

令和元年6月24日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08423

研究課題名(和文) がん微小環境でのビスホスホネート薬の作用解析に基づく食道がん新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Enhancement mechanisms of cell growth suppression by bisphosphonates in cancer microenvironment

研究代表者

西口 工司 (NISHIGUCHI, KOHSHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80379437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制薬であるビスホスホネート薬物(BPs)が、食道がんに対する抗腫瘍効果を有し、がん微小環境の相違がその抗腫瘍効果に影響する可能性を見出した。そして、がん微小環境におけるBPsの作用機序について解析したところ、BPs及びスタチン系薬物は、低酸素環境下で細胞増殖抑制作用を増強すること、またこの増強作用は、HIF-1の蓄積に伴うHMG-CoA還元酵素発現量の減少に起因することが明らかになった。

本研究において得られた知見は、食道がん治療における薬剤の選択肢をひろげ、臨床現場におけるがん化学療法の奏効率向上に繋がる基礎的知見になるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、既存の化学療法に全く奏功しない、あるいは高い治療効果を望めない食道がん患者に対して、代替となる治療法あるいは治療薬の選択肢を広げるとともに、食道がんに対する新規治療標的を見出し得るといふ点で極めて重要な基礎的知見である。また、食道がんの治療成績向上のみならず、治療薬候補に乏しい食道がんの新規治療薬の開発に対して有益な情報を付与することから社会的意義は非常に大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Tumour hypoxia is a major obstacle in cancer therapy that leads to poor prognosis. Therefore, the development of cancer treatments that are effective in hypoxia is necessary. Bisphosphonates (BPs), which are used to treat bone disease, are cytotoxic to several cancer cells in normoxia.

In hypoxia, cell growth inhibition by BPs and via zoledronate-induced apoptosis was higher in hypoxia than that in normoxia. Furthermore, geranylgeraniol completely inhibited the growth inhibitory effects of zoledronate. Additionally, the mRNA and protein levels of HMG-CoA reductase significantly decreased in hypoxia. Moreover, simvastatin potentiated the growth inhibitory effect of zoledronate. The cytotoxicity of BPs is potentiated in hypoxia, through the loss of HMG-CoA reductase function. BPs may be effective against cancer in normoxia and hypoxia.

研究分野：臨床薬学、臨床薬剤学

キーワード：食道がん がん微小環境 低酸素 ビスホスホネート

## 1. 研究開始当初の背景

世界統計によると、最も頻発するがんは肺がんであり、新規患者数は124万人、死亡者数は110万人、罹患患者数は139万人にのぼる。新規患者数では、乳がん、大腸がん、胃がん、肝臓がんがこの順で続いている。食道がんの新規患者数は41.2万人、がん種別で第8位に位置するが、死亡者数は33.8万人で5番目に多い。初期の段階では自覚症状に乏しく、食道がんと診断された時には多くの場合に進行性であるとともに予後は不良であり、その罹患率には増加の傾向が認められている。本邦において食道がん患者に対する治療は、原発巣部位、病期、組織学的特徴、患者背景などを考慮して、外科的処置、放射線療法、化学療法、ならびに化学放射線療法から、あるいはそれらを組み合わせた治療戦略が決定されている。現在、食道がん患者に用いるがん化学療法の標準的レジメンとして、核酸代謝拮抗薬である5-fluorouracil (5-FU)と抗腫瘍性白金錯体であるcisplatin (CDDP)を組み合わせたFP療法が臨床治療に用いられている。しかしながら、FP療法が全く奏功しない、あるいは重篤な副作用の発生により治療の継続が困難になるなど、治療効果や副作用に存在する極めて大きな個人差が問題点として残されている。これまでに研究代表者らは、個人差に関する問題点について検討を行ってきた。その結果、食道がん患者におけるFP療法の有効性と安全性の評価には、5-FU血漿中濃度がよい指標となる可能性を示すとともに[Kuwahara A et al., J. Exp. Clin. Cancer Res. 30, 94-101 (2011)]、食道がん細胞において抗癌剤感受性を規定する因子の存在について明らかにしてきた[Minegaki T. et al., Oncol. Lett. 5, 427-434 (2013)]。しかしながら、FP療法に対して全く奏功しない、あるいは高い治療効果を望めないことが予測できる食道がん患者に対して、代替となる治療法あるいは治療薬の選択肢が、他の癌腫に比べて非常に少ないことには依然として変わりない状況のままである。このような背景から、食道がんの治療に対して安全でより有効性が高い新規の治療法ならびに治療薬、あるいは新規治療標的の登場に、非常に大きな期待が寄せられている。

一方、ビスホスホネート系薬物(BPs)は、メバロン酸経路の阻害により破骨細胞にアポトーシスを誘導し、骨吸収抑制作用を示すことで、骨代謝回転において破骨細胞の活性亢進が認められる疾患、すなわち骨粗鬆症などに対して汎用されている。現在、本邦では6種類のBPsが承認されているが、zoledronate (ZOL)をはじめ、強力な作用を示す窒素含有BPsの一部は、悪性腫瘍による高カルシウム血症の是正、多発性骨髄腫や固形がん骨転移による骨病変の治療を目的として転移を起こしやすい多くの悪性腫瘍に対して用いられている[Coleman R., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1218, 3-14 (2011)]。また、早期乳がん患者に対する術後補助内分泌療法にZOLを併用することにより、骨転移だけでなく他部位への遠隔転移および局所再発を減少させることが報告されている[Gnant M. et al., N. Engl. J. Med., 360, 679-691 (2009)]とともに、乳がん、大腸がん、前立腺がんや多発性骨髄腫細胞などに対して、ZOLが直接的に抗腫瘍効果を示すことも報告されてきた。そして、研究代表者らは、ZOLをはじめとするBPsが食道がんに対する抗腫瘍効果を有すること、またその作用機序が食道がんに特有であることを明らかにした[Minegaki T. et al., Dis. Esophagus, in press (2015)]。さらに興味深いことに、食道がん細胞に対するBPsの抗腫瘍効果は、低酸素環境下において大幅に増強されるという現象を見出したものの、その作用機序については不明であった。

## 2. 研究の目的

近年、生体内において、がん細胞を取りまく環境、すなわちがん微小環境が注目されている。なかでも、低酸素環境は多くの固形がんでは認められ、抗がん剤の感受性を規定する要因の一つとして注目されている。低酸素環境は転写因子である低酸素誘導因子(HIF)-1の発現を安定化させることで、がん細胞の悪性化の原因となることが知られている。例えば、HIF-1 $\alpha$ は、上皮間葉転換を誘導することでがん細胞の転移を促進すること、様々ながん細胞の細胞増殖を活性化すること、並びにメトトレキサート及びエトポシドなどの抗腫瘍効果を減弱させることが報告されている。したがって、がん化学療法の奏効率を向上させるために低酸素環境を考慮した薬剤の選択が重要となる。

メバロン酸経路阻害剤であるBPs及びHMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン系薬物)は、がん細胞に対して細胞増殖抑制作用を示すことが明らかになっている。例えば、BPsはヒト乳がん細胞株においてmTORを阻害することで細胞増殖を抑制することが知られており、スタチン系薬物はヒト卵巣がん細胞株において細胞周期をG<sub>1</sub>期で停止させアポトーシスを誘導することが報告されている。また、BPs及びスタチン系薬物はHIF-1 $\alpha$ の発現を抑制することが知られており、このメカニズムはメバロン酸経路の阻害を介した、mTORの発現抑制に起因すると報告されている。ここで、HIF-1 $\alpha$ の阻害はがん細胞の増殖を抑制することから、低酸素環境下のがん細胞に対してメバロン酸経路阻害剤は有用であると考えられる。したがって、低酸素環境下におけるメバロン酸経路阻害剤の細胞増殖抑制作用を明確にし、そのメカニズムを明らかにすることは、がん化学療法に用いる薬剤の選択肢を広げることに繋がり、がん化学療法における治療成績の向上が期待される。

そこで本研究では、ヒト食道がん細胞株を用いて低酸素環境下におけるメバロン酸経路阻害

剤の細胞増殖抑制作用及びそのメカニズムに関する検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

ヒト食道がん細胞株である KYSE150 細胞を用いた。BPs は、アレンドロン酸 (ALE)、パミドロン酸 (PAM)、リセドロン酸 (RIS) 及びゾレドロン酸 (ZOL) を用いた。HMG-CoA 還元酵素阻害剤としてアトルバスタチン (ATO) 及びシンバスタチン (SIM) を用いた。がん細胞株の増殖に及ぼす BPs 及び HMG-CoA 還元酵素阻害剤の影響、並びに正常酸素環境下における KYSE150 細胞の細胞増殖に及ぼす ZOL 及び SIM 併用時の影響は、薬物処置 72 時間後の生細胞数を CellQuant-i-Blue 試薬を用いて測定することで評価した。KYSE150 細胞における ZOL 及び SIM の細胞増殖抑制作用に及ぼす DFO の影響は、正常酸素環境下において DFO を 24 時間処置後 ZOL 及び DFO を 72 時間処置した。また、HIF-1 及び HMG-CoA 還元酵素のタンパク質発現量は、ウェスタンブロット法により測定した。低酸素環境は、マルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度を 1% に維持することで作成した。

### 4. 研究成果

KYSE150 細胞の 5-FU 及び CDDP に対する感受性は、正常酸素環境下と比較し低酸素環境下でも変動しなかったものの、BPs 及びスタチン系薬物の感受性は低酸素下で有意に増大した。これらのことから、食道がん細胞に対する BPs 及びスタチン系薬物のようなメバロン酸経路阻害剤の細胞増殖抑制作用は低酸素環境下でさらに増強し、またこの増強はこれら薬物特異的であることが考えられる。

HeLa、A549 及び MDA-MB-231 細胞の ZOL に対する感受性は、KYSE150 細胞と同様に低酸素環境下において有意に増強した。このことから、低酸素環境は食道がん細胞のみならず多種のがん細胞において ZOL の細胞増殖抑制作用を増強させる可能性が示唆された。

ZOL は正常及び低酸素両環境下において KYSE150 細胞のアポトーシスを誘導し、その作用は低酸素環境下においてさらに増強した。したがって、低酸素環境下における ZOL の細胞増殖抑制作用の増強は、アポトーシス誘導の増大が関与する可能性が示唆された。

メバロン酸代謝物である GGOH の共存は、正常酸素環境及び低酸素環境の両環境下における ZOL 及び SIM の細胞増殖抑制作用をほぼ完全に消失させたが、FOH の共存はほぼ影響しなかった。これは ZOL 及びフルバスタチンの細胞増殖抑制作用は GGOH の共存により消失するという報告と一致している。したがって、低酸素環境下における ZOL 及び SIM の細胞増殖抑制作用は、共に FPP の枯渇ではなく GGPP の枯渇に起因する可能性が示唆された。

HIF-1 タンパク質の発現抑制は細胞増殖を阻害すること、並びに ZOL が細胞内 HIF-1 タンパク質の発現量を減少させることから、低酸素環境下において ZOL が HIF-1 タンパク質発現を抑制することで細胞増殖抑制作用が増強する可能性が考えられる。しかしながら、低酸素環境下の KYSE150 細胞において、ZOL は HIF-1 タンパク質の発現量に影響しなかった。このため、低酸素環境下における ZOL の細胞増殖抑制作用は、HIF-1 タンパク質の発現抑制によるものではないと考えられる。

DFO は、その鉄キレート作用により細胞内の HIF-1 タンパク質の発現を安定化させる。正常酸素環境下と比較して、DFO 前処置において ZOL の感受性は増大したものの、SIM の感受性に有意な変化は認められなかった。これらのことから、低酸素環境下での ZOL 及び SIM の細胞増殖抑制作用が増強するメカニズムは異なることが考えられる。ZOL の細胞増殖抑制作用の増強は HIF-1 を介し、SIM では HIF-1 を介さない可能性が考えられるものの、その詳細は検討する必要がある。

細胞内におけるメバロン酸経路は、細胞の生存及び増殖に関与する RAS/MAPK/AKT 経路の低分子量 G タンパクのゲラニルゲラニル化を担っている。GGTI 298 はこのゲラニルゲラニル化を触媒するゲラニルゲラニル転移酵素 (GGTase) の阻害剤であり、細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている。今回、GGTI 298 の細胞増殖抑制作用は低酸素環境下でも有意に変化しなかった。このため、低分子量 G タンパクがゲラニルゲラニル化される以降の細胞内シグナルの阻害は低酸素環境下での薬物感受性増大に関与せず、メバロン酸から GGPP に代謝される過程における阻害の関与が示唆された。

メバロン酸経路における BPs の標的酵素である FPP 合成酵素の mRNA 発現量は低酸素環境下で変化しなかったものの、GGPP 合成酵素の mRNA 量はわずかに増加した。低酸素環境が FPP 及び GGPP 合成酵素に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。しかしながら、ドキシソルピシンでは、作用標的であるトポイソメラーゼ Ⅱ 発現量の増加に伴い感受性が増大することが報告されている。したがって、GGPP 合成酵素の増大は、低酸素環境下での ZOL の作用増強に一部関与する可能性が考えられる。

HMG-CoA 還元酵素は、メバロン酸経路 (Fig. 12) における SIM の作用標的となる酵素である。正常酸素環境下と比較して、HIF-1 タンパク質発現量の増大とともに HMG-CoA 還元酵素の mRNA 及びタンパク質発現量は、低酸素環境下及び DFO 前処置細胞において有意に減少した。

そして、正常酸素環境下において、ZOLの細胞増殖抑制作用はSIMと併用することでさらに増強した。Nguyenらは、チャイニーズハムスターの卵巣細胞において低酸素環境によりHIF-1タンパク質が蓄積し、HMG-CoA還元酵素のタンパク質発現量を抑制することを報告している。また、Elsayedらは、ヒト膵臓がん細胞株においてZOLとフルバスタチンの併用が細胞毒性を相乗的に増加することを報告している。したがって、HIF-1を介したHMG-CoA還元酵素発現量の減少により、ZOLの細胞増殖抑制作用が増強されている可能性が示唆された。

以上、メバロン酸経路阻害剤であるBPs及びスタチン系薬物は、低酸素環境下で細胞増殖抑制作用を増強し、またZOLの細胞増殖抑制作用の増強は、HIF-1の蓄積に伴うHMG-CoA還元酵素発現量の減少に起因する可能性が示唆された。しかしながら、SIMについては、その作用増強にHIF-1が関与しない可能性が示唆されており、ZOLがGタンパク質のプレニル化及びコレステロールの合成に及ぼす影響、さらにはオートファジーの誘導に着目した更なるメカニズムの検討が必要である。本研究において得られた知見が、がんの化学療法における薬剤の選択肢をひろげ、臨床現場における薬物治療の奏効率の向上に繋がることを期待する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Minegaki T., Koiki S., Douke Y., Yamane C., Suzuki A., Mori M., Tsujimoto M., Nishiguchi K.: Augmentation of the cytotoxic effects of nitrogen-containing bisphosphonates in hypoxia., *J. Pharm. Pharmacol.*, **70**, 1040-1047 (2018).

〔学会発表〕(計3件)

Nishiguchi K., Minegaki T., Koiki S., Doke Y., Yamane C., Suzuki A., Mori M., Tsujimoto M.: Hypoxia Potentiates the Cytotoxic Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates in Human Esophageal Cancer Cell Line. 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition (Denver, Colorado, USA), 2016.

峯垣哲也、戀木沙耶、道家雄太郎、山根千尋、鈴木 藍、森 美里、辻本雅之、西口工司: 低酸素下におけるビスホスホネート系薬物の細胞毒性増強とそのメカニズムの解明、日本薬学会第137年会、仙台、2017

楠 斐未、峯垣哲也、池上歩花、奥田博允、藤井啓子、眞弓万里奈、北山純花、原祢幸汰、葛本貴大、米田朋美、辻本雅之、西口工司、ヒト食道癌細胞株の低酸素環境下におけるビスホスホネートに対する感受性増強機序の解明、日本薬学会第139年会、千葉、2019

〔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：辻本 雅之

ローマ字氏名：Tsujiimoto Masayuki

所属研究機関名：京都薬科大学

部局名：臨床薬学分野

職名：講師

研究者番号（8桁）：90372739

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：峯垣 哲也

ローマ字氏名：Minegaki Tetsuya

所属研究機関名：京都薬科大学

部局名：臨床薬学分野

職名：助教

研究者番号（8桁）：10549306

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。