

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田中俊充	主査 教授 樋口 和秀 副査 教授 鳴海 善文 副査 教授 谷川 允彦 副査 教授 勝間田 敬弘 副査 教授 林 秀行
主論文題名 Gefitinib Radiosensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Suppressing Cellular DNA Repair Capacity (ゲフィチニブの DNA 修復能抑制による非小細胞肺癌に対する放射線増感効果に関する検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>肺癌は、現在全世界における死因の第1位である。非小細胞肺癌はその内の約80%を占め、2年生存率は25%であり、5年生存率はわずかに17%である。このような背景から、患者の生存率向上に向けて、非小細胞肺癌の増殖や分化に関わる特異的な pathway、特に Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を標的とした新しい治療戦略に強い関心が寄せられている。</p> <p>EGFR は、ErbB family に属する膜受容体であり、EGFR の活性化は癌細胞の増殖、血管新生、浸潤、遠隔転移やアポトーシスの阻害を促進することが知られている。非小細胞肺癌において EGFR は高発現しており、進行癌の病期、遠隔転移、予後不良と関連していることが報告されている。また放射線治療を含む治療における抵抗性とも関連していることが報告されている。これらのことから、EGFR のシグナルを阻害する薬剤を用いれば、放射線治療の効果を増強できる可能性が示唆されている。</p> <p>Gefitinib は、EGFR を標的とした小分子のチロシンキナーゼ阻害剤であり、単剤で非小細胞肺癌を対象とした臨床試験で抗腫瘍効果が認められた。</p> <p>更に、放射線治療が EGFR のリン酸化とその下流のシグナルを活性化させることからこれら2つの治療の組合せは非常に魅力的である。実際、様々な基礎研究において Gefitinib は、非小細胞肺癌の細胞株並びに動物モデルで放射線治療の感受性を増感していることが示されている。しかし、そのメカニズムについては動物モデルにおいてのみ、明らかにされており、細胞株においてはどのようにして放射線感受性が増強されているかについてはいまだ不明である。申請者らは、Gefitinib が放射線照射後の DNA 修復機構に何らかの影響を及ぼすことで放射線感受性を増感させ得るか否かを検討した。具体的には、Host Cell Reactivation(HCR)法、γ-H2AX や pNBS-1 を用いた免疫化学染色法、comet assay 法、Pulse-field gel electrophoresis(PFGE)法を用いて、Gefitinib が DNA 修復に対してどのような影響を及ぼすのかを検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>1. 細胞培養</p> <p>非小細胞肺癌細胞株である A549、H1299 を用い、推奨される条件下で培養した。</p>	

2. 放射線治療

放射線の線源は ^{137}Cs unit を用い、それぞれ必要な用量を照射した。

3. Cell survival analysis

A549、H1299 を、Gefitinib がそれぞれ $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $2\ \mu\text{mol/L}$ の濃度で含まれている培養液中で培養し、24 時間後放射線照射を行った。その後、細胞をトリプシン処理し、新たな培養皿に撒き、14 日後コロニーの数をカウントした。

4. Westren blot analysis

培養細胞における DNA 修復を司るタンパク質や EGFR の下流のタンパク質の発現量を検討するために、Westren blot analysis を行った。

5. Host cell reactivation

β -Gal を導入したアデノウイルスの DNA を高用量放射線照射を用いて断片化し、培養細胞(宿主)にそのウイルスを感染させ、その断片化された DNA をどの程度修復できるかを検討した。

6. 免疫細胞染色

培養細胞に対し、DNA 修復能を検討するために、 γ -H2AX、pNBS1 の免疫染色を行った。

7. Comet assay、PFGE

放射線照射後の DNA の断片化を検討するために Comet assay、PFGE を用いた。

《結果》

1. Cell survival analysis

A549、H1299 を Gefitinib($1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $2\ \mu\text{mol/L}$)で 24 時間投与した群は、非投与群に比べ、放射線照射の感受性を増強させた。(いずれにおいても有意差が認められた。)

2. Westren blot analysis

A549、H1299 に Gefitinib($1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $2\ \mu\text{mol/L}$)を 24 時間投与した群は非投与群に比べ、放射線照射後の pEGFR の発現レベルは低下していた。しかし、EGFR の下流のタンパク質である pERK の発現レベルは投与群において A549、H1299 ともに低下していたのに対して、pAKT の発現レベルは A549 においては同様に低下していたものの、H1299 においては、発現レベルの低下が認められなかった。

3. Host cell reactivation

A549、H1299 に Gefitinib($1\ \mu\text{mol/L}$)を 24 時間投与した群は非投与群に比べ、DNA の修復能に低下が認められた。(いずれにおいても有意差が認められた。)

4. 免疫細胞染色

A549、H1299 に Gefitinib($1\ \mu\text{mol/L}$)を 24 時間投与した群は、非投与群に比べて、放射線照射の 30 分後、1 時間後において γ -H2AX、pNBS1 の数が有意に増加していた。

5. Comet assay、PFGE

A549、H1299 に Gefitinib($1\ \mu\text{mol/L}$)を 24 時間投与した群は、非投与群に比べて、放射線照射の 30 分後、1 時間後、2 時間後に DNA の断片化が有意に促進されていた。

《考察》

昨今、EGFR を標的にした様々な薬剤が DNA 修復の pathway を阻害することによって、放射線感受性の増強効果を有していることが報告されている。今回、申請者らは Gefitinib の投与を放射線照射に組み合わせることで、非小細胞肺癌の細胞株において、生存率の著明な低下を認めた。そこで、その効果が DNA 修復の pathway にどのような影響をもたらすことで生じたのかを検討するために、4 通りの方法で検討を加えた。まず、放射線照射による DNA の断片化に関する検討として行った Comet assay 及び PFGE において Gefitinib はその投与群の DNA の断片化を促進した。次に DNA 修復能に関する検討として行った HCR においては Gefitinib はその投与群の修復能を低下させた。さらに、放射線照射による DNA の二重鎖切断は免疫染色による γ -H2AX、pNBS1 の検討により、

Gefitinib を組み合わせることで有意な数の増加が認められた。これらのタンパク質は、DNA の二重鎖が切断された部位に ATM を介して動員され、他の修復を担当するタンパク質の働きを促進することが知られている。つまり、これらのタンパク質の数が多いほど DNA の二重鎖が切断された部位が修復されずに残存していることとなり、その数の増加が放射線感受性の増強と相関関係があると報告されている。これらの放射線感受性の増強効果のメカニズムを探るべく行った Westren blot analysis による検討においては、Gefitinib は EGFR とその下流のタンパク質である ERK の発現レベルを低下させ、さらには DNA の二重鎖が切断された数の指標となる NBS1 の発現レベルを上昇させていた。

以上より Gefitinib による放射線感受性の増強のメカニズムについて検討した結果、EGFR→ERK→ATM→ γ -H2AX →NBS1 の経路の存在が示唆され、それが DNA 修復機構に影響を及ぼすことで放射線感受性を増強させている可能性があることが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	田 中 俊 充
論文審査担当者		主 査 教 授 樋 口 和 秀	
		副 査 教 授 鳴 海 善 文	
		副 査 教 授 谷 川 允 彦	
		副 査 教 授 勝 間 田 敬 弘	
		副 査 教 授 林 秀 行	
主論文題名 Gefitinib Radiosensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Suppressing Cellular DNA Repair Capacity (ゲフィチニブの DNA 修復能抑制による非小細胞肺癌に対する放射線増感効果に関する検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>肺癌は、現在全世界における死因の第1位である。非小細胞肺癌はその内の約 80%を占め、2 年生存率は 25%であり、5 年生存率はわずかに 17%である。このような背景から、患者の生存率向上に向けて、非小細胞肺癌の増殖や分化に関わる特異的な pathway、特に Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)を標的とした新しい治療戦略に強い関心が寄せられている。</p> <p>EGFR は、ErbB family に属する膜受容体であり、EGFR の活性化は癌細胞の増殖、血管新生、浸潤、遠隔転移やアポトーシスの阻害を促進することが知られている。非小細胞肺癌において EGFR は高発現しており、進行癌の病期、遠隔転移、予後不良と相関していることが報告されている。また放射線治療を含む治療における抵抗性とも相関していることが報告されている。これらのことから、EGFR のシグナルを阻害する薬剤を用いれば、放射線治療の効果を増強できる可能性が示唆されている。</p> <p>Gefitinib は、EGFRを標的とした小分子のチロシンキナーゼ阻害剤であり、単剤で非小細胞肺癌を対象とした臨床試験で抗腫瘍効果が認められた。</p> <p>更に、放射線治療が EGFR のリン酸化とその下流のシグナルを活性化させることからこれら 2 つの治療の組合せは非常に魅力的である。実際、様々な基礎研究において Gefitinib は、非小細胞肺癌の細胞株並びに動物モデルで放射線治療の感受性を増強していることが示されている。しかし、そのメカニズムについては動物モデルにおいてのみ、明らかにされており、細胞株においてはどのようにして放射線感受性が増強されているかについてはいまだ解明されていない。申請者は、Gefitinib が放射線照射後の DNA 修復機構に何らかの影響を及ぼすことで放射線感受性を増強させ得るか否かを検討した。</p> <p>申請者は、本研究において、</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 非小細胞肺癌の細胞株において Gefitinib 投与群は、非投与群に比べ、放射線照射の感受性を増強させた。 ② Gefitinib 投与群は非投与群に比べ、放射線照射後の pEGFR と pERK の発現レベルを低下させていた。 ③ Gefitinib 投与群は、非投与群に比べて、放射線照射後の DNA の断片化が有意に促進され、 			

また DNA の修復能が低下していた。

- ④ Gefitinib 投与群は、非投与群に比べて、放射線照射後の γ -H2AX、pNBS1 の数を増加させていた。

などを明らかにしている。

申請者が、Gefitinib による放射線感受性の増強のメカニズムについて検討した結果、EGFR→ERK→ATM→ γ -H2AX →NBS1の経路の存在が示唆され、それがDNA修復機構に影響を及ぼすことで放射線感受性を増強させている可能性があることが示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Clinical Cancer Research 14(4): 1266-1273, 2008