

EGFR を標的とした分子標的治療と放射線併用療法のための基盤研究： 食道癌細胞における EGFR の放射線照射による活性化と変異体の検出

浦島哲郎、秋澤 慈、松原久裕、落合武徳

千葉大学大学院医学研究院 先端応用外科学

要 旨

(目的) ヒト癌種の中で、食道癌では EGF-EGFR 経路が腫瘍増殖に重要な働きをしていることはよく知られている。近年 EGFR をターゲットとした分子標的治療が臨床応用されつつあり、我々は食道癌に対する集学的治療への分子標的治療の応用を目指している。今回、EGFR の活性化のメカニズムを明らかにするために、放射線照射後に誘導される EGFR の活性化を検討し、さらに Glioblastoma で悪性度とも関連して最も頻度が高いとされている EGFR の splicing variant である EGFR variant III の検出を試みた。

(方法及び結果) ヒト食道癌細胞株 TE2, TE3, TE5, TE8, T.Tn, とヒト頭頸部癌細胞株 A431 を用いた。TE2 と TE8 及び A431 を用いて、EGF 投与、及び X 線照射後の EGFR の活性化をリン酸化された EGFR に対する抗体を用いて蛍光免疫組織法、及びウェスタン法で検出した。EGF 暴露後 (100ng/ml, 6h) に A431 では活性化が増強したが、TE2 と TE8 では増強しなかった。よってこれらの細胞増殖では、外来性の EGF によらず、オートクラインメカニズムによる EGFR の活性化が示唆された。X 線照射後 (4Gy)、3 者において照射後 1 時間以内に EGFR のリン酸化が増強された。EGFR variant III の検出は欠失した exon2 から 7 をスパンする形でプライマーを設定し、RT-PCR 法で検出し、5 例中 3 例から検出された。

(考察) EGFR の活性化は放射線照射後の食道癌細胞の生存に適応的な反応であると考えられ、照射後の EGFR の抑制が抗腫瘍効果の増強に繋がる可能性がある。さらに食道癌細胞で EGFR variant III が検出されたことは、この変異が食道癌においても悪性度の獲得において重要な働きをしており、EGFR をターゲットとした分子標的治療では考慮すべきと考えられた。

序 論

近年食道癌の治療成績は手術、補助療法の洗練化により改善しつつあるが、全国食道癌登録調査報告書によれば、全体の 5 年生存率は 36.1% で、Stage 別の 5 年生存率は Stage 0, I, IIA, IIB, III, IVA はそれぞれ、70.2%, 64.5%, 51.5%, 34.0%, 19.8%, 13.7% と未だに予後不良である (1)。現在、高度進行例についてはシスプラチン + 5-Fu の化学療法との放射線併用療法がファーストラインであり、高い Complete Response への導入率が報告されているが (2-11)、長期生存への寄与は明らかでなく (3-6,8,10-12)、また治療に伴う副作用も数多く経験され、より有効で、かつ、生体に対して低毒性の補助療法の出現が待たれている。近年、EGFR スーパーファミリーをターゲットとした分子標的治療薬の開発と臨床応用がなされるに及んで、我々はこれらの分子標的治療薬を放射線治療の感受性増強剤として臨床応用する目的で

基盤研究を行っている。

表 1 に示すように癌腫により EGFR の発現は異なるが、食道癌での EGFR の関与については 同じ扁平上皮癌である頭頸部癌に次いで、EGFR の腫瘍での発現率は 74 から 88% と非常に高いこと (13,14)、頭頸部癌では EGFR の発現が治療感受性に関連していることが報告されていることから (20)、我々は食道癌に対して EGFR の発現、または活性化を modulate することが有効な癌治療に結びつくと考えている。

Schmidt らは、頭頸部癌から establish した cell line を用いて、放射線照射直後に EGFR のリン酸化が enhance されることを報告し、EGFR の活性化が放射線照射後の細胞の生存に適応的な反応であることを示唆している (15)。

このようなストラテジーに立って、EGFR を標的とした放射線感受性増強効果が食道癌に対する治療へ応用可

能かを検討する。

さらに近年、EGFRは種々の変異を伴うことが報告されており(16-18)、モノクローナル抗体の抗腫瘍療法を検討する場合、これらの変異を考慮する必要がある。Glioblastomaでの変異が最初に報告され、最も頻度が高いとされているものが、extracellular segmentの一部にあたる exon2 から 7 を splicing の過程で欠失した EGFR variant III で(17)、この変異により、リガンドの結合なく、チロシン残基の autophosphorylation が誘導され、逸脱した細胞増殖が誘導され(20)、より高い悪性を獲得することが報告されている(19)。我々は食道癌細胞株で EGFR variant III の検出を試みた。

方法と結果

MATERIALS

食道癌細胞株については東北大学加齢研究所の協力を得て、16種の細胞株(TE1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, そして T.Tn)を入手した。これらはインキュベーターの中で(5% CO₂, 37°C)、DMEM及びRPMI1640、15% FCSの培養液を用いて培養された。

1. X線照射による EGFR RNA の発現レベル

食道癌細胞株、TE2, TE6, TE8 及び T.Tn の X線照射前後(2, 4, 10Gy)の total RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA に変換後、EGFR の intracellular segment exon にプライマーを設定し(図 1-A)、RT-PCR 法による RNA の発現レベルの検索を行った。いずれの cell line においても X線照射前後での RNA レベルでの発現の変化はみとめられなかった(図 2)。

2. immunoblotting による X線照射の前後での EGFR の発現の比較

食道癌細胞株、TE2, TE6, TE8 及び T.Tn の X線照射前後(2, 4, 10Gy)で蛋白を抽出し、各々 40µg を SDS-PAGE にて一次抗体は EGFR の extracellular segment を認識する抗体を用いて immunoblotting を行った。X線照射前後で EGFR そのものの発現の変化は認められなかった (figure not shown)。

3. 蛍光免疫色素法による X線照射の前後での活性化型 EGFR の検出

リン酸化された EGFR に対する抗体に FITC を conjugate した fluorescence を用いた immunofluorescent study を行った。食道癌細胞株 TE2 に X

線 4Gy を照射して 15 分後、細胞全体に強いシグナルが認められた。照射後 1 時間では細胞の ballooning も相俟ってシグナルは減弱していくが、照射後の極めて短時間のうちに EGFR の活性化が誘導されることが示された(図 3)。

4. immunoblotting による X線照射の前後での活性化型 EGFR の検出

食道癌細胞株、TE2, TE6, TE8 及び T.Tn を 80-90% confluent な状態で、X線照射無試行例、及び 2Gy 照射したサンプルより蛋白を抽出し、各々 40µg を SDS-PAGE にて一次抗体は活性化型のリン酸化 EGFR を認識する抗体を用いて immunoblotting を行った。

TE2 において、X線照射により活性化型のリン酸化 EGFR の発現が増強することが示された(図 4)。

5. EGFR variant III の食道癌細胞株での検出

Glioblastoma での変異が最初に報告され、最も頻度が高いとされているものが、extracellular segment の一部にあたる exon2 から 7 を splicing の過程で欠失した EGFR variant III であり食道癌細胞株、TE2, TE3, TE5, TE8 そして T.Tn でこれらの変異を検索した。delete した exon2 から 7 をスパンする形でプライマーを設定し(図 1-B)、RT-PCR 法で 変異した RNA の発現を検索したところ、図 5 に示すように、5 例中 3 例から検出され、Glioblastoma のみならず、食道癌においても EGFR variant III が悪性度の獲得において重要な働きをしていることが示唆された。食道癌の EGFR を標的とした抗腫瘍療法ではこれらの変異も考慮する必要があると考えられた。

考 察

近年、EGFR を標的とした分子標的治療薬が臨床応用され、Cetuximab については Phase III のスタディで頭頸部癌に対する良好な成績が報告され、現在、大腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌にも適応拡大されつつある(14,22,23)。基礎的データでは放射線との併用でアポトーシスの誘導により、より抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされた(24-26)。リン酸化阻害剤である ZD1839(27)についても非小細胞肺癌では現在セカンドラインの化学療法であり、前立腺癌、乳癌へと対象も広がりがつつある。食道扁平上皮癌については 現在、大がかりなプロトコールスタディとして報告されているものはないが、解剖学的、組織学的発生および発ガンのリ

クファクターが類似した頭頸部癌と同様に、高いレスポンスが期待される。現在、進行食道癌に対する治療はシスプラチン、5-Fuを併用した放射線化学療法が主体であるが(2-12)、より効果的な治療法の開発を目的として、これらの分子標的治療薬の有用性を検証するために、EGFRの放射線照射に伴う修飾、及び変異体の解析を行っている。

EGFRスーパーファミリーは膜貫通型のレセプターファミリーであり、EGFR, HER2, HER3, HER4から構成され、EGFRのリガンドとしてはEGF及びTGF- α が明らかにされている。EGFRはextracellular segment, transmembraneそしてintracellular segmentから構成される、170kDの蛋白質であり、そのシグナル伝達経路はリガンドの結合によりinitiateされ、EGFR同士、及び他のファミリーメンバーとのdimerization, trimerizationを通して、チロシン残基のリン酸化により活性化される。活性化されたEGFRはMAPK, STAT, PI3Kを初めとしたcandidateを活性化し、細胞増殖、アポトーシスの抑制、及び腫瘍血管の増生に至ることが明らかにされている(28)。

Schmidtらは、頭頸部癌のcell lineを用いて、放射線照射直後にEGFRのリン酸化がenhanceされることを報告し、EGFRの活性化が放射線照射後の細胞の生存に適応的な反応であるとしたが(15)、我々の検討でも同様の反応は食道癌細胞株、TE2において蛍光免疫色素法とウェスタンブロッティングで確認された。すなわち、蛍光免疫色素法では照射後短時間に細胞膜を中心に細胞質にもびまん性にリン酸化のシグナルが検出され、ウェスタンブロッティングでも照射に伴い、活性化されたリン酸化型EGFRの発現が増強することが確認された。X線照射の前後で抽出したRNAを用いたRT-PCRでは

4つのcell lineでEGFRのRNAレベルでの発現は変化を認めず、また照射の前後でEGFRの発現を比較しても差がなかったことから、放射線照射はEGFRそのものの発現の増強をもたらすのではなく、リン酸化による修飾によりEGFRの活性化を惹起することが明らかとなった。

これらの結果から、食道癌においてもEGFRの活性化が放射線照射後の細胞の生存に適応的な反応であることが示唆された。すなわち、食道癌に対する治療として、放射線療法にEGFRの活性化をmodulateする分子標的治療を併用することは合理的であると考えられる。

一方、EGFRは種々の変異を伴うことが報告されており、その中で最も精力的に検索されたものが、Glioblastomaでの変異が最初に報告されたEGFR variant IIIである。EGFR variant IIIはextracellular segmentの一部にあたるexon2から7をsplicingの過程で欠失したsplicing variantであり、この変異に伴い、ligandの結合なく、EGFRのautophosphorylationがなされることが報告されている(20)。Glioblastomaでは約30%の頻度でEGFR variant IIIは検出され、予後不良因子であることが報告されており(19)、我々は食道癌細胞株、TE2, TE3, TE5, TE8そしてT.Tnでこれらの変異を検索したところ、5例中3例からEGFR variant IIIは検出され、Glioblastomaのみならず、食道癌においてもEGFR variant IIIが悪性度の獲得において重要な働きをしていることが示唆された。食道癌のEGFRを標的とした抗腫瘍療法を行う場合、モノクローナル抗体ではEGFR variant IIIを有する症例に対して有効性は期待できない。現在、臨床例の解析を進めている段階であるが、分子標的治療薬を臨床応用する場合、これらの変異も考慮する必要があると考えられた。

図 1 - A

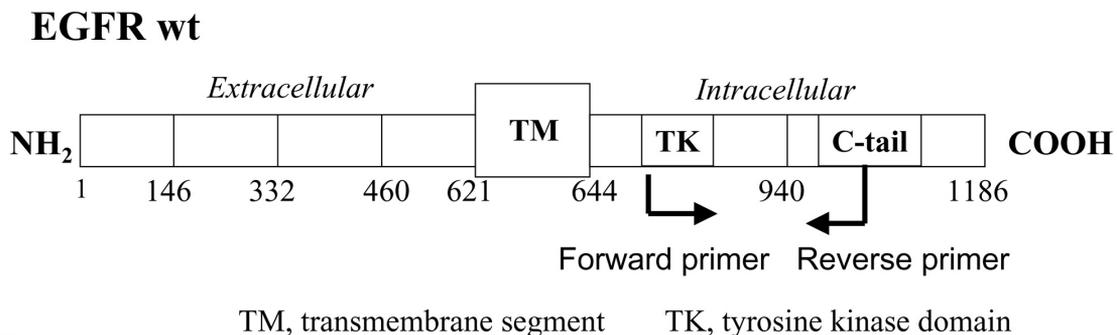


図 1 - B

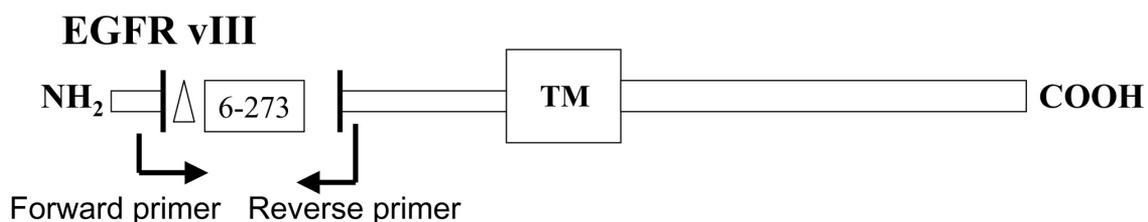


図 1. EGFRvIII : Mutational variant form of EGFR (上 図 1-A, 下 図 1-B)

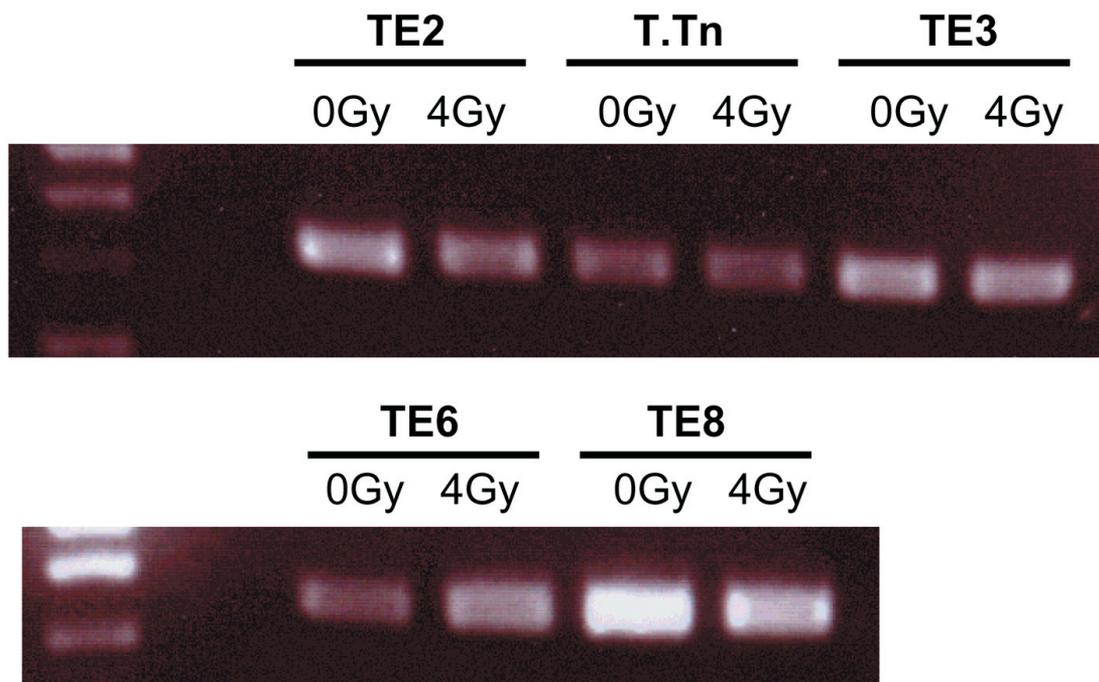


図 2. X線照射に伴う EGFR RNA の発現レベルの変化

TE2, TE3, TE6, TE8 及び T.Tn の X線照射前後 (4Gy) の total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、EGFR RNA の発現レベルの検索を行ったところ、いずれの cell line においても X線照射前後での RNA レベルでの発現の変化はみとめられなかった。

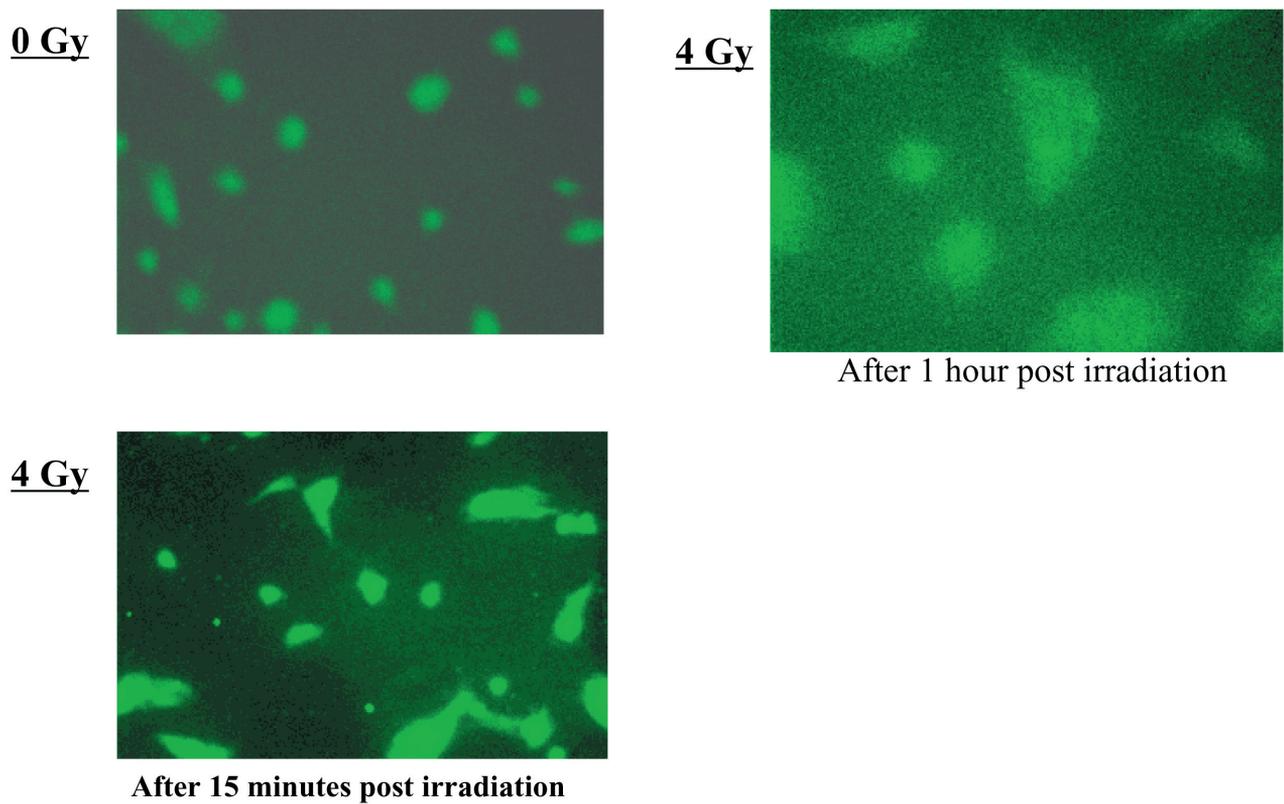


図 3. 蛍光免疫色素法による X 線照射の前後での活性化型 EGFR の検出
TE2 に X 線 4Gy を照射して 15 分後、細胞全体に強いシグナルが認められた。照射後 1 時間では細胞の ballooning も相俟ってシグナルは減弱していく。

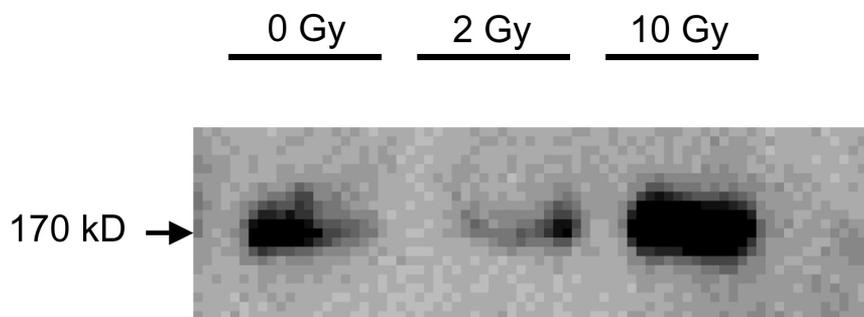


図 4. Immunoblotting による X 線照射の前後での活性化型 EGFR の検出
TE2 の 80-90% confluent な状態で、X 線照射無試行例、及び 2Gy、10Gy を照射したサンプルより蛋白を抽出し、各々 40 μ g を SDS-PAGE にて一次抗体は活性化型のリン酸化 EGFR を認識する抗体を用いて immunoblotting を行ったところ、10 Gy の照射後、活性化型のリン酸化 EGFR の発現が増強することが示された。

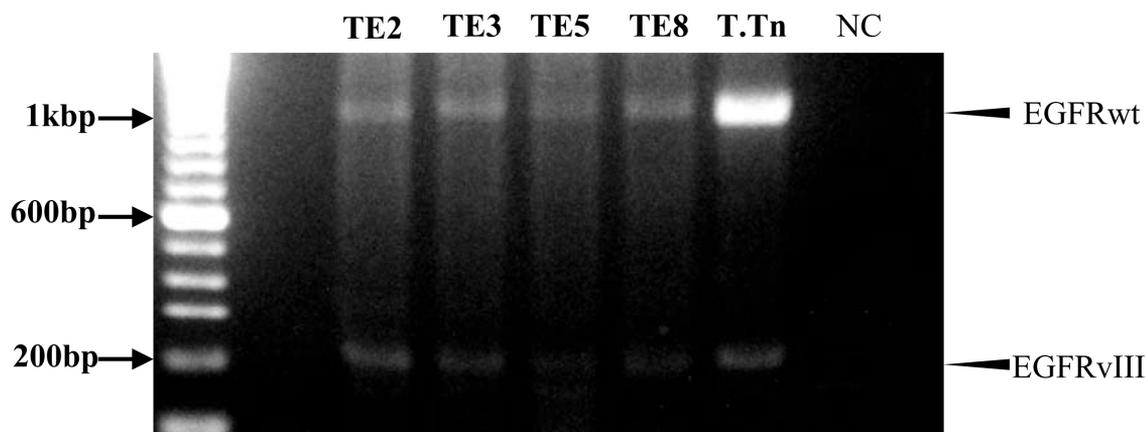


図 5. EGFR variant III の食道癌細胞株での検出

delete した exon2 から 7 をスパンする形でプライマーを設定し (図 1-B)、RT-PCR 法で変異した RNA の発現を検索したところ、図 5 に示すように、truncate した splicing variant (size: 190 bp) が 5 例中 3 例から検出された。(NC : negative control)

表 1. Frequencies of EGFR Expression in Various Type of Cancer

Tumor type	Range of tumors expressing EGFR (%)
Head and neck	80-100
Colorectal	25-77
Pancreatic	30-50
Lung	40-80
<i>Esophageal</i>	74-88
Renal Cell	50-90
Prostate	40-80
Cervical	54-74
Bladder	53-72
Ovarian	35-70
Breast	14-91
Glioblastoma	40-50

(Laskin & Sandler, CANCER TREATMENT REVIEWS,2004:30;1-17)

文 献

1. The Japan Society for Esophageal Disease. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan (1998, 1999) and long-term results of esophagectomy in Japan (1988-1997) 3rd Edition.
2. Seitz JF, Milan C, Giovannini M, Dumas F, Cauvin JM, Conroy T, Francois E, Renard P, Votte-Lambert A, Paillot B and Bedenne L. Concurrent concentrated chemoradiation therapy in squamous cell carcinoma of the esophagus: long term results of a national multicenter phase II study in 122 inoperable patients. *Gastroenterol Clin Biol.* 24(2 BIS): 201-10, 2000.
3. Heitmiller RF, Forastiere AA, Kleinberg L and Zahurak M. Neoadjuvant chemoradiation followed by surgery for respectable esophageal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 155: 97-104, 2000.
4. Heath EI, Burtness BA, Heitmiller RF, Salem R, Kleinberg L, Knisely JP, Yang SC, Talamini MA, Kaufman HS, Canto MI, Topazian M, Wu TT, Olukayode K and Forastiere AA. Phase II evaluation of preoperative chemoradiation and postoperative adjuvant chemotherapy for squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol.* 18(4): 868-76, 2000.
5. Bédard ELR, Inculet RI, Malthaner RA, Brecevic E, Vincent M and Dar R. The role of surgery and postoperative chemoradiation therapy in patients with lymph node positive esophageal carcinoma. *Cancer.* 91: 2423-2430, 2001.
6. Nemoto K, Ogawa Y, Matsushita H, Takeda K, Takahashi C, Saito H, Takai Y, Yamada S and Hosoi Y. A pilot study of radiation therapy combined with daily low-dose cisplatin for esophageal cancer. *Oncol Rep.* 8(4): 785-9, 2001.
7. Slater MS, Holland J, Faigel DO, Sheppard BC and Deveney CW. Does neoadjuvant chemoradiation downstage esophageal carcinoma? *Am J Surg.* 181(5): 440-4, 2001.
8. Boyle MJ, Franceschi D, Robinson DS and Livingstone AS. Neoadjuvant therapy for esophageal cancer: standard of care or elusive myth? *Am Surg.* 67(10): 956-65, 2001.
9. Frechette E, Buck DA, Kaplan BJ, Chung TD, Shaw JE, Kachnic LA and Neifeld JP. Esophageal cancer: outcomes of surgery, neoadjuvant chemotherapy, and three-dimension conformal radiotherapy. *J Surg Oncol.* 87(2): 68-74, 2004.
10. Stahl M, Wilke H, Stuschke M, Walz MK, Fink U, Molls M, Siewert JR, Schroeder M, Makoski HB, Schmidt U, Seeber S and Vanhoefer U. Clinical response to induction chemotherapy predicts local control and long-term survival in multimodal treatment of patients with locally advanced esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131(1): 67-72, 2004.
11. Vita FD, Martino ND, Orditura M, Cosenza A, Galizia G, Genio AD and Catalano G. Preoperative chemotherapy for squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus. A phase II study. *Chest.* 122: 1302-1308, 2002.
12. Malthaner RA, Wong RKS, Rumble RB, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for respectable esophageal cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2004, 24(1): 67.
13. Friess H, Fukuda A, Tang W-H, Eichenberger A, Furlan N, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW. Concomitant analysis of the Epidermal Growth Factor Receptor family in esophageal cancer: overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. *World J Surg.* 23: 1010-1018, 1999.
14. Laskin JJ and Sandler A. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews.* 30: 1-17, 2004.
15. Schmidt-Ullrich RK, Valerie K, Fogelman B and Walters J. Radiation-induced autophosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiation Research,* 145: 81-85, 1996.
16. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD and Collins

- VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastoma reveal deletions of sequence encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 4309-4313, 1992.
17. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez GG, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL and Wong AJ. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Research*. 55: 5536-5539, 1995.
 18. Kuan C-T, Wilkstrand CJ and Binger DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocrine-related cancer*. 8: 83-96, 2001.
 19. Shiojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishumura Y and Ushio Y. Prognostic value of Epidermal Growth Factor Receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research*. 63: 6962-6970, 2003.
 20. Lai A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH and Riggins GJ. Mutant Epidermal Growth Factor Receptor up-regulates molecular effect of tumor invasion. *Cancer Research*. 62: 3335-3339, 2002.
 21. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J and Overgaard J. The prognostic value of Epidermal Growth Factor Receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 58(2): 561-566, 2004.
 22. Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, Buchsbaum DJ, Saleh MN, Stackhouse MA, LoBuglio AF, Peters GE, Carrol WR and Waksal HW. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 18: 47-53, 2000.
 23. Sridhar S, Seymour L and Shepherd FA. Inhibitors of Epidermal-Growth-Factor Receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 4: 397-406, 2003.
 24. Milas L, Mason K, Hunter N, Peterse S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J and Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clinical Cancer Research*. 6: 701-708, 2000.
 25. Huang S-M and Harari PM. Modulation of radiation response after Epidermal Growth Factor Receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clinical Cancer Research*. 6: 2166-2174, 2000.
 26. Nasu S, Ang, KK, Fan Z and Milas L. C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 51(2): 474-477, 2001.
 27. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Baker AJ and Gibson KH. ZD1839 (Iressa) : an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Research*, 62: 5749-5754, 2002.
 28. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW and Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanism of activation and signaling. *Experimental Cell Research*. 284: 31-53, 2003.