

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462695

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるEGFR, IGF-1Rと重粒子線の関係の検討

研究課題名(英文) The relation between EGFR, IGF-1R and heavy ions in head and neck carcinoma

研究代表者

松本 文彦 (Matsumoto, Fumihiko)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70445584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌に対する線と炭素線照射の効果とEGFRの関係、また抗EGFR抗体(cetuximab)を投与による照射効果の変化、メカニズムを解析した。Clonogenic survival assayでは、頭頸部扁平上皮癌細胞のHN5において線、炭素線ともに増感作用を認めた。western blotでEGFRの発現状況を確認したところHN5ではEGFRの高度発現が認められた。HN5を用い、その増感作用のメカニズムをH2A-X foci、TUNNEL assayにおいてはcetuximabによりDNA損傷からの回復が遅延しapoptosisの誘導が増強されることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the effect of carbon ion radiotherapy and radiosensitization of cetuximab for head and neck squamous cell carcinoma. Clonogenic survival assay was done to evaluate enhancement effect of cetuximab to γ -ray and carbon ion. In HN5, cetuximab enhanced radiosensitivity to γ -ray and carbon ion. We performed western blotting to evaluate expression levels of phosphorylation-EGFR (p-EGFR) and EGFR after carbon ion radiotherapy with cetuximab in HN5. Neither cetuximab nor carbon ion showed any change on EGFR at short period from treatment. However, on p-EGFR, radiotherapy increase expression level and cetuximab suppressed this increase. Formation of nuclear γ -H2AX foci was monitored by immunofluorescence. Cetuximab differentially affected the survival and the radiosensitivity of HNSCC cells. Cetuximab suppressed DNA repair that was evident by the prolonged presence of nuclear γ -H2AX foci.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 放射線治療 炭素線 EGFR cetuximab

1. 研究開始当初の背景

増殖因子とその受容体からのシグナルは、腫瘍の発生・進展に大きな役割を果たしている。近年、癌治療の分子標的としてチロシンキナーゼ活性を有する増殖因子受容体が注目されている。消化器癌などでは、epidermal growth factor receptor (EGFR)などを標的とする分子標的治療薬の開発、臨床試験が進み、一部はすでに臨床応用されている。Insulin like growth factor 1 receptor (IGF - 1R)はEGFR同様、さまざまな細胞に発現が認められるチロシンキナーゼ活性を有する増殖因子受容体である。消化器癌などで過剰発現していることが報告されており、腫瘍細胞の増殖に必要な細胞分裂の促進と抗アポトーシス作用を有する。また、その発現状況は予後と関連があるとの報告が多数認められている。EGFRの有効性が示される一方で、一部の癌では抵抗性を示すことが問題となっており、抗体薬の導入とともにそれに対する抵抗性や治療効果を予測する因子などが問題となってきた。現在、抗EGFR抗体に対する効果予測因子や抵抗性のメカニズムの研究がおこなわれてきており、IGF-1RはEGFRに対する抵抗性と関係があるとされEGFR抵抗性癌細胞において抗IGF-1R抗体を併用することによりEGFRに対する感受性をとりもどすとともに腫瘍に対する相乗効果を認めるとの報告がなされている。しかしながら、頭頸部癌に関してまだ同領域に関し十分な研究が進んでいないのが現状である。一方、放射線治療においては、通常の放射線治療が表面付近の線量が最も大きく、深さとともに減衰するのに対し陽子線や重粒子線では、表面付近の線量が小さく、粒子が停止する付近で最も線量が大きくなるという特徴がある。特に炭素イオンなどの重粒子線は、陽子線と比べ、物質内での散乱が小さいため、がん組織とその周辺の正常組織に対する線量のコントラストを高めることができるだ

けではなく、同じ物理線量の陽子線やその他の放射線と比べると、生物効果(細胞に対する影響)が大きいという特徴がある。これにより、腫瘍に集中的にダメージを与える一方で、周辺正常組織へのダメージを小さく抑え、機能を温存できる可能性が高まるだけでなく、副作用は従来の放射線治療に比べて格段に少なくすることができる。

以上の長所を有する重粒子線は頭頸部癌にも有効性が認められており、通常の放射線治療では治療困難な腺癌や悪性黒色腫に良い適応とされている。しかしながら前述したEGFRやIGF-1Rといった増殖因子受容体と重粒子線治療の相互関係や治療におよぼす影響については十分に解明されているとは言えない。我々はEGFRとIGF-1Rの重粒子線治療における働きとEGFRを抑制することによる抗腫瘍効果の変化を検討しX線で得られた知見が応用できるのかを研究する。分子標的治療薬と重粒子線の併用によりさらなる腫瘍制御の可能性が認められれば機能温存による癌根治が狙え、臨床的意義は高いと考えられる。

2. 研究の目的

EGFRと抗EGFR抗体の重粒子線治療における働きを γ 線と炭素線で検討し、分子標的治療薬と重粒子線の併用によるさらなる腫瘍制御の可能性を検討する。EGFRの発現と頭頸部扁平上皮癌に対する炭素線照射の効果との関係。抗EGFR抗体(Cetuximab)併用による重粒子線照射効果の変化を検討した。

3. 研究の方法

1: IGF-1R、EGFRの発現と頭頸部扁平上皮癌に対する炭素線照射の効果との関係

1) 頭頸部扁平上皮癌細胞に γ 線照射を行い様々な線量、やタイムポイントでタンパクを抽出しIGF-1R,EGFRの発現状況をウェスタンブロット法にて確認する。その発現が照射効果とどのように関係し、放射線照射によってどのように変化するの

かを実験した。

- 2) 上記で使用した細胞（特に放射線抵抗性および感受性細胞）に対し、様々な線量で炭素線照射を行い、炭素線照射の効果を同様に CSA を用いて検討する。その結果と γ 線 で得られた上記結果との差異を検証する。
- 3) 同様にさまざまな条件下でのタンパクを抽出し IGF-1R と EGFR の発現状況を確認する。その発現状況と照射効果の関係、照射による発現状況の変化を調べ、 γ 線 で得られた結果と比較する。

2:抗 EGFR 抗体 (Cetuximab) 併用による重粒子線照射効果の変化の検討

- 1) 頭頸部扁平上皮癌細胞腫瘍細胞 (FaDu, Detroit, HN5) に対し cetuximab で処理 (照射 6 時間前に抗体を投与) し γ 線照射を行、CSA を用い照射効果に対する増感作用を細胞ごとに調べた。
- 2) 同じ薬剤投与条件下で炭素線を照射し、同様に CSA を用いて放射線効果を調べ、頭頸部扁平上皮癌細胞に対する cetuximab の炭素線に対する増感作用を検討した。またその結果が γ 線 で得られたものと線質を変更することによりどのように変化するのかを検討を行った。
- 3) 抗 EGFR 抗体 (Cetuximab) 併用による重粒子線照射効果増感のメカニズムの検討
 - 1) γ H2A-X foci によって炭素線による DNA ダメージと cetuximab の DNA repair に対する働きを検討した。
 - 2) TUNNEL assay にて炭素線による apoptosis の誘導と cetuximab によるそれらの増強作用を検討した。

4 . 研究成果

Clonogenic survival assay を用いて、 γ 線および炭素線に対する cetuximab の放射線増感作用を評価した。この結果では HN5 は他の FaDu, T871, Detroit562 に比べ比較的 γ 線および炭素線ともに増感作用を認めた。

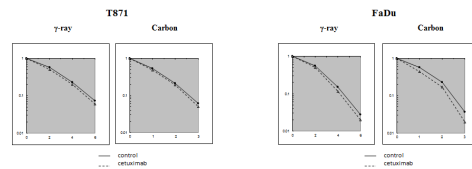
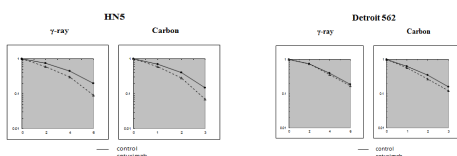


図 1

・EGFR のタンパク発現の変化

ウェスタンブロットを用いて γ 線、炭素線における EGFR および p-EGFR の発現状況及び変化を検討した。EGFR においては今回の短いタイムポイントでは cetuximab はいずれの線種においても変化は認められなかった。一方、p-EGFR においては照射後よりすぐに上昇が認められ時間の経過とともに低下していき、その上昇が cetuximab によって抑制されることが認められた。同様の現象は炭素線においても確認された。図 2

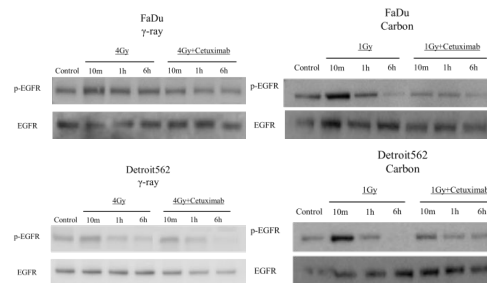
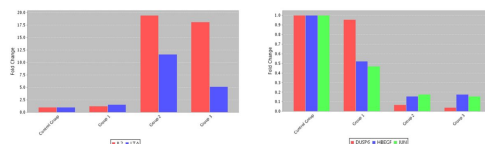


図 2 : cetuximab を照射 6 時間まえに投与し、 γ 線炭素線をそれぞれ 4Gy, 1Gy 照射した。照射後 10 分、1 時間、6 時間で sample を回収した。

PCR array にて、EGF および PDGF シグナリングに関係する遺伝子 84 種類を炭素線照射および cetuximab の投与の有無について検討を行った。Cetuximab 投与群および cetuximab と炭素線の併用群において、いくつかの遺伝子の発現変化が認められた。特にアポトーシスに関係する遺伝子において変化が多く認められ、cetuximab 投与および炭素線併用において IL-2、LTA が著明に上昇していた。



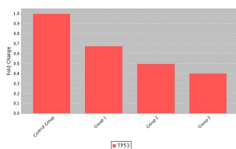


図 3 : Group1: carbon ion 1Gy 单独
Group 2: cetuximab 单独
Group 3: carbon ion 1Gy+cetuximab
サンプルは照射後 72 時間で採取した。

この効果の差が細胞本来の EGFR の発現状況と関係があるかを western blot で確認したところ HN5 では高度に EGFR が発現していることが分かった。この差が cetuximab の直接的な感受性の差になっているかは不明であるが、可能性としては考えることができるだろう。図 4

Basal level of EGFR and IGF-1R expression

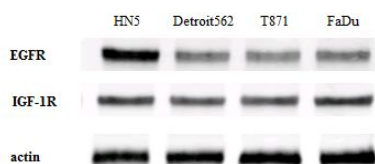


図 4

以降の実験においては cetuximab 感受性株の HN5 を用いて実験を行った。γH2A-X foci によって炭素線による DNA ダメージと cetuximab の DNA repair に対する働きを検討した。その結果では cetuximab によって放射線増感作用を示した HN5 では炭素線によって誘導された DNA 損傷からの回復が cetuximab によって遅延していることが分かった。図 5

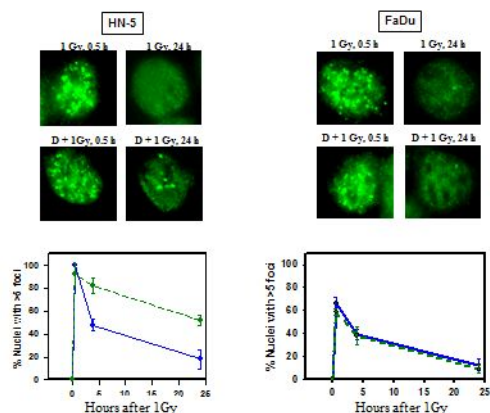


図 5

TUNNEL assay にて炭素線による apoptosis の誘導と cetuximab によるそれらの増強作用を検討した。その結果ではやはり survival assay, γH2A-X foci の結果と同様に FaDu よりも HN5 においてより cetuximab による apoptosis の誘導の増強作用が認められた。図 6

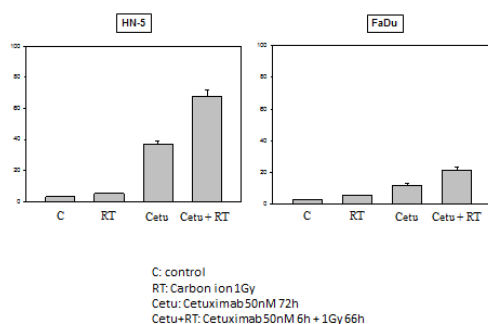


図 6

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 2 件)

1. Matsumoto F, Fujimaki M, Ohba S, Kojima M, Yokoyama J, Ikeda K.

Relationship between insulin-like growth factor-1 receptor and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer.

Head Neck 査読有 . 2015

Jul;37(7):977-81.

2. Matsumoto F, Ohba S, Fujimaki M, Ikeda K.

The value of insulin-like growth factor-1 receptor for predicting early glottic carcinoma response to radiotherapy.

Auris Nasus Larynx. 査読有 2016 Aug;43(4):440-5

3.

〔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 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

松本 文彦 (MATSUMOTO, Fumihiko)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70445584

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

唐澤 久美子 (KARASAWA, Kumiko)
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター・研究員
研究者番号：60214574