

令和元年5月10日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10268

研究課題名(和文) 肺癌抗癌剤治療におけるホルミシス抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of hormesis suppression therapy as a new class of anticancer drug for lung cancer

研究代表者

大橋 拓矢 (Ohashi, Takuya)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90644518

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)：増殖抑制効果のある治療では低用量で処置した場合、逆に増殖促進効果を示すことがあり、hormesisと呼ばれている。放射線や抗菌剤では一般的な事象として知られているが、抗癌剤治療においては知られていない。我々は、肺癌細胞株や手術検体を用いて抗癌剤のhormesisについて評価した。手術検体にしては組織培養法抗癌剤感受性試験(HDRA)を行い、数例でhormesisが認められた。HDRAは臨床相関が高いことが知られており、実臨床においても一定の割合でhormesisが起きていることが示唆された。抗癌剤の非奏効例においては逆に増殖促進が生じている可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤治療は最大耐容量での投与が推奨されている。しかし高齢者の多い肺癌患者においては止むなく減量が行われることが多い。増殖抑制効果のある治療では低用量で投与した場合、逆に増殖促進効果を示すことがあり、hormesisと呼ばれている。減量投与の可能性の高い疾患においては無視できない事象であるにも関わらず、抗癌剤においてはこれまで検討されていない。本研究では、各種抗癌剤のhormesis現象を定量化するとともに、関与する因子を同定することで、それを特異的に抑制して抗癌剤治療効果を増強させる標的分子を定め、全く新しいがん治療のシーズを見出す。

研究成果の概要(英文)：In the treatment of cancer, little is known about hormesis, growth stimulation at low doses and inhibition at higher doses, on cancer cell proliferation. We evaluated the hormetic dose-response relationships of anticancer agents for lung cancer. A549 lung cancer cell line showed a hormesis to anticancer agents in vitro. In addition, we evaluated hormetic dose-response relationship of anticancer agents using surgically resected specimens from non-small-cell lung cancer (NSCLC) or breast cancer patients on the basis of histoculture drug response assay (HDRA). Hormesis was observed in some cases. These specimens were thus resistant to the anticancer drugs because of the hormesis. HDRA is reliable to evaluate chemosensitivity, so we believe that hormesis occur in patients with malignant tumors. Tumor growth may be stimulated in patients who are resistant to anticancer agents.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：hormesis dose-response curve HDRA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人の悪性腫瘍死亡原因の一位を占める予後不良な疾患で、年間約7万人が死亡している。肺癌は高齢者が多いため副作用のために抗癌剤の減量や中止を余儀無くされる率が高く、十分な治療ができないことも予後不良の理由の一つであると考えられる。現在、抗癌剤治療は最大耐容量での治療が基本であり、安易な減量は患者の予後を却って悪化させると考えられている。

in vitro では同一の腫瘍に対して同時に複数濃度で抗癌剤を投与して反応を確認できる。一般に接触濃度が上昇するにつれて増殖抑制が強くなると考えられているが、実際は低濃度領域において逆に腫瘍増殖が促進される反応が存在する。これは hormesis 現象と呼ばれ、放射線、抗菌剤、除草剤等では一般的な事象として知られているが、抗癌剤については全く検討が行われていない。今回、我々は肺癌細胞株や手術検体を用いて抗癌剤の hormesis について評価した。当研究室ではこれまで組織培養法抗癌剤感受性試験 (HDRA) にて化学療法の最適化のための研究を行ってきており、手術検体についてはこの手法を用いて検討した。

### 2. 研究の目的

肺癌で使用される各種抗癌剤の hormesis 現象を定量化するとともに、関与する因子を同定することで、それを特異的に抑制して抗癌剤治療効果を増強させる標的分子を定め、全く新しいがん治療のシーズを見出す。

### 3. 研究の方法

#### 1) 各種抗癌剤における hormesis 現象の定量化

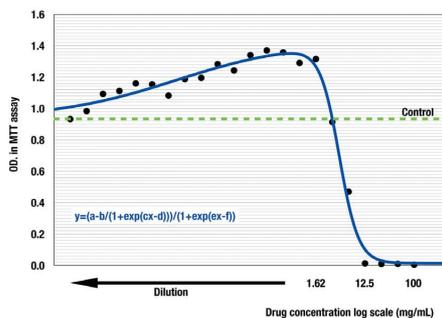
- ・ A549 肺癌細胞を用いる。
- ・ 96 well microplate を用いて、抗癌剤の希釈系列に接触させる。
- ・ 抗癌剤は gemcitabine、cisplatin、5-fluorouracil、paclitaxel、vinorelbine を使用する。
- ・ 一定時間の接触の後、MTT assay を行い、抗癌剤の量反応曲線を描く。
- ・ 抗癌剤の量反応曲線は、 $y = (a-b)/(1+\exp(c \cdot \log(x)-d)) / (1+\exp(e \cdot \log(x)-f))$  [a-b; control の腫瘍量, b; hormesis の maximal response, c; hormesis の slope factor, x; 抗癌剤濃度, hormesis の ED50= $\exp(d/c)$ , e; 抗腫瘍効果の slope factor, 抗腫瘍効果の ED50= $\exp(d/c)$ ] の回帰式が最も適合することが判明している。この式と hormesis を考慮しない回帰式  $y = a/(1+\exp(e \cdot \log(x)-f))$  の2式を非線形最小二乗法で fitting し、適合性を AIC で判定することで、hormesis の立証と定量化を行う。

#### 2) Hormesis の普遍性の確認

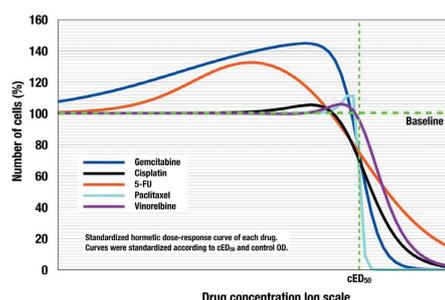
組織培養法抗癌剤感受性試験 (HDRA) を用いて、肺癌・乳癌の手術検体で同様の検討を行う。

### 4. 研究成果

1) A549 肺癌細胞を用いて gemcitabine の量反応曲線を求めた。実測データをプロットし、fitting すると2相性の曲線が描かれ、hormesis 現象が起こっていることがわかる。

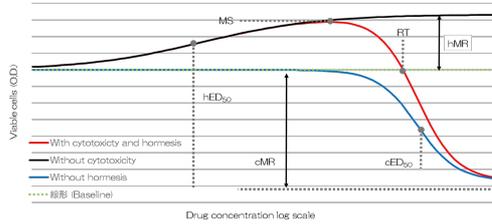


gemcitabine や 5-FU のように、抗腫瘍効果の ED50 に対して Hormesis の ED50 がより低濃度であり hormesis が強いものなど、抗癌剤により差はあるものの、全てにおいて hormesis 現象が認められた。



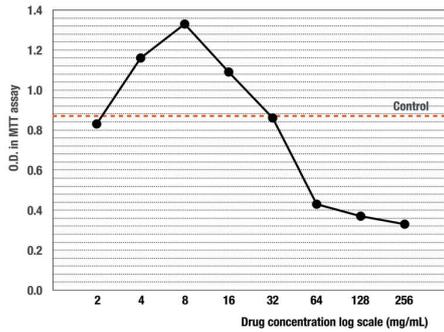
| Drugs          | hMR (%) | hED <sub>50</sub> (μg/ml) | cED <sub>50</sub> (μg/ml) | h/c ED <sub>50</sub> ratio (%) | RT (μg/ml) | MS (%) |
|----------------|---------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------|--------|
| Gemcitabine    | 52.5    | 4.32                      | 4350                      | 0.01                           | 3250       | 44.7   |
| Cisplatin      | 51.3    | 463                       | 1370                      | 33.8                           | 1040       | 5.4    |
| 5-Fluorouracil | 50.1    | 0.109                     | 47.8                      | 0.23                           | 57.7       | 32.5   |
| Paclitaxel     | 36.8    | 5.12                      | 44.9                      | 11.4                           | 13.9       | 11.2   |
| Vinorelbine    | 156.3   | 36.3                      | 70.9                      | 51.2                           | 80.3       | 5.9    |

[ 参考 ]



- ✓ hMR: Maximal response of hermetic reaction
- ✓ hED<sub>50</sub>: ED<sub>50</sub> of hermetic reaction
- ✓ cED<sub>50</sub>: ED<sub>50</sub> of cytotoxicity
- ✓ h/c ED<sub>50</sub> ratio: percentage of hED<sub>50</sub> against cED<sub>50</sub>
- ✓ RT: reduction threshold that means the drug concentration on "y=baseline"
- ✓ MS: maximum stimulation meaning the highest actual stimulation rate

2) HDRA を用いた手術検体での検討においても同様に、量反応曲線を描くと hormesis 現象が確認できた。



肺癌組織で hormesis が認められた頻度としては cisplatin 2.3% (7/307), 5-fluorouracil 6.2% (18/292), doxorubicin 4.3% (10/235), mitomycin-C 0.8% (2/260), etoposide 6.3% (16/253), irinotecan 11.6% (27/232), docetaxel 10.8% (18/167), paclitaxel 2.9% (2/68) and gemcitabine 8.8% (6/68) であった。

また、乳癌手術検体の paclitaxel に対する HDRA では、9/22 で hormesis が認められた。

【考察】

肺癌細胞株においても、組織検体においても、抗癌剤処置による hormesis 現象が確認された。HDRA は臨床相関が高いことが知られており、実臨床においても一定の割合で hormesis 現象が起きていると示唆され、抗癌剤の非奏効例においては逆に増殖促進が生じている可能性があると考えられた。

しかしながら、hormesis 発現機序を検索するために EMT 阻害剤の添加による効果を検証したが、hormesis の有意な減弱は認められず、key molecule の同定には及ばなかった。

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 1 件)

1. Yoshimasu T, Ohashi T, Oura S, Kokawa Y, Kawago M, Hirai Y, Miyasaka M, Nishiguchi H, Kawashima S, Yata Y, Honda M, Fujimoto T, Okamura Y  
A theoretical model for the hormetic dose-response curve for anticancer agents.  
Anticancer Research 35 2015.5851-5856

[ 学会発表 ] (計 2 件)

1. Yoshimasu T, Oura S, Kokawa Y, Kawago M, Miyasaka M, Ohashi T, Yata Y, Okamura Y  
Quantitative evaluation for hormetic reaction of anticancer agents for lung cancer  
The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery
2. Yoshimasu T, Oura S, Kawago M, Hirai Y, Miyasaka M, Ohashi T, Nishiguchi H, Yata Y, Honda M, Aoishi Y, Oku A, Fusamoto A, Nishimura Y  
Hormetic dose-response curve of cisplatin measured by histoculture drug response assay  
24<sup>th</sup> Asia Pacific Cancer Conference

〔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：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：村垣 泰光

ローマ字氏名：Muragaki Yasuteru

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40190904

研究分担者氏名：吉増 達也

ローマ字氏名：Yoshimasu Tatsuya

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60316099

研究分担者氏名：佐藤 冬樹

ローマ字氏名：Sato Fuyuki

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：60400131

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：