

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 6 月 6 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791939
 研究課題名（和文） 頭頸部癌におけるcSrcと放射線治療との臨床的關係および機能の解析
 研究課題名（英文） Analysis of relations with cSrc and the radiation therapy in head and neck cancer patient
 研究代表者
 松本 文彦（MATSUMOTO FUMIHIKOA）
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号：70445584

研究成果の概要（和文）：

頭頸部扁平上皮癌臨床検体に対して cSrc の免疫染色を行った検討では cSrc が高発現している症例ではしていない症例と比較し放射線抵抗性であることが判明している。さらに cSrc だけでなく IGF-1R と EGFR に関してもその相互作用と放射線治療の関係を in vivo モデルを用いて検討した。その結果では過去の報告と同様に抗 EGFR 抗体と放射線の併用では高い抗腫瘍効果を示し、放射線単独と比較してその効果を増強している。抗 EGFR 抗体にさらに IGF-1R 抗体を加えると放射線感受性はより高まり、高い抗腫瘍効果を発揮することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

The specimen was obtained by biopsy or surgery from patient was investigated by immunohistochemistry. The patients have high expression level of cSrc is more resistant to radiotherapy than low expression. Furthermore, the combination effect of anti IGF-1R and EGFR antibody and radiotherapy to head and neck cancer cell was examined in xenograft mouse model. The combination of anti-EGFR and IGF-1R and radiation showed high antitumor effect.

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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学

1. 研究開始当初の背景

cSrc はがん遺伝子のなかでも早期に発見され癌発生との因果関係や癌における働きなどが様々な角度から研究されてきている。腎、肺、大腸など多くの癌で upregulate されており、その発現度

と予後との間に相関関係があると言われている。しかしながら、その機能や癌の生物学的特徴とどのような関係があるかは、いまなお不明な点が多い。申請者は頭頸部癌におけるこの遺伝子の機能解析、特に放射線治療との関わり合いを研

究してきており、いくつかの新たな知見を得ている。

申請者はまず *in vitro* モデルを用いて頭頸部扁平上皮癌に対する cSrc と放射線治療の関係を研究した。いくつかの頭頸部扁平上皮癌細胞に対して phospho-kinases array kit を用いて様々なリン酸化タンパク質の発現状況を網羅的に調べた。その結果多くの培養癌細胞において p-cSrc の上昇が認められ、その程度は細胞ごとにさまざまであった。次に clonogenic survival assay を用いて先に使用した細胞の放射線感受性を調べた。2Gy の線量を与えた際の細胞の生存率で比較したところ、各々の癌細胞において放射線感受性の違いがあることが分かった。これらの癌細胞における放射線感受性と p-cSrc の発現レベルの間には有意な相関関係があり、p-cSrc が高発現であるほど放射線治療に抵抗性であることが分かった。上記で使用した培養癌細胞の中から放射線抵抗性である細胞を選出し、それらに対しいくつかの手法を用いて cSrc の発現を抑制することにより放射線感受性がどう変化するかを検討した。まずは siRNA テクニックを用いて癌細胞の cSrc の発現を抑制したところ、放射線に対する感受性は増強した。次に cSrc inhibitor の dasatinib (thyrosine kinase inhibitor) を用いてそのリン酸化を抑制すると siRNA の時と同様に感受性は増強した。前記の実験で得られた結果を *in vivo* のモデルにおいても確認している。ヌードマウスの下肢皮下に癌細胞を注入し、コントロール群、放射線治療単独群、dasatinib 単独群、dasatinib と放射線治療の併用群の 4 グループに randomize して実験を行ったところ、併用群で最も腫瘍の成長が遅く、照射単独群と比較し dasatinib を治療に加えることにより放射線の効果が enhance されることが確認された。

このように cSrc の頭頸部扁平上皮癌における放射線治療に対する役割に関していくつかの新たな事が分かった。今後は cSrc inhibitor を用

いて既存の抗癌剤との相互作用や実際の臨床で cSrc と放射線治療との関係を研究したいと思いい本計画を企画した。

2. 研究の目的

背景に記した如く cSrc は放射線感受性との関連が培養癌細胞では認められるという予備的知見をえているが、研究の一つとして、これらの結果が実際の臨床でも応用できるのかを検討する。これらが応用することができれば、治療選択のファクターとして大変有用であると考え。そして cSrc inhibitor と現在頭頸部癌に対して最も頻繁に使用されている抗癌剤であるシスプラチンとの併用効果を検討する。シスプラチンの抗悪性腫瘍効果が比較的高い培養癌細胞に対して cSrc inhibitor を付加することによりその効果を高めることができるのか、またシスプラチン抵抗性の細胞に対して同様に cSrc inhibitor を付加することにより抵抗性を解除することができるのかを実験的に検証を行いたい。

近年頭頸部癌、特に進行癌に対して化学放射線療法が初回治療として選択されるケースが増加してきた。化学療法のレジメの選択などによりその治療効果は高く、進行癌であっても根治可能な症例が増えてきている。しかしながら、同治療を用いても根治できない症例も少なからず存在し、また根治し得たても治療による粘膜炎などの障害により高度 QOL 低下をきたす症例も多い。そういった観点から 2 つのことが望まれると考える。ひとつはより放射線の感受性、治療効果の期待できる症例を治療前に選択できるようになれば治療選択の判断が確実になるということである。二つ目により治療効果の高いレジメによる化学放射線療法の考案である。それは抗腫瘍効果が高いだけでなく正常組織への障害が小さいものでなくてはならない。以上のことから cSrc を放射線治療の効果の予測因子として用いることができればより治療

選択の判断が的確に行えることとなる。また既存の化学療法に **cSrc inhibitor** を付加することにより、より効果的な治療ができる可能性が増える。これらのことを目指し申請者は本研究計画が頭頸部癌治療の発展につながると信じている。

3. 研究の方法

咽喉頭および口腔癌により放射線治療を受けた患者の腫瘍組織パラフィン包埋材料ないし凍結保存材料を使用する。これらの組織内の **cSrc** の発現状況や発現パターンを免疫組織化学および遺伝子・タンパク解析法を組み合わせ総合的に頭頸部扁平上皮癌患者における **cSrc** と放射線療法との関係を明らかにする。

- a) 免疫組織化学染色: 抗 **c Src** 抗体を用いた **EnVision+system-HRP** 法にて免疫組織化学染色を行う。
- b) マイクロディセクション: 病変部からマイクロディセクションを行い、核酸を抽出し、**DNA**, **mRNA** 解析の試料とする。

上記の **cSrc** 発現の検討と放射線治療の効果の比較検討リンパ節転移、再発リスク、などの臨床的経過と対比し臨床的意義を探る。以前の申請者の研究において放射線感受性を調べた培養癌細胞 10 種に対して **MTT assay** を用いてシスプラチンの感受性を調査する。各々細胞において **GI50** を指標としたシスプラチン感受性と先に調べた **cSrc** の発現レベルとの相関関係を検討する。上記実験の結果からシスプラチン抵抗性及び感受性の高い培養癌細胞をそれぞれ 2-3 種類選択し、それらに対し同様に **MTT assay** を用いて **cSrc inhibitor** の併用によりシスプラチンの効果がどのように変化するかを評価する。さらに前年度に検討した細胞の内 **cSrc** によりシスプラチンの効果が上昇したものを選択し

xenofraft mouse model を使用して、**in vivo** でも同様の現象が起きるかを検討する。腫瘍細胞をヌードマウスの下肢に打ち込み規定の大きさに達した時点から治療を開始する。無治療群、シスプラチン単独群、**cSrc inhibitor** 単独群、併用療法群で腫瘍のサイズ増大の程度、傾向を測定していく。**(Tumor growth delay 法)**。

In vitro: 培養癌細胞にシスプラチン単独、併用などの治療を行い様々な条件下で抽出したタンパク質に対しウェスタンブロット法を行いタンパクレベルでの変化を評価する。また **g-H2AX foci** や **TUNNEL** 法を用いて **DNA** 損傷やアポトーシスの誘導などを評価する。これらを元に併用療法の効果の裏付けやメカニズムを解析する

n vivo: **Tumor growth delay** の実験で使用したマウスの腫瘍組織を採取し、その腫瘍組織に対し **TUNNEL** 法や免疫組織染色を用いて併用療法のメカニズム解析を行う。

4. 研究成果

近年頭頸部癌、特に進行癌に対して化学放射線療法が初回治療として選択されるケースが増加してきた。化学療法のレジメの選択などによりその治療効果は高く、進行癌であっても根治可能な症例が増えてきている。しかしながら、同治療を用いても根治できない症例も少なからず存在し、また根治し得たとしても治療による粘膜炎などの障害により高度の **QOL** 低下をきたす症例も多い。それぞれの頭頸部扁平上皮癌症例に対する放射線の感受性予測、さらなる有害作用を最小限にとどめつつ、より治療効果の高い放射線治療の開発を目的とし研究を行ってきた。がん遺伝子の一つである **cSrc** にターゲットを絞り研究を行ってきた。**cSrc** は放射線感受性との関連が培養癌細胞では認められるという予備的知見を得ており、これらの結果が実際

の臨床でも応用できるのかを検討した。臨床検体に対して免疫染色を行った検討では cSrc が高発現している症例ではしていない症例と比較し放射線抵抗性であることが判明している。また頭頸部癌で放射線治療との併用で汎用されているシスプラチンとの併用効果を培養癌細胞で検討した。その結果ではシスプラチンと放射線との併用に比較しシスプラチン、放射線と cSrc inhibitor との3者併用では抗腫瘍効果が高いことが判明している。さらに cSrc だけでなく IGF-1R と EGFR に関してもその相互作用と放射線治療の関係を in vivo モデルを用いて検討した。その結果では過去の報告と同様に抗 EGFR 抗体と放射線の併用では高い抗腫瘍効果を示し、放射線単独と比較してその効果を増強している。抗 EGFR 抗体にさらに IGF-1R 抗体を加えると放射線感受性はより高まり、高い抗腫瘍効果を発揮することが判明した。

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 3 件)

- ① Riesterer O, Matsumoto F, Wang L, Pickett J, Molkenkine D, Giri U, Milas L, Raju U: A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe. Invest New Drugs 29: 514-22, 2011
- ② Sano D, Matsumoto F, Valdecanas DR, Zhao M, Molkenkine DP, Takahashi Y, Hanna EY, Papadimitrakopoulou V, Heymach J, Milas L, Myers JN: Vandetanib restores head and neck squamous cell carcinoma cells' sensitivity to cisplatin and radiation in vivo

and in vitro. Clin Cancer Res 17: 1815-27, 2011

- ③ Matsumoto F, Valdecanas DN, Mason KA, Milas L, Ang KK, Raju U: The Impact of Timing of EGFR and IGF-1R Inhibition for Sensitizing. Head and Neck Cancer to Radiation. Anticancer Res. 2012 Aug; 32(8):3029-35.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 2011 年日本頭頸部癌学会
頭頸部扁平上皮癌細胞における cSrc の放射線感受性との関係および cSrc 抑制による放射線増感作用の検討
- ② 2012 年日本頭頸部癌学会
抗 IGF-1R 抗体と抗 EGFR 抗体の併用による頭頸部癌細胞に対する放射線増感作用の検討

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 文彦 ((MATSUMOTO FUMIHIKOA))

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70445584