

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

Napapat Amornwichet 印

## 【学位論文のタイトル】

The *EGFR* mutation status affects the relative biological effectiveness of carbon-ion beams  
in non-small cell lung carcinoma cells

(非小細胞肺癌の*EGFR*変異の有無は炭素イオン線の生物学的効果比に影響する)

## 【学位論文の要旨】

〈背景と目的〉

切除不能な局所進行非小細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma: NSCLC)に対する標準治療は化学療法併用X線治療であるが、その予後は悪く、有効な治療法の確立が求められている。炭素イオン線治療は、これまでに複数のX線抵抗性がんを対象とした第III相臨床試験において良好な抗腫瘍効果を示していることから、局所進行NSCLCに対しても有効な治療法となることが期待されている。一方、炭素イオン線治療は極めて限られた医療資源であることから、同治療による利益の大きい症例群の抽出が肝要である。しかし、炭素イオン線治療の反応性を規定する生物学的因子については、ほとんど未解明である。以上から本研究では、NSCLCにおいて高頻度に認められる*EGFR*および*KRAS*遺伝子変異に着目し、癌細胞における変異ステータスとX線ならびに炭素イオン線感受性との関連を培養細胞実験系で解析した。

〈材料と方法〉

本研究には、以下(i)~(iii)のヒトNSCLC細胞株を用いた。(i)*EGFR*変異を有するH1650、H1975、HCC827、Ma-24、PC9、II-18。(ii)*KRAS*変異を有するA427、A549、H157、H460、*EGFR/KRAS*野生型NSCLC細胞株H520、H522、H1299、H1703、LK2。(iii)野生型*EGFR*、 $\Delta$ 746-750欠失変異型*EGFR*、L858R点突然変異型*EGFR*のいずれかを過剰発現するA549。

X線 (100 kVp, 1.14 Gy/min)または炭素イオン線 (290 MeV/nucleon, 6 cm-spread-out Bragg peak 中心、平均linear energy transfer約50 keV/ $\mu$ m)照射後の細胞生残率をコロニー形成法で算出した。細胞生残率をlinear quadratic modelに近似し、細胞生残率10%を与える線量 ( $D_{10}$ )を算出した。各細胞株についてX線の $D_{10}$ を炭素イオン線の $D_{10}$ で除し、炭素イオン線のrelative biological effectiveness (RBE)を算出した。X線または炭素イオン線照射により誘導されるDNA二重鎖切断 (DNA double-strand break: DSB)の修復能を、DSBマーカーであるSer-139リン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ H2AX) foci数で評価した。細胞を照射24時間後に $\gamma$ H2AXで蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡観察下にfoci数を定量した。非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ)活性の阻害目的に、NHEJ必須因子であるDNA protein kinase catalytic subunitの阻害剤NU7441 (10  $\mu$ M)を使用した。統計解析にはSigmaPlot 12.0ソフトウェアを使用した。

## 〈結果〉

X線照射における $D_{10}$ 平均値はEGFR変異型細胞株において4.7、EGFR野生型細胞株において6.9であり、EGFR変異型細胞株はEGFR野生型細胞株よりX線に高感受性を示した。一方、炭素イオン線はEGFR変異ステイタスに関わらず全ての細胞株でX線より高い殺細胞効果を示した。その結果、EGFR変異型細胞株のRBEはEGFR野生型細胞株と比較して有意に低値であった。変異型EGFR発現A549細胞は野生型EGFR発現A549細胞株と比較して有意なX線高感受性およびRBE低値を示した。一方、KRAS変異ステイタスによるX線感受性、炭素イオン線感受性およびRBEの差は認められなかった。

EGFR変異型細胞株H1650、HCC827、Ma-24におけるX線誘導DSBの修復能は、EGFR野生型細胞株H1299、H1703、A549のそれと比較して有意に低かった。X線照射EGFR変異型細胞株において、NU7441併用による $\gamma$ H2AX foci数の上乘せ効果は明らかでなかった。このことから、EGFR変異型細胞株ではDSB修復の主要経路のひとつであるNHEJの活性が低いことが示唆された。一方、上記6細胞株における $\gamma$ H2AX foci数でみた数炭素イオン線誘導DSBの修復能は、EGFR変異ステイタスに関わらず全ての細胞株においてX線誘導DSBの修復能より有意に低かった。

## 〈考察〉

本研究の結果から、NSCLCにおいて、(i)EGFR変異陽性症例はNHEJ活性が低く、X線高感受性と炭素イオン線RBE低値を示すこと、(ii)DSB修復の困難さが放射線治療の抗腫瘍効果に寄与し、炭素イオン線治療はX線治療と比較して癌細胞のDSB修復能の影響を受けにくいことが示唆された。これらのことから、「EGFR変異陰性」が炭素イオン線治療による利益の大きいNSCLC症例を抽出するためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

Torres-Rocaらは、コロニー形成法に基づいたX線感受性予測アルゴリズムが臨床における腫瘍のX線治療反応性を良く予測することを複数の癌種で報告した (Per Med 2012;9:547)。一方、本研究の論文発表直後にYagishitaらは、局所進行NSCLCにおいてEGFR変異陽性症例は変異陰性症例と比較して化学療法併用X線治療後の局所制御率が有意に優れていることを報告した (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015;91:140)。これらの知見から、「NSCLCにおいてEGFR変異陰性細胞は相対的にX線抵抗性かつRBE高値である」との本研究結果の臨床的妥当性が支持された。今後、EGFR変異ステイタスと炭素イオン線治療反応性の相関について、臨床症例での検討が必要と考えられた。

2348字 (2000字程度)