様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：１３８０２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｈ０３０１８・２３Ｋ２４２７９

研究課題名（和文）ＥＧＦＲを標的とした放射線治療効果予測システムの開発と、放射線治療併用薬の最適化

研究課題名（英文）Development of predicting system for radiotherapy efficacy targeting EGFR and optimization of radiotherapy concomitant drugs

研究代表者
間賀田　泰寛（Magata, Yasuhiro）

浜松医科大学・光医学総合研究所・教授

研究者番号：２０２０９３９９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々が開発したF-PYKによるインビボイメージングで、ゲフィチニブの治療効果があるとされる１ポイント変異のある細胞にのみ集積を示した。このこととDNA二重鎖切断の修復に関連する分子機構から、この集積差で放射線治療効果を予測できないか検討した。X線照射後の時間により治療効果の表現が異なり、残念ながらEGFR-TKのインビボイメージングのみから放射線治療効果を予測することは困難であると結論された。しかしながら、適切なEGFR-TK阻害剤を選択することで、放射線治療効果が増強される可能性を示すことが出来た。今後さらにデータの再現性取得を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究が実用化されれば、DNA二重鎖切断を対象としたがん放射線治療や、シスプラチンなどのがん化学療法薬を実施する前に、対象とするがんに効果が高いかどうかを、侵襲的な検査であるがん生検などをすることなく、非侵襲的なインビボイメージングにより評価可能となることと期待された。残念ながら我々が開発イメージングプローブのみでは難しいことが示されたが、性質の異なるがん細胞を用いた検討で、放射線治療時に併用する薬剤を適切に選ぶことで放射線治療効果が増強する可能性は示すことが出来た。これにより、患者にとって最も効果的な治療法選択に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：In vivo imaging studies with our developed F-PYK showed that F-PYK accumulates only in tumor cells with one-point mutations, which are known to respond to gefitinib, but not in tumor cells with WT or two-point mutations. Based on this and the molecular mechanism related to DNA double-strand break repair, we conceived that this difference in accumulation phenomena could be used to predict the effect of radiotherapy. Unfortunately, it is difficult to predict the effect of radiotherapy based on in vivo imaging of EGFR-TK alone, because in vitro cell experiments showed that the expression of the therapeutic effect depended on the time after X-ray irradiation. However, we were able to show that radiotherapy efficacy may be enhanced if an appropriate EGFR-TK inhibitor is selected and used in combination with radiotherapy. We would like to further improve the reproducibility of the data in the future.

研究分野：分子イメージング

キーワード：放射性医薬品　PET　放射線治療　インビボイメージング　小動物　分子標的イメージング

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

EGFR が活性化し下流にシグナルが伝わると、細胞増殖・アポトーシス抵抗性が惹起される。細胞に対して放射線治療や化学療法を行うことで DNA 二重鎖切断が惹起されると活性化した EGFR が核内へ移行し、DNA-PK と作用して DNA 修復機構が活性化されるため二重鎖切断がすみやかに修復される（図 1）。切断された DNA 二重鎖の修復が早いほど治療効果が低いことになる。この際、活性型 EGFR-チミジンキナーゼ（以下、TK）を有する細胞は EGFR の核内移行が出来ないため DNA 修復機能が弱く放射線感受性が高いと言われている。これまでに申請者らは、申請者らが開発した図 2 に示すイメージング薬剤、PYK を用いて放射線感受性の高いがんの鑑別が可能であることをインビトロで示した（Zhu HJ, Magata Y, Sakahara H. et al. Am J Nucl Med Mol Imaging. 4:293 2014）。また、そのようながんでは活性型 EGFR-TK 阻害剤であるゲフィチニブ処理により S 期の細胞が減少することから、その分放射線治療単独より治療効果がさらに増進することもインビトロ実験系で示してきた（図 3）。この事は併用薬の有用性にエビデンスを与えるものである。これらの事を基礎として、EGFR-TK を標的とする分子標的イメージング薬剤を開発し、画像化することが出来れば、一定のリスクを伴う生検を行うことなく、放射線抵抗性の程度を治療開始前に評価することが可能となり治療計画をより有効なものに出来ると期待されたため、申請者らはこれまで、新規 PET 用活性型 EGFR-TK イメージングプローブである F-PYK（図 4）を開発し、その腫瘍集積性と X 線治療効果についてマウス担癌モデルを用いて検討してきている。その結果、F-PYK が集積するがん種は L858R や ex19del の活性型変異であり、所期の通り放射線治療効果は高～中感度であった（図 5 左）。それに対し、F-PYK が集積しないがん種では放射線治療効果は中～低感度であった（図 5 右）。F-PYK が集積しないがん種の EGFR 遺伝子型には野生型と T790M が加わった耐性型が含まれる。野生型は EGFR からのシグナルが元々多いため放射線治療により DNA 二重鎖切断が惹起されても速やかな修復機構が働いたためと考えられ、T790M 変異を有する耐性型では代償的に AXL 経路や IGF-1R 経路が活発化してシグナル伝達することが近年知られており（R.Wang, et al., Nat.Commun. 2019）、これらが働くことで DNA 修復機構が働き、放射線治療効果の感度が低下したと考えられる。

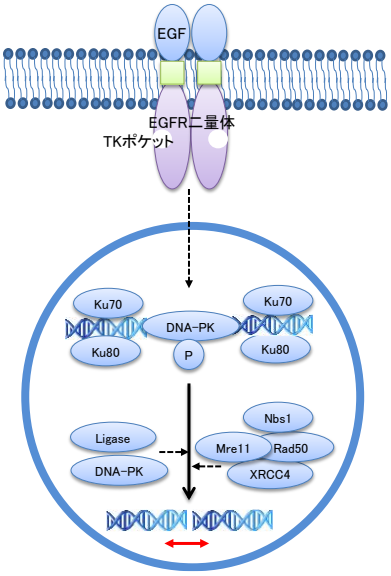

図 1．DNA 修復メカニズム模式図

W. Lilleby ら。Oncol.Rev, 6.2011 より改編

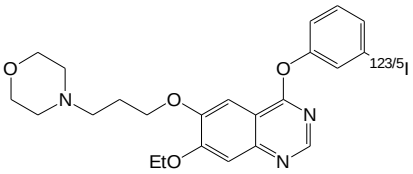

図 2．放射性ヨウ素標識 PYK の化学構造

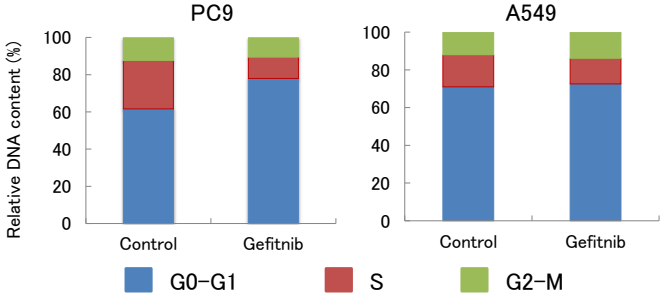

図 3．ゲフィチニブが細胞周期に与える影響

（PC9 は活性型 EGFR-TK を有する）

以上のようなこれまでの検討から、下記のような問題点が明らかとなった。

・がん細胞系をさらに増やした時、F-PYK の有用性の変化があるのか。

・F-PYK の集積が低いがん種で野生型と T790M 変異を示す耐性型の鑑別が出来ないか。

・放射線治療時にその効果を増強するため併用薬の最適化が出来ないか。

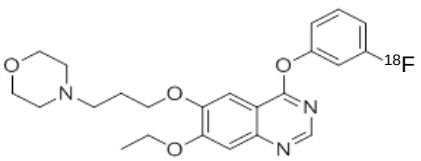

図 4．PET 用 F-18 標識 F-PYK の化学構造

・放射線治療開始後に耐性が惹起された際に画像化による T790M の鑑別が出来ないか。
・F-PYK は肝臓への集積が高いので低減させることが出来ないか。
これらの問いに関して本研究により解決を試みることで、放射線治療効果予測システムと、より効果的な放射線治療効果を得るための併用薬の最適化を目指すこととした。

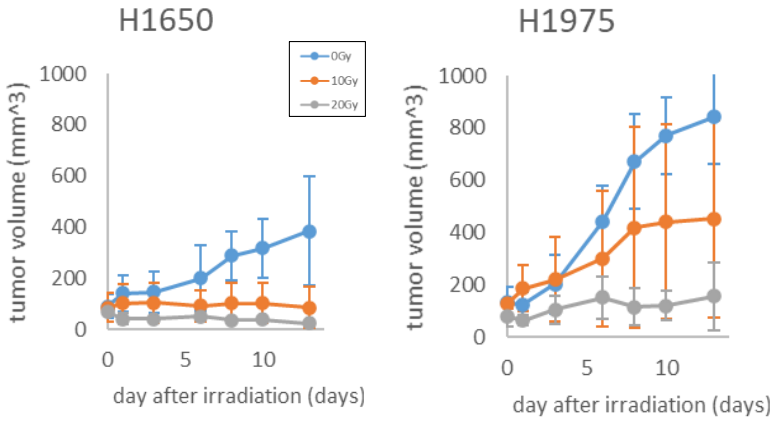

図 5. 放射線治療効果（左）F-PYK が集積する活性型変異（右）F-PYK が集積しない耐性型変異

２．研究の目的

上記のような背景のもと、本研究の目的は、がんの放射線治療により惹起される DNA 二重鎖切断の修復に関連する分子機構について着目し、臨床応用可能ながん放射線治療効果予測システムと、併用薬によるより効果的な放射線治療効果を得るための最適化を目指すこととした。これまでにも分子生物学的手法を活用した放射線治療効果予測に関する検討が行われてきたが、生検による遺伝子検査は一定のリスクが伴う事と、治療開始後の生検精度が低い事が指摘されている。また、インビボでの評価法についてはほとんど検討されていない。また、化学放射線療法 (Chemoradiotherapy、CRT)として併用薬を用いた放射線治療に関する検討も進められているがまだ基礎的検証が不足している。さらに、分子標的イメージングという概念を活用した放射線治療効果予測イメージング薬剤はこれまで開発されておらず、非常に独創的であり、有効であると期待される。これにより、放射線治療コンパニオン診断法とも呼べる新しい画像診断の概念を提出しうるものと期待される。本研究のように合目的的な化合物デザイン、その合成・放射性核種による標識を行い、インビトロ評価、動物イメージング研究、放射線治療研究という幅広い検討ができることは、本研究グループの特色であり、事実これまでに多くの実績をあげてきた。

がんは個体によるばらつきも大きいため、線量の増減や照射時期、放射線増感剤等薬剤投与量の調節など、今後重要となってくると考えられる個々の患者に適応したテーラーメード医療の推進に、本研究の成果が重要かつ定量的な情報を与えることが可能となり、放射線科学・核医学領域にとって意義深いものと考えられる。また医療経済的にも有益と思われる。

３．研究の方法

以下の研究において、各担当者らは公正研究推進協会が実施する e-ラーニングである eAPRIN の関連科目を受講し修了証が得られたうえで参加した。動物を用いる場合は予め浜松医科大学動物実験倫理委員会による審査・承認を受けて実施した。また、放射性同位元素を用いる場合は放射性同位元素等の規制に関する法律および関連法令、浜松医科大学医学部附属病院放射線障害予防規定を順守して実施した。その他、関連法令に従い実験を行った。

本研究においては、3 種類のヒト肺がん由来細胞株、WT である A549 （6.0×10^4 個）、del E746_A750 の１ポイント変異を持つ PC9 （8.0×10^4 個）、および L858R/T790M の２ポイント変異を有する H1975（8.0×10^4 個）を用いることとし、A549 は 10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した RPMI（2.0 mL）、PC9 と H1975 は 10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した D-MEM 培地（2.0 mL）に懸濁し、35 mm dish に播種した。

１．放射線治療効果評価

X 線照射 3 日前に 35 mm dish に細胞を播種し、3 日後に各種線量の X 線を 35 mm dish 上で照射した。その後細胞を回収し、96 well plate に再播種し、その 3 日後あるいは 4 日後に CCK-8 アッセイにより生細胞数を評価した。

２．細胞種を追加した F-PYK 集積評価

これまでの４種のがん細胞に加え、活性型変異の一つである L858R の１ポイント変異株、H3255 を追加してこれまでに開発している F-PYK による画像評価を追加した。これまでの検討と同様に、ヌードマウスに H3255 腫瘍細胞を移植した担癌マウスモデルを用いて F-PYK による PET 撮像を行った。撮像前日夜から絶食し、イソフルラン麻酔下で F-PYK を尾静注し、投与直後から 120 分間の PET 撮像を施行した。それぞれ画像再構成後、腫瘍に VOI を設定し、SUV を算出することで評価した。

３.放射線治療に対する EGFR-TK 阻害剤の効果

EGFR-TK の第一世代阻害剤であるゲフィチニブおよび２ポイント変異にも有効と言われるオシメルチニブを用いて、それぞれの前処置による放射線治療効果についてインビトロ実験系で検討した。X 線照射 3 日前に 35 mm dish に細胞を播種し、X 線照射 1 日前にゲフィチニブ(Gef)、あるいはオシメルチニブ(Osim)を添加し、その 24 時間後に各種線量の X 線を 35 mm dish 上で照射した。その後細胞を回収し、96 well plate に阻害剤を含んだまま再播種し、その 4 日後に CCK-8 アッセイにより生細胞数を評価した。

４．研究成果

各細胞を用いて X 線照射 3 日後あるいは 4 日後に生細胞数を評価したところ、図 6. のような結果となり、ほぼ安定して X 線照射実験が出来ていることが示されるとともに、増殖の遅い H1975 細胞で、照射 4 日後で 3 日後に比較して細胞数の低下が顕著に観察された。X 線照射による細胞分裂の抑制が細胞数に反映されるまでに 4 日程度掛かっていることが示された。H1975 については、従来細胞分裂が遅いと評価されたことは無かったため、細胞の性質が変化していることも疑われた。いずれにしても、それぞれの細胞腫に対する 50%効果線量は、A549 で 2.5 Gy、PC9 で 4.7 Gy、H1975 でも 4.7 Gy と見積もられた。これらは照射 4 日後の細胞数より求めたものであり、上記の通り評価点により異なる結果となり得ることは注意が必要である。

今回さらに L858R の１ポイント変異株、H3255 を追加して、我々が開発した F-PYK によるそれぞれのがん細胞に対するインビボイメージング研究の結果を図 7 に示す。F-PYK が同じく活性型変異である ex19del の一種、H1650 と同様の高い親和性を有することが示され、ex19del である PC9 や H1650 に比べて 2 倍近い取込を有することが示された。In vivo 腫瘍集積量は、in vitro 細胞取り込み量とは必ずしも相関しなかったが、H3255 では、投与 6 時間後まで腫瘍集積が上昇し続ける事が示され、L858R 変異を有する場合、他と異なり所謂 koff が遅いのかも知れないも

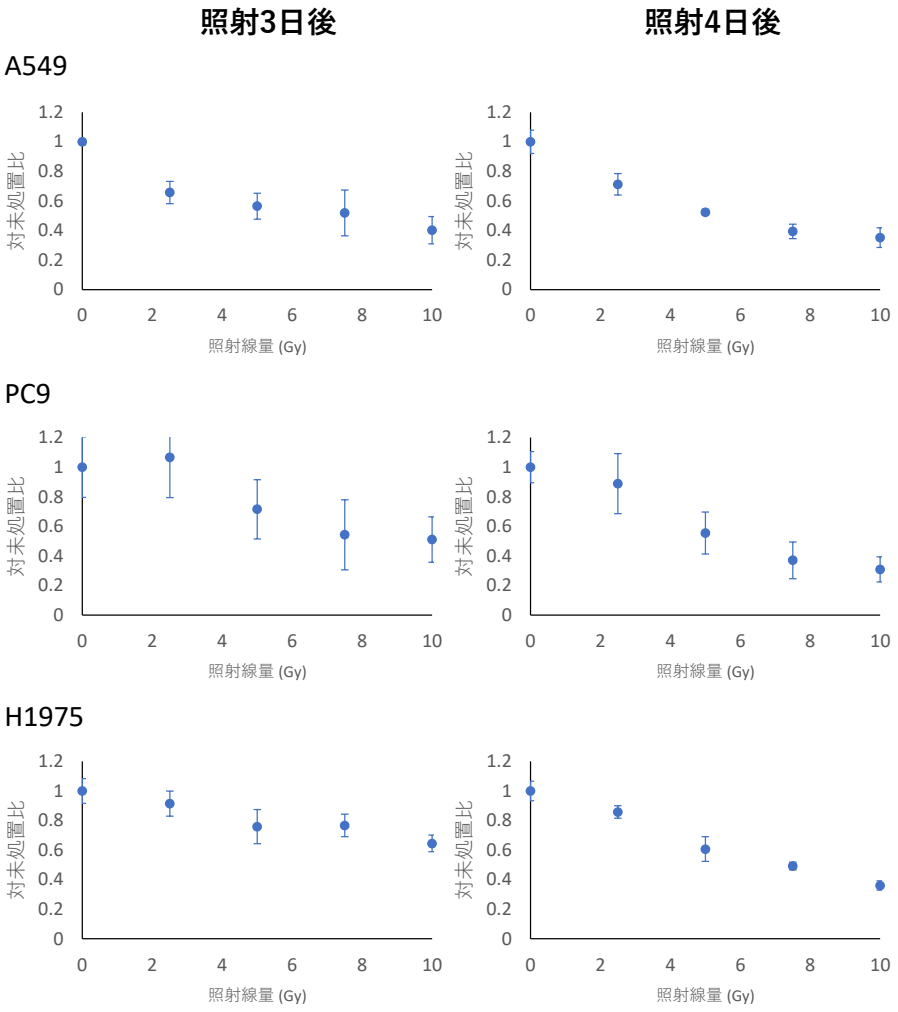

図６　各細胞で照射線量による残存生細胞数評価

のと推測された。また、F-PYK は総じて正常肺・脳への集積は低いため、肺がん原発巣と脳転移は検出可能と期待される。

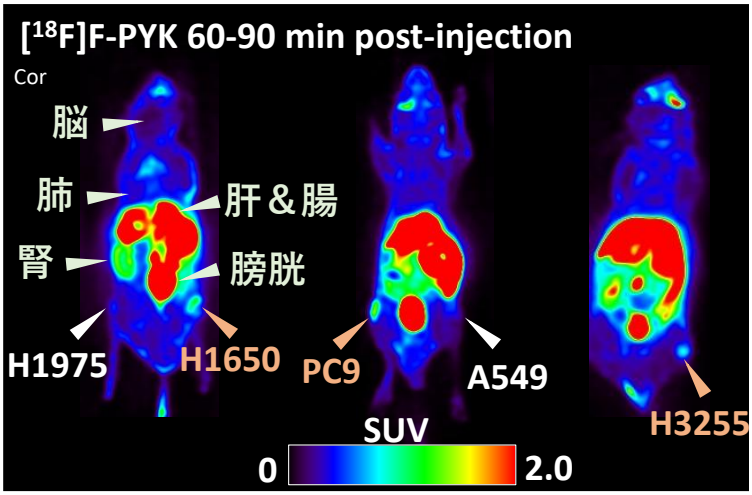

図 7. マウス担癌モデルにおける F-PYK 投与 1 時間後の PET

EGFR-TK の第一世代阻害剤であるゲフィチニブおよび 2 ポイント変異にも有効と言われるオシメルチニブを X 線照射 24 時間前に培地に添加し、各種線量の X 線照射を行った。24 時間前の阻害剤添加したのは阻害剤による DNA-PKs の阻害効果が表れるには 12 時間から 24 時間程度前の照射条件が必要という論文(Mol Cancer Ther 2006;5(2) 209)に基づいたものである。その結果、図 8 に示すように WT の A549 では 2.5 Gy の照射のみで 25.2%の細胞殺傷効果が見られたところ、ゲフィチニブ 0.5 nM を添加することで、41%の細胞殺傷効果となり、約 16%の増強効果が観察された。オシメルチニブ添加では増強効果は認められなかった。図 6 にも示すように、PC9 では 2.5 Gy では放射線治療効果が表れていないものの、ゲフィチニブ 0.5 nM を添加することにより放射線治療効果の増強がある傾向が示された。しかしながらオシメルチニブではその増強は認められなかった。なお、いずれの阻害剤においても、5 nM、50 nM では阻害剤自身による細胞殺傷効果が強く出てしまうため、評価できなかった。H1975 細胞においては、阻害剤無添加時には 2.5 Gy による放射線治療効果が 14.3%であったものの、ゲフィチニブ 0.5 nM 添加することにより、24.2%と約 10%増強効果が認められた。オシメルチニブ添加では同様の増強効果は認められなかった。なお、PC9、H1975 のいずれにおいても X 線照射をしないコントロール条件下において、阻害剤無添加に比べ、特にゲフィチニブ 0.5 nM 添加時に生細胞数が増加する傾向が見られた。原理的には細胞増殖も抑制されるはずであるが、何らかの代償機構が働いている可能性も考えられ、ばらつきもあるので再現性を取ることを含めて今後の更なる検討が必要と考えられた。

また、図 7 にも示すように、A549 と H1975 には集積を示さず、今回は実験には用いていないがゲフィチニブの治療効果があるとされる 1 ポイント変異である PC9 および H1650 に F-PYK が集積を示していた。我々はこの集積差により、放射線治療効果の強さが評価できないかと考え本検討を進めたが、X 線照射後の評価タイミングにより治療効果が観察されたり、されなかったりすることが示され、残念ながら EGFR-TK のインビボイメージングのみから放射線治療効果を予測することは困難であると結論された。しかしながら、それぞれの細胞の性質に適した EGFR-TK の阻害剤を選択することで、放射線治療効果が増強される可能性を示すことが出来たので、今後さらにデータの再現性取得などが必要であるが、今後の放射線治療を検討する上で有用な情報を与えるものと期待される。

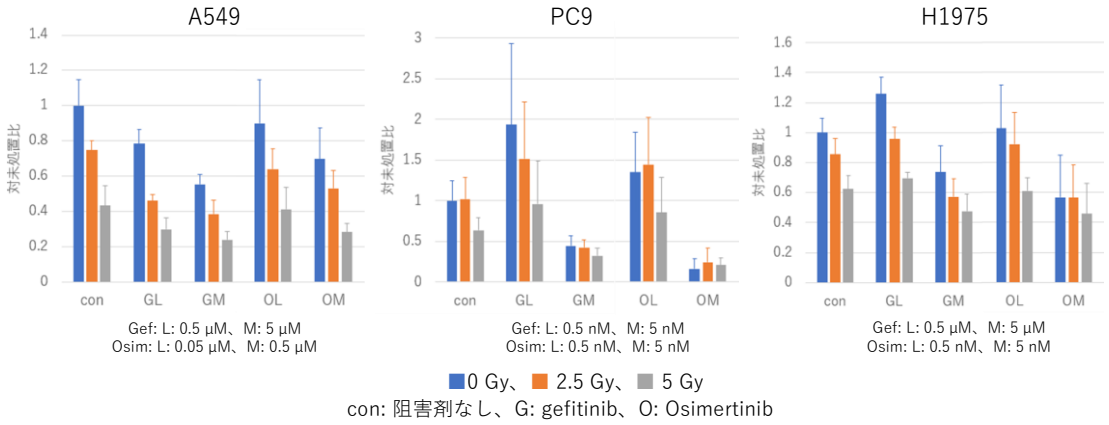

図 8　放射線治療に対する EGFR-TK 阻害剤の効果

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	中村　和正 (Nakamura Katsumasa) (20284507)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	鈴木　千恵 (Suzuki Chie) (20637285)	浜松医科大学・光医学総合研究所・助教 (13802)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関