

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590765

研究課題名（和文）：超音波エネルギーを利用した多剤耐性肝癌の新しい治療法の開発

研究課題名（英文）：Exploitation of the novel therapy for the drug-resistant liver cancer using ultrasonic energy

研究代表者 峯村 正実 (MINEMURA MASAMI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：10313602

研究成果の概要（和文）：癌の化学療法において、多剤耐性遺伝子が誘導され、多くの薬剤に耐性をもつことが治療を困難にしている。本研究では、肝癌を含む抗癌剤が効きにくくなった癌に対して、抗癌剤と超音波照射を併用することで、抗腫瘍効果が増強することが明らかになった。超音波照射による薬剤感受性の増強のメカニズムは十分には明らかにできなかったが、①超音波照射により癌細胞への薬剤の取り込みが増加することや、②多剤耐性癌細胞において、超音波に対する感受性増加が細胞膜の剛性の増加に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：When the multidrug resistance gene is frequently induced during the chemotherapy of cancer, it is a significant obstacle to successful treatment. In the present study, it has been shown that combination with chemotherapeutic agents and ultrasound (US) causes a synergistic enhancement in killing multidrug-resistant cancer cells, including hepatoma cells. Although the mechanism of the enhanced cytotoxicity using US has not been fully clarified, the possibility exists that increased uptake of drugs is caused by US and enhanced sensitivity to US is related to increased membrane rigidity in the multidrug resistant phenotype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：消化器病学、腫瘍内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：(1)超音波力学 (2) 多剤耐性遺伝子 (3) 肝癌

1. 研究開始当初の背景

癌に対する化学療法は大きく進歩し、有効な治療方法であるが、抗癌剤が効かなくなる耐性の出現が普遍的な問題である。その耐性の機序として、多剤耐性に関連した遺伝子(MDR,MRP,MRP2/cMOAT,BCRPなど)の過剰発現が重要な因子であり、特に肝癌においては多剤耐性遺伝子が高発現しやすく、肝癌

の化学療法を困難にしている。一方、医療用に利用されている低出力の超音波は細胞や組織に大きな変化をもたらさないと考えられてきたが、薬物作用部位への超音波照射が、薬物の導入効率を上げたり、薬物の活性を増強することが報告されており、抗癌剤と超音波エネルギーを併用することで、多剤耐性を克服できる可能性があると考え、この研究を

開始した。

2. 研究の目的

本研究では、抗癌剤と超音波照射を併用することにより、肝癌細胞や多剤耐性遺伝子高発現細胞における薬剤導入効率の向上、感受性の増強、抗腫瘍効果の増強を検討することで、超音波エネルギーを用いた多剤耐性の克服のための基礎的な検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1)超音波照射による抗癌剤の増感効果の検討：多剤耐性遺伝子(MDR1)遺伝子が高発現しているヒト肝癌細胞株(PLC/PRF/5細胞)および抗癌剤(Doxorubicin:DXR)に感受性あるMES-SA細胞と多剤耐性遺伝子が誘導されDXRに耐性をもつMES-SA/Dx5細胞を用いて、超音波照射の有無におけるDXRへの感受性の変化を検討した。超音波発生装置はSonicmaster ES-2を用い、35mm dishに培養した細胞に下方から超音波を照射し、照射後24時間の細胞数、生細胞数(トリパンブルー染色法)およびCell Counting Kit-8(CCK-8)を測定することで、抗腫瘍効果を検討した。

(2)抗癌剤と超音波照射併用による細胞死の機序を検討するため、アポトーシスの検出をAnnexin V/PI apoptosis kitを用いたフローサイトメトリーとDNA fragmentationアッセイで検討した。細胞膜の剛性の検討として、細径シリンジによるメカニカルストレスを加えた後、アポトーシスの有無を検討した。さらに細胞の形態学的な変化を位相差顕微鏡および蛍光色素を用いた核染色で検討した。

(3)多剤耐性細胞における細胞死に関連した遺伝子群の発現の検討：MES-SA細胞とMES-SA/Dx5細胞におけるDXR処理にした場合の遺伝子発現の変化をcDNA microarrayを用いて検討した。

4. 研究成果

(1)超音波照射による抗癌剤の増感効果：①PLC/PRF/5細胞では、DXR(10 μ M)処理群、超音波照射群(0.3W/cm²,1min)、DXR+超音波照射併用群の比較において、併用群で殺細胞効果(抗腫瘍効果)の相乗的な増強が確認された。DXR処理および超音波照射単独では、それぞれ約30%、20%の殺細胞効果であったが、併用することで約75%の相乗効果であった。②MES-SA細胞とMES-SA/Dx5細胞において、超音波照射群で強度依存的に殺細胞効果が確認されたが、多剤耐性細胞株であるMES-SA/Dx5細胞の方が、超音波に対する感受性がより高かった。(10%の細胞死を来す閾値：MES-SA 0.4W/cm², MES-SA/Dx5 0.3W/cm²)。

③MES-SA細胞とMES-SA/Dx5細胞において、DXR(1 μ M)処理と超音波照射(0.4W/cm²,1min)の組み合わせでは、DXR処理後に超音波照射した場合に、殺細胞効果の増強が認められた。

(2)細胞死・アポトーシスの確認：

①Annexin V(+)/PI(-)を早期アポトーシス(early apoptosis)の検出指標、Annexin V(+)/PI(+)を細胞死(necrosis)の指標として、細胞死の機序を確認した。MES-SA細胞とMES-SA/Dx5細胞において、超音波照射(0.4W/cm²,1min)のみで、両細胞群で約5%に早期アポトーシスが検出された。また、同様の条件下でMES-SA細胞で約9%、MES-SA/Dx5細胞で約18%のnecrosisが検出された。②DXRと超音波照射を併用した場合、細胞のviabilityの低下とAnnexin V(+)/PI(+)の増加との相関が認められたが、DNA fragmentationの結果とは相違が認められた。また、細径シリンジによるメカニカルストレスにより、MES-SA/Dx5細胞でより高い頻度でAnnexin V(+)/PI(+)細胞が検出された。

(3)細胞の形態学的な変化：超音波照射1時間後の細胞観察では、MES-SA/Dx5(多剤耐性細胞)でpolyploid細胞が多く認められ、24時間後には、細胞から出芽するように小サイズの細胞が観察された(neosis様現象)。

(4)多剤耐性細胞における細胞死に関連した遺伝子群の発現の検討：cDNA microarrayを用いた遺伝子発現の検討では、MES-SA細胞に比べMES-SA/Dx5細胞でMDR1遺伝子が139倍に増強しており、DXR処理によるp21(WAF1)遺伝子の発現誘導はやや弱かった。MES-SA/Dx5細胞では、生存(癌化・増殖)に寄与するAktの抑制因子(PHLDA3)の発現が低下している傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

①Hassan M.A., Furusawa Y., Zhao Q.L., Takasaki I., Ferl L.B. Jr., Tachibana K., Minemura M., Sugiyama T., and Kondo T.: Differential cytotoxicity and sonosensitization by sanazole: Effect of cell type and acoustic parameters. J. Med. Ultrasonics. 2011;38: 65-72. (査読有)

[学会発表] (計 1件)

①Hassan M.A., Minemura M., and Kondo T.: Effects of low-intensity ultrasound on drug-sensitive MES-SA and multidrug resistant MES-SA/DX5 uterine sarcoma cells.

10th International Symposium on
Therapeutic Ultrasound (ISTU2010) 2010, 6.
9-12, Tokyo.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯村 正実 (MINEMURA MASAMI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：10313602

(2) 研究分担者

高原 照美 (TAKAHARA TERUMI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
准教授

研究者番号：60240777

杉山 敏郎 (SUGUYAMA TOSHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
教授

研究者番号：00196768