

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18943

研究課題名(和文)重合開始剤による乳がん治療薬の効果減弱の機序解明

研究課題名(英文) The mechanism of photoinitiators about the reduction of therapeutic agents on breast cancer

研究代表者

河崎 陽一 (Yoichi, Kawasaki)

岡山大学・大学病院・薬剤主任

研究者番号：40582101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんの罹患率は上昇傾向にあることから、予防ならびに治癒率向上に対する研究は喫緊の課題である。本研究課題では、乳がんに対する重合開始剤の影響を明らかにするために基礎研究を実施した。その結果、重合開始剤は乳がん増殖に関係するエストロゲン受容体に作用することが示唆された。すなわち、すでに乳がん罹患した患者に対してがん増殖を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの罹患患者数は、増加の一途をたどり、2020年までの部位別年齢調整罹患率の予測では第1位である。最も問題となるのは、他のがんと比較して乳がんの好発年齢は若いため子育て世代の患者が多いことである。このような背景から、乳がんの起因を解明することは重要である。本研究課題の成果では、重合開始剤は乳がん細胞に対してエストロゲン様活性を示すが、正常細胞に対してはその作用を有さないことが示唆された。このことより、重合開始剤自身に乳がん発がん作用はなく、すでに存在する乳がん細胞に対して増殖効果を示すことが示唆されたことから、乳がん罹患患者は接触を避けるべきである。

研究成果の概要(英文)：As the breast cancer tends to be increased morbidity, research on prevention and cure is an urgent issue. In the our recent research, basic study was performed to clarify the influence of photoinitiators on breast cancer. As the results, it was suggested that the photoinitiators acts on an estrogen receptor related to breast cancer growth. Thus, it has been suggested that it may promote cancer growth in patients already suffering from breast cancer.

研究分野：臨床薬学

キーワード：注射薬 重合開始剤 エストロゲン感受性細胞 エストロゲン様活性 エストロゲン受容体 エストロゲン応答遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

重合開始剤(図1)は、紫外線を照射することでラジカル体となり、モノマーの化合物をポリマーに変化させる特徴を有する。重合開始剤は、インク、日焼け止めクリームおよび歯科用材料の生産など様々な分野で応用されており、日常的に重合開始剤に接触していると考えられる。

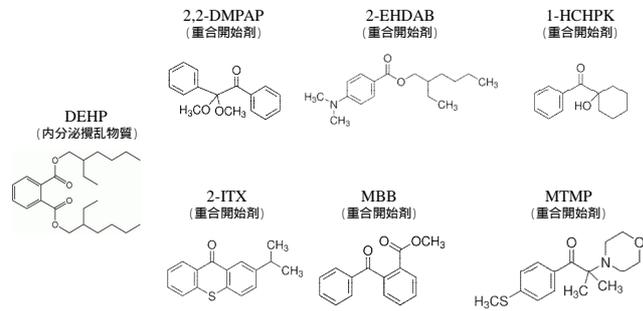


図1. 内分泌攪乱物質および重合開始剤の一例

申請者は、以前より継続して重合開始剤の特徴について研究結果を報告して

きた^{1, 2, 3)}。最新の知見として、注射薬中から検出した重合開始剤 methyl 2-benzoylbenzoate (MBB) の基本骨格が内分泌攪乱作用を有する di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) に類似していることに着目し研究を行った結果、重合開始剤は、エストロゲン様活性作用を有することが明らかとなった⁴⁾。

エストロゲンは、ステロイドホルモンの一種で乳腺細胞の増殖促進および卵巣排卵制御などに関わっており、乳がんの増悪に関係する。乳がんの罹患者数は、増加の一途をたどり、2020年までの部位別年齢調整罹患率の予測では第1位である。乳がんの最も問題となる点は、他のがんと比較して好発年齢が若い世代の患者が多いことである。

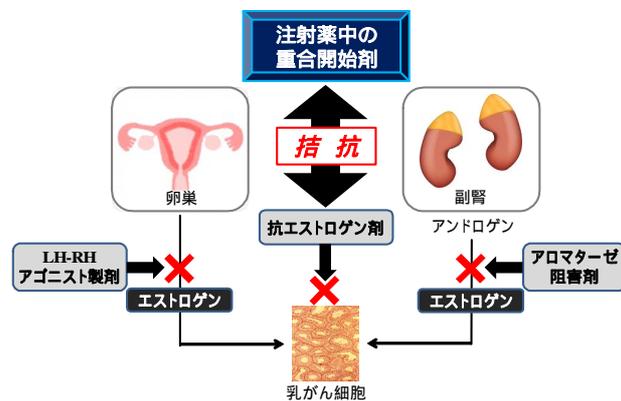


図2. 重合開始剤による乳がん治療阻害作用(仮説)

乳がん治療の種類は、外科的治療および薬物療法に二種類あり、薬物療法には内分泌療法および化学療法がある。内分泌療法は、化学療法と比較して副作用が少なく Quality of Life (QOL) を高く維持でき、術前および術後に継続投与することでホルモン依存性の再発抑制効果が期待できることから、乳がんの標準的治療の一つとなっている。

上述の現状と我々の研究成果から、注射薬中の重合開始剤は乳がん治療の効果を減弱するのではないかという発想に至った(図2)。

2. 研究の目的

本研究計画は、重合開始剤のエストロゲン様活性を *in vitro* 研究手法を用いて評価し、乳がん治療効果に対する重合開始剤の影響を明らかにすることで、安全かつ有効な治療提供への展開が期待できる基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 および T47D に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性の評価

我々が検出した重合開始剤とインク生成に頻用される重合開始剤である 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA)、2-ethylhexyl 4-(dimethylamino) benzoate (EHDAB) および 2-isopropylthioxanthone (ITX) を含めた6種類を用いて、内分泌攪乱作用および作用機序について E-screen assay を用いて評価した。また、エストロゲン受容体 (ER) 拮抗薬と重合開始剤を併用して E-screen assay を行った。

(2) ヒト正常子宮平滑筋細胞 UtSMC に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性の評価

重合開始剤による hUtSMC への影響は、E-screen assay を用いて行った。また、hUtSMC

に重合開始剤を接触させた場合のエストロゲン応答遺伝子である CD38 のタンパク発現量に与える影響について Western blotting 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 および T47D に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性の評価

MCF-7 および T47D は、重合開始剤によって有意に増殖した (図 3, 4) また、抗エストロゲン剤の前処置によって、重合開始剤による増殖効果は抑制された (図 5, 6)。

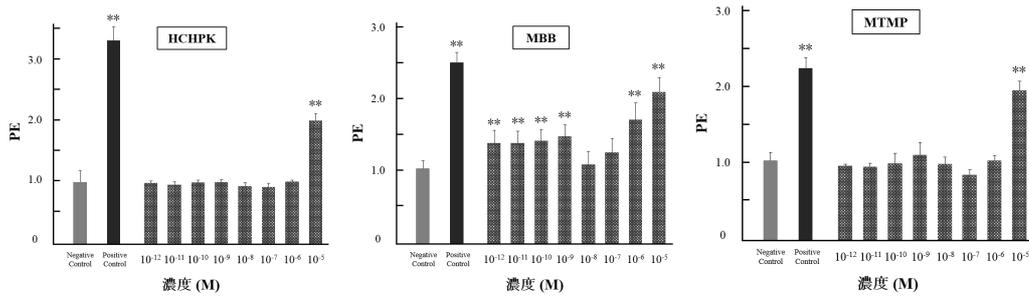


図 3 MCF-7 に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性 (一部抜粋)

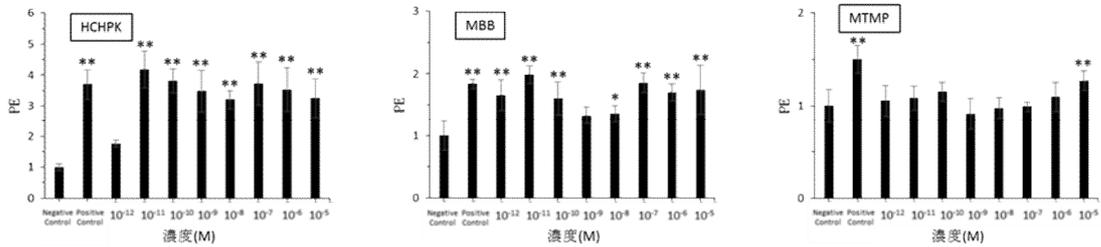


図 4 T47D に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性 (一部抜粋)

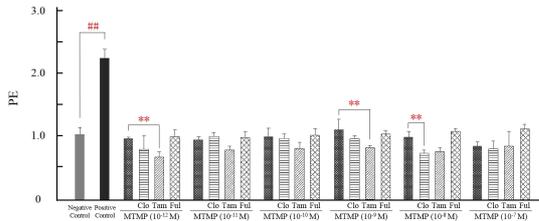


図 5 MCF-7 における重合開始剤誘発エストロゲン様活性に対する抗エストロゲン剤の影響 (一部抜粋)

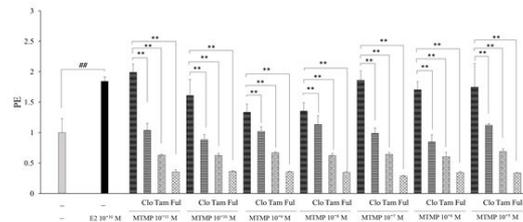


図 6 T47D における重合開始剤誘発エストロゲン様活性に対する抗エストロゲン剤の影響 (一部抜粋)

(2) ヒト正常子宮平滑筋細胞 UtSMC に対する重合開始剤によるエストロゲン様活性の評価

E-screen assay の結果から、重合開始剤は hUtSMC に対して細胞増殖作用を示さないことが明らかとなった (図 7)。また、重合開始剤は CD38 のタンパク発現量に変化を与えなかった (図 8)。

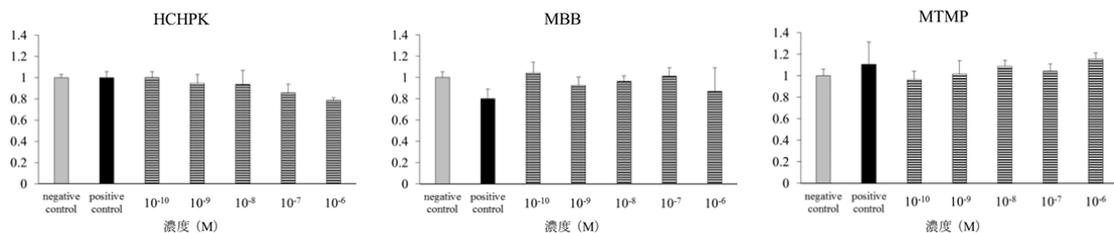


図 7 hUtSMC に対する重合開始剤の細胞増殖効果 (一部抜粋)

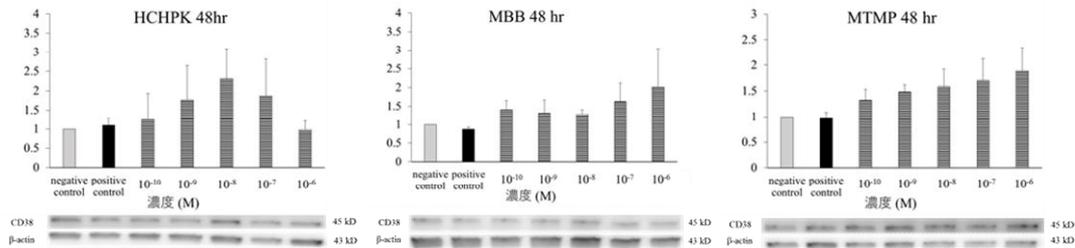


図 8 hUtSMC に対する重合開始剤による CD38 発現量変化 (一部抜粋)

本研究において、6種の重合開始剤による MCF-7 の増殖は、MCF-7 の ER を介したエストロゲン様作用であることが示唆された。エストロゲン受容体 (ER) 拮抗薬による増殖の抑制度は、重合開始剤により異なる部分があった。10⁻⁷ - 10⁻⁶ M DMPA と Tam および 10⁻⁶ - 10⁻⁵ M MBB と Ful を併用した群では、他の ER 拮抗薬と併用した群に比べて PE が高かった。ホルモン依存性の細胞では、E2 により positive growth modulator である TGF- α が誘導され、Tam は negative growth modulator である TGF- β を誘導し、これらの作用によりホルモン依存性細胞の増殖が制御されるという報告がある^{5,6)}。DMPA 併用群において、Tam が他の ER 拮抗薬に比べて増殖抑制作用が弱かった原因は、DMPA によって positive growth modulator が誘導された可能性があると考えられる。Ful は ER をダウンレギュレートする ER 拮抗薬であるが、MBB 併用群において他の拮抗薬よりも増殖抑制作用が弱かった。ER が活性化する機序にはリガンド非依存的経路が存在することから、MBB は ER を介さない作用を有する可能性が示唆された。

hUtSMC において E2 による細胞増殖効果が MAPK カスケードの相互作用によって抑制されているとの報告がある⁸⁾。E2 による細胞増殖機構の中に、MAPK カスケードを介したものがあ。E2 が ER に結合すると プロテインキナーゼ C (PKC) α の活性化が起こり、最終的に ERK1/2 が活性化することで細胞増殖の活性化に関与する遺伝子に影響を与える。hUtSMC では、E2 が ER に結合して PKC α の活性化が起こった後、cAMP シグナリングが活性化され プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化が起こる。PKA は、MAPK カスケードの中の Raf を阻害することで ERK1/2 のリン酸化を抑制している⁸⁾。これにより、E2 による細胞増殖効果が抑制されたと考える。

hUtSMC におけるエストロゲン応答の指標として、CD38 以外に connexin43 (cx43) の mRNA およびタンパク発現量増加が知られている⁹⁻¹²⁾。cx43 は gap junction protein alpha1 (GJA1) として知られており、心臓および子宮筋などのギャップ結合形成に関与するタンパク質である。子宮平滑筋における cx43 の機能として、分娩時をはじめとする子宮の収縮への関与が挙げられる。E2 濃度が上昇することにより cx43 の発現が起こる結果、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションが活発になり、子宮の収縮が促されると考えられている¹³⁾。子宮平滑筋に E2 を作用させると、CD38 の mRNA およびタンパク量の発現増加が見られたが、cx43 の mRNA 増加作用は見られず、タンパクのみの増加が見られたとの報告がある¹⁴⁾。このことから、E2 を接触させた場合に見られる応答反応は、細胞種が同じであっても、個人差がある可能性が考えられる。今回用いた hUtSMC において、E2 による CD38 の発現量増加は見られなかったが、cx43 などの他のエストロゲン応答遺伝子に着目することで、本細胞の

エストロゲン応答性についてさらに検討することができると思う。

上記の結果より、重合開始剤はヒト乳がん由来細胞 MCF-7 および T47D に対してエストロゲン様作用を有することが示唆された。また、その作用発現はエストロゲン受容体を介することが示唆された。一方、ヒト正常子宮平滑筋細胞 UtSMC に対してエストロゲン様作用を示さなかった。また、エストロゲン関連タンパクの発現に影響を及ぼさなかった。すなわち、重合開始剤はがん細胞に対してエストロゲン作用を示し、正常細胞にはその作用を発現しないことから、乳がんを発がんする作用はないことが示唆された。今後は細胞種による影響度の差異の詳細についてエストロゲン活性に関連するカスケードを中心に明らかにしていく必要があると考える。

<引用文献>

1. Kawasaki Y, Yamaji K, Matsunaga H, Sendo T. Cytotoxicity of the polymerization agent, 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone on human monocytes. *Biol Pharm Bull.* **35**, 256-9 (2012).
2. Yamaji K, Kawasaki Y, Yoshitome K, Matsunaga H, Sendo T. Quantitation and human monocyte cytotoxicity of the polymerization agent 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone (Irgacure 184) from three brands of aqueous injection solution. *Biol Pharm Bull.* **35**, 1821-5 (2012).
3. Kawasaki Y, Yagi K, Tsuboi C, Morizane M, Kitamura Y, Sendo T. The polymerization agent, 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone induces caspases-3/7 in human blood mononuclear cells in vitro. *Biol Pharm Bull.* **36**, 1640-5 (2013).
4. Morizane M, Kawasaki Y, Miura T, Yagi K, Esumi S, Kitamura Y, Sendo T. Photoinitiator-Initiated Estrogenic Activity in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *J Toxicol Environ Health A.* **78**, 1450-60 (2015).
5. Dickson RB, Bates SE, McManaway ME, Lippman ME. Characterization of Estrogen Responsive Transforming Activity in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*, **46**, 1707-1713, (1986).
6. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, Dickson RB. Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, **48**, 417-428 (1987).
7. Fowler AM, Solodin N, Preisler-Mashek MT, Zhang P, Lee AV, Alarid ET. Increases in estrogen receptor-alpha concentration in breast cancer cells promote serine 118/104/106-independent AF-1 transactivation and growth in the absence of estrogen. *FASEB J*, **18**, 81-93 (2004).
8. Nierth-Simpson EN, Martin MM, Chiang TC, Melnik LI, Rhodes LV, Muir SE, Burow ME, McLachlan JA. Human uterine smooth muscle and leiomyoma cells differ in their rapid 17 β -estradiol signaling: implications for proliferation. *Endocrinology*, **150**, 2436-2445 (2009).
9. Garfield RE, Kannan MS, Daniel EE. Gap junction formation in myometrium: control by estrogens, progesterone, and prostaglandins. *Am J Physiol*, **238**, C81-C89 (1980).
10. Petrocelli T, Lye S. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction

protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology*, **133**, 284–290 (1993).

11. Ambrus G, Rao CV. Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, **135**, 2772–2779 (1994).
12. Kilarski WM, Hongpaisan J, Semik D, Roomans GM. Effect of progesterone and oestradiol on expression of connexin43 in cultured human myometrium cells. *Folia Histochem Cytobiol*, **38**, 3-9 (2000).
13. Di WL, Lachelin GC, McGarrigle HH, Thomas NS, Becker DL. Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol Hum Reprod*, **7**, 671-679 (2001).
14. Chandran S, Cairns MT, O'Brien M, Smith TJ. Transcriptomic effects of estradiol treatment on cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol*, **393**, 16-23 (2014).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mariko Takai, Yoichi Kawasaki, Sakae Arimoto, Yusuke Tanimoto, Yoshihisa Kitamura, Toshiaki Sendo, UV-irradiated 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropionophenone-containing injection solution produced frameshift mutations in the Ames mutagenicity assay. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 10135-10140 (2018). 査読有

Chiaki Tsuboi, Yoichi Kawasaki, Kei Yoshitome, Kenta Yagi, Taro Miura, Satoru Esumi, Ikuko Miyazaki, Masato Asanuma, Yoshihisa Kitamura, Toshiaki Sendo, In vitro quantitative determination of the concentration of the polymerization agent methyl 2-benzoylbenzoate in intravenous injection solution and the cytotoxic effects of the chemical on normal human peripheral blood mononuclear cells. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 10262-10269 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Yoichi Kawasaki, Yoshihisa Kitamura, Toshiaki Sendo, Analysis of the photoinitiators within an injection solution and the associated risks. 2018 ASHP Midyear Clinical Meeting (2018年12月:アナハイム, カリフォルニア州, USA)

Yoichi Kawasaki, Toshiaki Sendo, In vitro toxicity of photoinitiators in injectable solutions. 第15回日中韓合同注射薬臨床情報学シンポジウム(2017年4月:ソウル, 韓国) 有元佐賀恵, 市原英則, 高井真理子, 河崎陽一, 北村佳久, 千堂年昭, 環境及び医薬品混在物の光変異原性 重合開始剤の光変異原性, 第38回日本光医学・光生物学会(2016年7月:京都)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(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。