照射単独群、ゲフィチニブと X 線照射併用群を wound healing assay を用いて、遊走能の差を検証。

遊走能の違いに関与すると考えられる EGFR 下流のシグナル伝達分子を Westernblot にて確認。遊走・浸潤を誘導抑制の有無による EGFR リン酸化有無、MAPK シグナル伝達系路での蛋白発現の違いを確認した。

Apoptosis の関与の有無を Flowcytometry, TUNEL 染色を用いて X 線照射とゲフィチニブ併用有無の違いでの変化を確認した。

4. 研究成果

EGFR変異有無によるヒト非小細胞肺癌細胞の放射線照射による細胞遊走能の変化とTKI(ゲフィチニブ)併用による、細胞遊走の抑制効果の検討

EGFR遺伝子の異なるヒト非小細胞肺癌由来の

細胞株 (A549 ; wild type, HCC827 ; mutant type) に、X線照射とゲフィチニブを併用し、wound healing assay法で放射線線量依存性、薬剤投与量依存性、両者併用による変化を検証し、HCC827ではゲフィチニブ併用した群で有意に遊走が抑制されることを確認。Westernblot法により遊走と関連のあるMAPK系タンパクとしてERKの発現量を確認し、遊走抑制のあるHCC827のゲフィチニブ投与群で発現の低下を認めた。HCC827対象とし、遊走能の低下を時間的経過で観察したところ48時間以後は、細胞の遊走抑制だけでなく、細胞の接着低下を認めた。接着能の抑制、および細胞死の関与なのか、遊走因子以外について検討した。HCC827の生存程度を確認するためWST-1法を用いた。24、72時間では変化を認めず、7日経過で生存の低下を認めていた。

westernblot法のアポトーシス発現としてcPARPを確認した。照射後2時間でHCC827ではcPARPの発現増加を確認できたが、A549では明らかではなかった。

今回のこの結果から、ゲフィチニブはEGFR遺伝子変異のある細胞には遊走能シグナル系を抑制し、早期に遊走および接着能を低下させていた。細胞内の変化として、早期にアポトーシス反応を示すが、細胞死となり変化として認められるのに7日間は要していた。今回の早期の遊走能低下は細胞死効果よりも、遊走シグナルの抑制が強く関与していると考えられた。

mutationのない細胞では効果が乏しく、選択的な効果発現を期待でき、正常細胞への影響は乏しいと考えられた。遊走抑制が早期に起こる点は、早期の転移抑制に有用な効果となる可能性が示唆され、その検証は今後の課題である。

HCC827 細胞

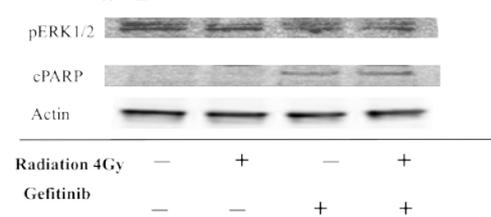


図 1

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 友美 (SATO YUMI)

埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・

その他部局等・研究員

研究者番号：70511484

以下不在

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：