

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790898

研究課題名（和文） 放射線照射による KIT 自己リン酸化誘導とその障害が放射線感受性へ及ぼす影響

研究課題名（英文） Influence of radiation-induced KIT autophosphorylation on radiosensitivity of human cancer cell lines.

研究代表者

茂木 厚 (MOTEGI ATUSHI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10433997

研究成果の概要：ヒト癌細胞株(TE-1、A549、A431)を用いて、癌細胞の放射線応答における KIT の活性化と障害の役割について検討を行っている。A549 に KIT 蛋白の発現が認められ、現在種々の抗体を用いて照射による KIT の活性化の有無の検討を続けている。KIT 阻害薬である STI571 を培養液に付加しコロニー形成法で、癌細胞の成長程度を比較すると、阻害薬添加群で細胞増殖の抑制が認められた。照射と阻害薬の併用による増殖抑制における相乗効果についても検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

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：STI571、c-KIT、A549、放射線感受性、チロシンキナーゼ、自己リン酸化

1. 研究開始当初の背景

放射線療法は、癌の局所制御に有効な治療法の一つである。しかし、放射線治療は癌の周囲の正常組織にも影響を与えるため、正常細胞と癌細胞の放射線感受性の相違が重要である。増殖能の早い癌細胞の方が正常細胞に比較して放射線に対する感受性が高いことが、放射線治療による治療可能比向上の基礎

となっている。放射線感受性に関する研究が盛んに行われ、癌細胞の放射線感受性決定に腫瘍細胞増殖能、p53 遺伝子変異、周囲組織の酸素環境などの因子が関与していることが明らかとなっている。これらの因子を修飾することにより放射線感受性を高める研究が数多く行われているが、その一方で放射線抵抗性の機序に関する研究も進んでいる。癌、特に頭頸部癌に対して放射線治療を行

うと、放射線治療の後半で癌細胞の加速再増殖を生じ放射線感受性が低下することが知られている。この機序として頭頸部扁平上皮癌細胞株における照射後の EGFR(epidermal growth factor receptor)の自己リン酸化という現象が考えられている (Schmidt-Ullrich RK, et al. Radiat Res, 1996)。照射により EGF (上皮増殖因子) の受容体である EGFR が、リガンドの結合なしにリン酸化等を生じ活性型となり、下流の種々の蛋白をリン酸化しシグナル伝達が行われることが明らかとなった。これは、従来の癌細胞の治療抵抗性と関連する因子として考えられていたものに加えて、放射線照射そのものが増殖因子の刺激を引き起こし放射線抵抗性を生じるということである。さらには、EGFR の高発現と放射線治療可能性の間に負の相関があるとの報告 (Akimoto T, et al. Clin Cancer Res, 1996) があり、EGFR の発現やリン酸化・活性化と放射線感受性との相関に関する研究は多数行われている。これらの研究とともに、従来の抗癌剤とは異なる発想で、癌細胞の増殖のみを特異的に抑制しつつ正常細胞には大きなダメージを与えないことを期待して、増殖因子受容体に対する特異的な抗体や阻害剤などが数多く開発されてきている。その中でも、非小細胞肺癌症例に対して臨床的に治療が開始されている ZD1839 [Iressa®] は EGFR の特異的な阻害剤であり、EGFR からのシグナル伝達を抑制することで癌細胞の増殖抑制を誘導する分子標的薬剤である。ZD1839 は合併症としての間質性肺炎などが注目されているものの、進行肺癌、特に肺腺癌に対して単独または抗癌剤との併用で治療効果が認められており、その効果と EGFR の変異の有無に相関があることが報告されている (Lynch TJ, et al. 2004, N Engl J Med.)。EGFR の自己リン酸化が放射線抵抗性に関与するということから、C225 などの EGFR を標的とした分子標的治療と、放射線療法の併用に関する研究も既に開始されており、頭頸部癌を対象とした臨床試験では C225 を併用することで局所制御率が有意

に向上することが報告されている。これは照射で誘導される癌細胞の放射線抵抗性機序を抑えることで、放射線感受性を向上させようとの試みである。分子標的薬剤は従来の化学療法と比較して副作用が少なく予測可能であるという利点があり、放射線治療の効果を増強する併用薬剤として大きな可能性を有している。EGFR に対する ZD1839 や C225 以外の分子標的治療薬には HER2 高発現の乳癌で臨床応用されている Herceptin などがあるが、まだまだ臨床応用されている薬剤は限られている。今回、我々は種々の腫瘍における増殖因子として大きな関心を集めているにも関わらず、放射線照射との関連性についてはほとんど検討されていない KIT に注目した。KIT は肥満細胞の分化や消化管へ分布する神経細胞の分化に関連しており、肥満細胞腫や消化管間質系腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor: GIST) での高発現が認められている。最近の研究の結果、種々の上皮系腫瘍 (肺小細胞癌、胸腺癌、腺様嚢胞癌) や胚細胞腫瘍 (精上皮腫)、肉腫 (ユーイング肉腫/pnet) にも発現していることが明らかとなった。KIT を高発現する腫瘍、例えば GIST や精上皮腫では KIT の機能獲得性突然変異を生じていることが知られており、リガンドである SCF (stem cell factor) の作用なしに KIT が自己リン酸化し活性化している。種々の腫瘍における KIT 発現に関する研究が近年飛躍的に進んだ理由としては、分子標的薬剤として既に劇的な効果を挙げている STI571 (Gleevec) の実用化に拠るところが大きい。STI571 はチロシンキナーゼリセプターである Bcr-Abl や KIT をターゲットとしており、慢性骨髄性白血病や消化管間質系腫瘍に対して効果を発揮している。また、KIT を高発現する腫瘍の中には、KIT の機能獲得性突然変異を有するものも認められ、STI571 の奏効性も特定の変異の種類に依存することも明らかとなっている (Heinrich M, et al. 2003, J Clin Oncol)。これは上記の EGFR における変異と ZD1839 の奏効性の関係と類似している。STI571 による放射線感受性増感に関する研究では、甲状腺未分化癌細胞株 (Podtcheko A, et al. 2006, Radiat Res) や膠芽腫細胞株 (Holdhoff M, et al. 2005, Blood Cells Mol Dis) などにおける細胞増殖能抑制の報告が既に見られる。しかし、放射線照射による分

子生物学的な KIT の活性化を検討した研究は未だ報告がないことに我々は着目した。

2. 研究の目的

KIT の発現と放射線感受性との相関や放射線照射により KIT の自己リン酸化が誘導されるかを検討し、癌細胞の放射線抵抗性の獲得における KIT の役割を明らかにするだけでなく最終的には、STI571 を用いた分子標的薬剤併用放射線療法の実用化へ向けた基礎研究となり得ると考えた。

種々のヒト腫瘍培養細胞株を対象として、放射線照射による *in vitro* における KIT 自己リン酸化の有無の検索を中心に据えて研究を継続している。KIT 発現量と放射線感受性の相関も検討し、KIT の機能獲得性突然変異を有する細胞株における放射線感受性の変化についても調べることを目標とした。STI571 と放射線との併用による放射線感受性の変化について検討して、放射線感受性修飾における KIT 活性化の役割やその機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

- 1) ヒト癌細胞株の KIT 発現量を western blotting、蛍光抗体法など複数の方法で定量化し、その発現量の比較検討を行った。
- 2) 照射前における KIT のリン酸化の状態を KIT に対する一次抗体ならびに抗リン酸化チロシン抗体を用いた western blotting 法で検索した。
- 3) 検討に用いた培養細胞の放射線感受性を検討した。放射線感受性の検討には、コロニー形成法を用いて行った。
- 4) 種々の強度に線量を変化させながら培養細胞への照射を行い、照射で誘導される KIT の自己リン酸化の有無を照射前の状

態と比較した。

- 5) 照射による自己リン酸化と下流のシグナル伝達の活性化を調べるため、AKT、MAPK、STAT など KIT の下流に位置するキナーゼの活性化の有無を Western blotting で検討した。
- 6) KIT 阻害薬である STI571 を付加した培養液を用いて腫瘍細胞株の培養を行い、細胞増殖抑制の有無についてコロニーアッセイで検討した。また、阻害薬を作用させた状態で照射を行い、細胞増殖抑制に相乗効果があるかを検討した。

4. 研究成果

ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト食道癌細胞株 TE-1、ヒト扁平上皮癌細胞株 A431 を対象に研究を行った。これらのうち、A549 のみ Western blotting 法で KIT の発現が認められた。KIT 発現に関して、一次抗体をウサギ由来のモノクローナル抗体に変更し再検討を行った結果、依然 KIT の発現は A549 に認められたものの、その他の細胞株においては、目立った発現はなかった。

KIT のリン酸化に関しては、抗リン酸化 KIT 抗体を用いて検索を行ったが、照射前後での KIT のリン酸化の状態に有意な変化は認められなかった。特異性の高い一次抗体を用いた免疫沈降法での発現の検討が必要と考えられた。

また、KIT 阻害薬である STI571 を培養液に添加し、薬剤単独および照射併用時のコロニー形成法を用いた生残率測定を行った。結果は、コロニー数そのもの変化は有意なものではなかったが、形成されたコロニー径が STI571 添加群でやや小さい傾向が認められた。また、通常の培養液と KIT のリガンドである SCF を付加した場合の細胞増殖能を比較検討すると、SCF を付加するとより旺盛な細胞増殖が見られた。

現在は、SCF 存在下での放射線感受性の相違やその機序について KIT のリン酸化を含めた活性化の変化を検討している。KIT 発現の解析としては種々の条件において蛍光抗体法を用いての検討を追加し、また KIT 下流のシグナル伝達を調べるため、下流に位置するキナーゼの活性を各分子のリン酸化の状態

から解析してゆく。

また、コロニー形成法においては、薬剤との反応時間や培養液の条件を種々変化させ、引き続き検討を行ってゆく。コロニーの評価においても、コロニー数のみの評価ではなく、コロニーの大きさを含め定量的な評価法の導入を検討し、放射線感受性との関連性をさらに明らかにしてゆく。また、蛍光抗体法を用いたKIT発現部位の同定や、シグナル伝達を調べるため下流に位置するキナーゼの活性を調べ、KIT発現とその阻害が放射線感受性に及ぼす影響につき検討を重ねてゆく。

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)

6．研究組織

(1)研究代表者

茂木 厚 (ATSUSHI MOTEGI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10433997

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし