

0812 EGFR-TK イメージング剤 ^{125}I -IPHY の遺伝子変異による クリアランスの違い

南 貴司

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：上皮成長因子チロシンキナーゼ (EGFR-TK) 阻害剤であるゲフィチニブは、非小細胞肺癌治療薬として承認された分子標的薬剤であり、EGFR-TK に遺伝子変異を有する腫瘍に対し劇的な治療効果を示す一方で、急性肺障害・間質性肺炎等の重篤な副作用を示すことから、ゲフィチニブの感受性を予測することは临床上重要である。本研究では、EGFR-TK イメージング剤 4-(3- ^{125}I -iodo-phenoxy)-6,7-diethoxyquinazoline (^{125}I -IPHY) を用いて、ゲフィチニブの感受性予測の可能性を検討した。実験には、EGFR-TK 遺伝子変異型を含むヒト肺癌細胞を用いた。細胞からのクリアランス後の残存量が EGFR-TK への結合を示すことを期待し、各細胞に ^{125}I -IPHY を 120 分間取り込ませた後、トレーサの含まない培地に交換して、一定時間インキュベートし、 ^{125}I -IPHY のクリアランスを検討した。

3 細胞系では、細胞内からの速やかなクリアランスが確認された。培地交換 30 分後では、40~50%の放射能が滞留していた。一方、他の 1 細胞系は、比較的緩やかなクリアランスを示し、培地交換 30 分後で、60%の放射能が滞留していた。しかしながら、120 分後においては全ての細胞において集積した放射能の 20~30% しか滞留しておらず、遺伝子変異による滞留性の違いは確認できなかった。早期における細胞内からの放射能のクリアランスには、EGFR-TK に結合していない ^{125}I -IPHY が大きく寄与していると考えられた。今後、更に長時間後の細胞内滞留性を観察することにより、遺伝子変異の違いを評価できる可能性が推測される。

I. はじめに

ゲフィチニブ (イレッサ[®]) は、EGFR-TK の ATP 結合部位に特異的に結合し、EGFR-TK のリン酸化を阻害する上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ (Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase; EGFR-TK) 阻害剤である¹⁾。ゲフィチニブは 2002 年 7 月に手術不能または再発非小細胞肺癌に対し世界に先駆けて日本で承認された分子標的薬剤である。非小細胞肺癌は全肺癌の 80% 以上を占め、従来の化学療法では奏効率が低いことから、ゲフィチニブに大きな期待が寄せられていた。ゲフィチニブは投与後早期から劇的な治療効果を示す一方、急性肺障害や間質性肺炎などの重篤な副作用が注目された²⁻³⁾。ゲフィチニブは、非喫煙者、腺癌、女性、東洋人において良好な治療効果を示す傾向が見られた。近年、EGFR-TK ドメインにおける遺伝子変異とゲフィチニブ感受性との関連が報告されており⁴⁻⁶⁾、遺伝子変異がゲフィチニブ感受性予測因子の一つとして注目されている。そこで、本研究では EGFR-TK イメージング剤によるゲフィチニブの感受性予測を目的として、肺癌細胞の遺伝子変異による ^{125}I -IPHY のクリアランスの違いを観察した。

本検討で用いたヒト肺癌細胞は A549, H1650, H1975, H3255 の 4 種で、これらには遺伝子変異型が含まれている。また、各細胞のゲフィチニブ感受性や EGFR の発現量に差があることはこ

れまでの報告や当研究室の実験により判明されている。

Table.1 ヒト肺癌細胞の遺伝子変異型, EGFR 発現量及びゲフィチニブ感受性

肺癌細胞	遺伝子変異型	EGFR 発現量	ゲフィチニブ感受性
A549	無(Wild type)	少	低
H1650	有(del E746-A750)	少	低 (変異型は高)
H1975	有(L858R+T790M)	少	低
H3255	有(L858R)	多	高

ヒト肺癌細胞の遺伝子変異型, EGFR 発現量, ゲフィチニブ感受性を Table.1 にまとめた. A549 は遺伝子変異を有していない野生型の EGFR を有している肺癌細胞である. H1650 はゲフィチニブ高感受性を示すことが報告されている欠損型遺伝子変異を有する⁴⁾が, 増殖シグナル伝達の経路である EGFR が優位でないため, 低感受性を示す. H1975 は 858 番目のロイシンがアルギニン, さらに 790 番スレオニンがメチオニンに変異し, ゲフィチニブ抵抗性を示すことが知られている⁵⁾. H3255 は 858 番ロイシンがアルギニンになっており, EGFR 発現量も多く, ゲフィチニブ高感受性を示す⁶⁾. ¹²⁵I-IPHY は EGFR-TK 阻害剤であるゲフィチニブや PD153035 と類似した化学構造を有することから, ¹²⁵I-IPHY のヒト肺癌細胞に対する親和性の違いがゲフィチニブ感受性予測因子である遺伝子変異の違いを示すと予測される. そこで, 本研究では遺伝子変異の違いが ¹²⁵I-IPHY のクリアランスに与える影響について検討を行った.

II. 実験

A) 実験材料と方法

4 種類の異なった遺伝子変異型を持つヒト肺癌細胞 (A549; wild type, H1650; del E746-A750, H1975; L858R+T790M, H3255; L858R) を播き, A549 の培地は 4.5g/L グルコースを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) +10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), H3255 は Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12Ham (DMEM/F12) +20% FBS, H1650, H1975 は RPMI (Sigma) +10%FBS を培養液として, 5%CO₂, 37°Cの条件下で培養した. 各細胞を細胞数 1.0×10^5 個/500 μ L/well になるように 24well プレート(Falcon) に播き, 24 時間インキュベートして細胞を定着させた. 実験培地として, 0.01%Tween 80 を含んだ RPMI (RPMI-T)を使用した. トレーサとして, EGFR-TK イメージング剤としての利用が期待される 4-(3-¹²⁵I-iodo-phenoxy)-6,7-diethoxyquinazoline (¹²⁵I-IPHY) を RPMI-T に加え, 1.0×10^6 cpm/500 μ Lになるよう調整したもの (¹²⁵I-RPMI/T) を準備した.

24 時間後, 培地を吸引し, ¹²⁵I-RPMI/T を 500 μ L加え, 2 時間インキュベートした. ¹²⁵I-RPMI/T を吸引した後, コントロール用として, 0.01%Tween 80 を含んだ phosphate-buffered saline (PBS/T) 500 μ L で細胞を 2 回洗った. クリアランス観察用として, PBS-T 1mL で 1 回洗浄した後, RPMI-T を 500 μ L加え, さらに, 5, 15, 30, 60, 120 分間インキュベートした. RPMI-T を除去し, PBS-T

500 μ Lで細胞を2回洗浄した後,トリプシンを200 μ L加え,細胞数を計測するとともに放射能をオートウェルガンマカウンタ (Aloka:ARC-1000M)にて測定した.

得られた放射能を細胞数 1.0×10^4 個当たりの放射能 (cpm/ 10^4 cells)として算出し,コントロール群を100%として各タイムコースでの相対値を求めた.

B) 結果と考察

ヒト肺癌細胞(A549, H1650, H1975, H3255) における細胞集積の相対値の経時的变化を Fig.1 に示す.

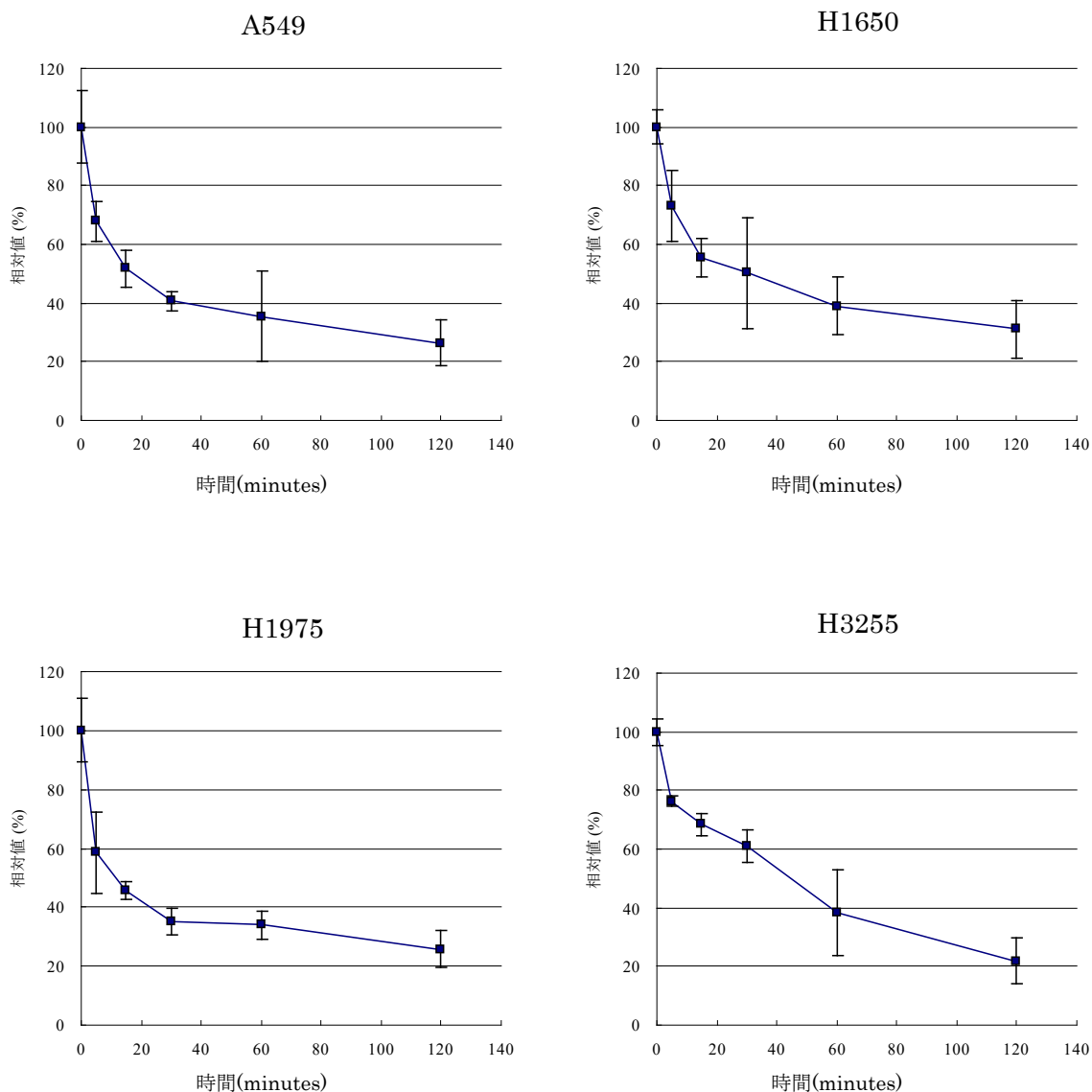


Fig.1 細胞集積の相対値の経時的变化

A549, H1650, H1975 の3細胞系において, 125 I-IPHYの細胞内残留量は培地交換30分後の早期において50%以下となっており, 速やかなクリアランスが観察された. 一方, H3255では培地交換30分後においても60%の放射能の滞留が確認され, 緩やかなクリアランスを示すことが認められた.

H3255 は 4 種の肺癌細胞のうち最も EGFR 発現量が多く、また、ゲフィチニブ感受性も高いことから、ゲフィチニブ等の EGFR-TK 阻害剤との親和性が高く、その結果、¹²⁵I-IPHY が緩やかなクリアランスを示したと考えられた。H1650 もゲフィチニブ高感受性の遺伝子変異を有しており、A549, H1975 に比べ僅かに高い滞留性を示した。しかし、H3255 と比較して A549, H1650, H1975 は EGFR 発現量が非常に少ないため、A549, H1650, H1975 では早期のクリアランスにおいて大きな差が見られず、同程度のクリアランスを示したと考えられた。

早期における細胞内からのクリアランスでは、ゲフィチニブ感受性とは相関が見られるが、EGFR 発現量による ¹²⁵I-IPHY 結合量の差による影響が顕著となり、変異の違いを反映するクリアランスは観察されなかった。

培地交換して 120 分後の後期においては、全ての細胞において集積した放射能の 20~30%の放射能しか滞留しておらず、遺伝子変異による滞留性の違いは確認できなかった。

今回の実験では観察時間を 120 分までとしていたが、実験時間内での ¹²⁵I-IPHY のクリアランスによる遺伝子変異の同定及び感受性予測は困難であることが判明した。今後、クリアランス時間を延長し、長時間後の細胞内滞留性を観察することによって、わずかな EGFR 発現量の差や遺伝子変異の違いを評価できると考えられた。

III. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導・ご鞭撻いただいた川井恵一教授、吉本光喜助教、ご協力いただいた本研究室のかたがたに心より感謝申し上げます。

IV. 参考文献

- 1) Baselga J, Averbunch SD. ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. *Drugs*. 60; 33-40: 2000.
- 2) 厚生労働省医薬食品局. イレッサ錠 250 プロスペクティブ調査 (特別調査) 調査報告書について. *医薬品・医療用具等安全性情報*. 206; 1-2: 2004.
- 3) アストラゼネカ社. 非小細胞肺癌患者におけるゲフィチニブ投与及び非投与での急性肺障害・間質性肺炎の相対リスク及び危険因子を検討するためのコホート内ケースコントロールスタディ. *結果報告書*. 2; 2-3: 2006.
- 4) Janmaat ML, Rodriguez JA, Gallegos-Ruiz M, Kruyt FA, Giaccone G. Enhanced cytotoxicity induced by gefitinib and specific inhibitors of the Ras or phosphatidyl inositol-3 kinase path ways in non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer*. 118; 209-214: 2006.
- 5) Yu Z, Boqqon TJ, Kobayashi S, Jin C, Ma PC, Dowlati A, Kern JA, Tenen DG, Halmos B. Resistance to an irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor in EGFR-mutant lung cancer reveals novel treatment strategies. *Cancer Res*. 67; 10417-10427: 2007.
- 6) Tracy S, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE, Janne PA. Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res*. 64; 7241-7244: 2004.