

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791447

研究課題名（和文） 膵癌の分子標的治療薬・放射線併用療法の基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research on molecular target therapy with radiotherapy for pancreatic cancer

研究代表者：

關 智史 (SEKI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30398614

研究成果の概要（和文）：分子標的治療薬抗 EGFR 抗体は、HER2 発現乳癌では効果が認められ、臨床応用されている。膵癌でも効果が期待されており、臨床試験中である。放射線併用効果についての研究報告は少ないものの、乳癌においては最近、散見されるようになってきた。今後、膵臓癌においても臨床応用されることを考えると、HER2 発現膵癌に対する抗 EGFR 抗体と放射線併用治療についての基礎的研究の果たす役割は非常に大きいと思われ、この研究を着想するに至った。また、膵臓癌は血流が豊富であり、VEGF も標的になりうることから、抗 VEGF 抗体と放射線併用療法についても検討をすすめたい。

研究成果の概要（英文）： The molecular target drug, anti-EGFR antibody, is already used for the HER2 expression breast cancer in clinical. An effect of this drug is expected in pancreatic cancer and is in a clinical trial. Although there was few reports to study its affect of combination with radiation therapy, the radiation combination effect came to appear in the breast cancer recently. As the role of anti-EGFR antibody for HER2 expression in pancreatic cancer, it is very important to study about the combination with molecular target therapy and radiation therapy in future. Although bloodstream has non-abundant in pancreatic cancer, and VEGF might be a target, we further study here about the anti-VEGF antibody, another molecular target drug, and radiation combination therapy

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：分子標的薬、放射線、放射線併用法、膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は年々 増加傾向にあり、我が国の癌死の第 5 位を占めている。化学療法の進歩により、

大腸癌、乳癌などの癌では stage によっては術後の 5 年生存率は 70～95%程度期待できるものも見られるのに対し、膵癌では症状が比

較的出にくいいため、早期発見は容易ではなく、切除可能なものは40%程度であり、切除例でも5年生存率は全国平均15%以下と予後不良である。根治療法としては手術が基本ではあるが、化学療法、放射線療法の併用により生存期間中央値の延長が見られたという報告も少なくない。膵臓癌の放射線感受性は比較的低く、また、周囲に十二指腸、腎臓などの耐容線量の低い組織・臓器が近接しており、膵臓癌に対する治療可能比は低い。術中照射のほか、5Fu、ゲムシタビンなどの放射線増感作用を利用した併用療法により、放射線治療効果を増強する工夫が取られてきた。一方、モノクローナル抗体を利用して、抗原を発現する細胞の増殖を阻害する分子標的治療薬が臨床応用されるようになり、より少ない副作用で腫瘍縮小効果が期待できるようになってきた。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蛋白に特異的に結合し、腫瘍縮小効果を発揮する分子標的治療薬である。乳癌の15~25%前後にHER2が発現しており、トラスツズマブ単独もしく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。乳癌以外にも、卵巣癌(~25%)、胃癌(15~30%)などでもHER2が過剰発現しているものがあることが知られ、トラスツズマブの有効性を示す報告が見られる(Int J Oncol 2008 Jan;32(1):89-95、Cancer Lett 2004 Oct 28;214(2):215-24)。特にHER2過剰発現胃癌では、有効性、安全性、薬物動態を検証する国際的な臨床試験(TOGA試験;22ヵ国120施設)がすでに開始されている。膵癌においても、HER2過剰発現例でトラスツズマブ有効を示す報告が見られるようになった(Clin Cancer Res 2006;12:4925-32)。膵癌でもEGFRとの関連性が指摘され

(Oncologist. 2008 Mar;13(3):289-98.)、最近、HER2の発現量の少ない膵癌細胞に対してもトラスツズマブが腫瘍縮小効果を認め、担癌マウスの生存率を改善したとする研究が報告され(J Immunother. 2008;31:537-44)、HER2やトラスツズマブが細胞によって異なる生物学的効果を持っている可能性が示唆された。また、HER2を過剰発現している食道癌(Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Jan 1;61(1):203-11)や乳癌(Met Cancer Ther 2003 Nov;2(11):1113-20)において、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、併用療法への期待が高まっている。さらに、乳癌細胞では放射線照射がHER2発現を促進するという報告もあり(J Exp Clin Cancer Res. 2004 Dec;23(4):675-80)、HER2/neu遺伝子と放射線感受性との関連性が示唆される。

2. 研究の目的

膵臓癌とVEGFとの関連性も古くから指摘されており(Oncologist. 2008 Mar;13(3):289-98.)、化学療法と抗VEGF抗体とを併用したphase II試験について、肯定的な果が報告された(Invest New Drugs 2008 Oct;26(5):463-71. Epub 2008 Apr 1.)。放射線治療との併用に関する報告は未だに見られず、本研究にて基礎的検討を進めたい。

そこで我々は、膵癌細胞の抗EGFR・VEGF抗体、放射線照射との関連についてin vitro実験を中心に研究していく。更に、担癌マウスを用いたin vivo実験を中心に、抗EGFR・VEGF抗体と放射線照射の影響を解析する。その治療効果の機序として、アポトーシスの関連性をふまえ、発現する遺伝子の変化を解析し、今後の研究への橋渡しも考えていく。

3. 研究の方法

(1) 膵癌培養細胞の HER2・VEGF 発現について：数種類の膵癌細胞について、各々をスライドグラスにのせ、乾燥させる。熱・酵素処理後、脱水固定する。蛍光標識した HER2/neu プローブと 17 染色体プローブをハイブリダイゼーションし、蛍光顕微鏡にて観察する。発現の確認された細胞について、realtime PCR 法により、HER2/neu・VEGF の発現量を半定量的に比較し、強発現している細胞、中等度に発現している細胞を選択する。Positive control として、すでに EGFR・VEGF が強発現していることで知られている乳癌細胞 SK-BR-3 を用いる。

(2) 抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体単独の膵癌細胞増殖への影響について：MTT アッセイにより、抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体単独での細胞増殖抑制効果について解析する。乳癌細胞 SK-BR-3 と膵癌細胞の計 4 種類について、96 穴プレートに 3×10^3 個の細胞をき、24 時間培養する。0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で各抗体を添加する。72 時間培養した後、MTT アッセイキットを用いて、細胞増殖・毒性について評価する。5-FU、cisplatin についても、同様の実験を行い、3 者での比較を行う。

(3) 抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体と放射線照射の相乗効果について：上記 4 種類の細胞について、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する。10cm シャーレに細胞を適切な濃度で蒔く。X 線照射装置にて 0、0.5、1、2、4、8Gy を照射し、生存曲線を作成する。抗体、5-FU、cisplatin を 0.01、0.1、1、10、100 mg/mL の濃度で添加し、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する。

(4) 放射線照射による HER2・VEGF 発現量の変化について：4 種の細胞を 10cm シャーレに細胞を適切な濃度で蒔き、X 線照射装置にて 0、1、2、4、8Gy を放射線照射する。照射しない細胞と照射した細胞、計 8 種より RNA を採取し、ノーザンブロット法により、HER2・VEGF 遺伝子の発現量の変化を見る。

(5) 担癌マウスにおける抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体と放射線照射の相乗効果について：上記 4 種類の細胞をヌードマウスの背部皮下に移植する。5mm 前後の大きさになった時点で、腫瘍サイズを計測後、X 線照射装置にて 1 回 2Gy、1 日 2 回で 10 日間照射する。抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体を静脈投与する群と投与しない群について、放射線照射による腫瘍サイズの変化を解析する。

(6) 抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体による発現遺伝子の変化について：HER2 発現変化の顕著な細胞について、抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体を 0 mg/mL 、100 mg/mL 添加培養する。添加培養、無添加培養した細胞より、RNA を採取し、マイクロアレイ法により、発現遺伝子の変化をプロファイリングする。

4. 研究成果

数種類の膵癌細胞株、Panc1, KP3, BxPC3 cells and MiaPaca2 cells に対して、HER2/neu プローブを用いた immunofluorescence 法を行い、HER2 発現細胞を検討した。更に VEGF の発現量を real-time PCR 法により定量し、膵癌細胞株での HER2 及び VEGF 発現を検討した。

MTT 法により抗 EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体単独での細胞増殖抑制効果について解析した。同様に 5-FU, cisplatin についても MTT 法を行い、3 者間での比較検討を行ったところ、抗

EGFR 抗体・抗 VEGF 抗体単独で細胞増殖を抑制する傾向がみられた。

放射線照射単独での細胞増殖への影響を解析するために、コロニー法を用いて種々の膵癌細胞株の生存曲線を求めた。

放射線照射単独での膵癌細胞増殖への影響を検討するために、コロニー法を用いて種々の膵癌細胞株の放射線照射に対する生存曲線を求めた。更に、抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体各々を添加し、放射線照射との併用による生存率の影響を検討した結果、各々の抗体と放射線照射との併用で細胞増殖抑制への相乗効果がみられた。

また、抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体と放射線照射の併用による影響を RT-PCR 法により HER2, VEGF 遺伝子発現量への影響を検討した結果、mRNA 発現の抑制傾向がみられた。また、抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体各々と放射線照射との併用による生存率の低下がアポトーシスを介しているか否かを検討するために、Bax, BCL-2, caspase-3, PARP, 及び cleaved caspase-3, PARP 蛋白発現を western 法により検出した。Bax, BCL-2 発現は未処理と薬剤と放射線照射の併用とでは顕著な発現の差が検出されなかった。が caspase-3, PARP 蛋白の cleaved を起こしていることがみられた。更に、細胞増殖抑制が認められた細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、X線照射、抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗体各々を投与したマウスと投与していないマウスの腫瘍サイズの変化を検討した。その結果、2 群での腫瘍サイズでは差がみられたが、顕著な差ではなかった。

膵癌の治療がいかに困難かはこれまでの幾多の臨床試験と治療成績が物語っている。根治切除の限界や化学療法、放射線治療の効果が乏しい現状では、膵癌の治療はチャレンジ

ングな領域の一つであり、分子標的治療に期待が寄せられている。しかし一般的に抗癌剤に対する感受性が低いことなどから、薬物療法に関する開発が遅れており、標準的治療法が現在までのところ確立していない。しかし実際には、膵癌における化学療法において、5-FU との無作為比較試験によりゲムシタビンの有効性が認められ、標準的薬剤として広く用いられるようになった。さらにゲムシタビンの大量投与や定速投与の試み、さらにゲムシタビンと 5-FU、シスプラチン、オキザリプラチンなどとの併用治療の臨床試験が進められている。5-FU の経剤として Capecitabine, S1 が開発され、その有用性が期待されている。局所進行癌においては、5-FU を用いた放射線化学療法が標準的治療法として行われてきた。最近ではゲムシタビンを用いた放射線化学療法の臨床試験が進んでいる。一方、EGF レセプターなど癌細胞に特徴的な遺伝子発現が明らかになり、それらの阻害剤など分子標的薬が開発され、膵癌においても臨床試験が行われている。また遺伝子解析による薬剤応答性を調べ、個々の薬物毒性を予測することにより治療の個別化する研究が進められている。

今後発現遺伝子とアポトーシスとの分子生物学的機序の検討、及び膵臓癌は血流が豊富であり、VEGF も標的となりうることから抗 VEGF 抗体と放射線併用療法及び抗 EGFR 抗体、抗 VEGF 抗との関連を放射線感受性との関連性を検討していきたい。

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)

Clinical evidence of particle beam therapy. Shigematsu N, Shiraishi Y, Seki S, Fukada J, Ohashi T. Int J Clin Oncol. 17(2): 75-78, 2012 査読有

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

關 智史 (SEKI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30398614