

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460230

研究課題名(和文)食道がんに対するビスホスホネート系薬剤を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Anticancer effects of bisphosphonates in human esophageal squamous cell

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道がんは、本邦において死亡率の高い癌の一つである。近年、骨粗鬆症の治療薬であるビスホスホネート系薬物(BP)は、がんに対する新たな治療薬として期待されている。そこで本研究では、食道がん細胞に対するBPの細胞増殖抑制作用およびそのメカニズムについて検討した。

その結果、ある種のBPは食道がん細胞に対して強い細胞増殖抑制作用を示し、その作用は低酸素環境下で増強されることが明らかとなった。また、食道がん細胞に対するBPの強い細胞増殖抑制作用のメカニズムとして、G0/G1期での細胞周期停止に伴うアポトーシス誘導の一部関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the most malignant cancers in Japan. Recently, bisphosphonates (BPs), which are osteoporosis drugs, have shown anticancer effects in several cancer cell lines. In this study, we examined the cytotoxic effects of BPs and their mechanisms of cytotoxicity in human ESCC cell lines. We concluded that second- and third-generation BPs are cytotoxic to ESCC cell lines as they induce apoptosis and inhibit the cell cycle through mevalonate pathway inhibition. Therefore, BP treatment may be a beneficial therapy in ESCC patients.

研究分野：臨床薬理学、臨床薬学

キーワード：食道がん ビスホスホネート系薬物 がん細胞 アポトーシス 細胞周期

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、食道がん細胞において抗癌剤感受性を規定する因子が存在する可能性を明らかにしてきた。

一方で、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、代替え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、あるいは新規治療ターゲットの登場に、非常に大きな期待が寄せられている。

2. 研究の目的

食道がんの治療において、外科的処置後にQOLが不良となる場合が多く、化学療法の効果も限定的であるため、安全かつ有効な新規治療法や治療薬の登場が待ち望まれている。しかしながら、有効な治療標的に関する情報さえも不足しているのが現状である。一方、すでに骨吸収抑制薬として臨床使用中のビスホスホネート系薬剤 (BP) による抗腫瘍効果が乳がんなどで報告されているものの、食道がんでの検討は皆無である。本研究では、食道がんに対してBPを用いた新規治療法あ

るいは新規治療ターゲットの創出を最終目的として、種々の検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) 材料

ヒト食道扁平上皮がん由来細胞株であるKYSE150 (低分化型)、KYSE170 (中分化型)、KYSE30 (高分化型) の3種を用いた。またBPとして、アレンドロネート (ALN)、エチドロネート (ETDN)、パミドロネート (PDN)、リセドロネート (RDN) およびゾレドロネート (ZOL) を用いた。

(2) BPの細胞増殖抑制作用等

BPを細胞に72時間処置後の細胞生存率をCellQuanti-Blue™ assayにて測定し、50%増殖阻害濃度 (IC50) を算出することにより評価した。また、BP処置によるアポトーシス誘導は、Caspase-Glo™ 3/7 Assay kitによるCaspase-3/7活性の測定およびFACSによるAnnexin-V/ヨウ化プロピジウム (PI) 陽性細胞の測定を行うことで評価した。

低酸素環境は、マルチガスインキュベータを用いて酸素濃度を1%に維持することで作成した。各薬物の細胞増殖抑制作用は、薬物を処置した一定時間後、生細胞数をCellQuanti-Blue試薬を用いて測定することで評価した。HIF-1等のタンパク質発現量は、ウェスタンブロット法により評価した。

4. 研究成果

(1) 食道がん細胞に対するBPの細胞増殖抑制作用とそのメカニズム

全ての食道癌細胞株において、ALN、PDN、RDNおよびZOLは濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示した。一方、ETDNは、検討した濃度範囲において、細胞増殖抑制作用を示さなかった。したがって、第二および第三世代のBPが、食道がん細胞に対する細胞増殖抑制作用を有することが示唆された。

(2) 食道がん細胞におけるBPによる細胞増殖抑制作用メカニズム

KYSE150細胞では、ALN、PDN、RDNおよびZOLの処置によりカスパーゼ3/7活性が有意に増大した。一方、ETDNは、カスパーゼ3/7活性に有意な変化を与えなかった。ALN、PDNおよびZOL処置によりアポトーシス細胞の割合が有意に増大した。一方、ETDNおよびRDNは、アポトーシス細胞の割合は有意に変化させなかった。したがって、ALN、PDN、RDNおよびZOLの細胞増殖抑制作用のメカニズムとして、一部、アポトーシスの関与が示唆された。

ALNおよびPDN処置によりG0/G1期の細胞率に有意な上昇が認められ、G2/M期の細胞率

は有意に減少した。また、RDN 及び ZOL 処置により G0/G1 期の細胞率の有意な上昇および S・G2/M 期の細胞率の優位な減少が認められた。一方、ETDN は、KYSE150 細胞の細胞周期に優位な影響を与えなかった。したがって、細胞増殖抑制作用を有する BP は、細胞周期を G0/G1 期で停止させることが示唆された。

次に、メバロン酸経路の中間物質であるゲラニルゲラニオールの共存により BP の細胞毒性は減弱したことから、この細胞毒性には、BP によるメバロン酸経路阻害の関与が示唆された。

(3) BS の食道がん細胞増殖抑制作用におよぼす低酸素環境の影響

低酸素環境下にて培養した食道がん細胞を通常酸素環境下での培養時と比較したところ、5-FU 及び CDDP の細胞増殖抑制作用は有意に低下したのに対して、全ての BP の細胞増殖抑制作用は有意に増大した。また、低酸素環境下において生じる HIF-1 のタンパク質発現量は、低酸素環境により増大が認められたものの、ZOL の共存により抑制された。さらに、ZOL の細胞増殖抑制作用は、メバロン酸経路の中間物質であるゲラニルゲラニオールの共存により、低酸素環境下および通常酸素環境下のともに完全に抑制された。したがって、ZOL をはじめとする BP の細胞増殖抑制作用は、低酸素環境下においてより増強し、メバロン酸経路を介している可能性が示唆された。

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4件)

Tetsuya Minegaki, Saori Fukushima, Chihiro Morioka, Hitomi Takanashi, Junki Uno, Shiori Tsuji, Satoshi Yamamoto, Airi Watanabe, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi: Effects of bisphosphonates on human esophageal squamous cell carcinoma cell survival. Dis Esophagus. "in press" 査読有 DOI: 10.1111/dote.12370

Tetsuya Minegaki, Akiko Kuwahara, Motohiro Yamamori, Tsutomu Nakamura, Tatsuya Okuno, Ikuya Miki, Hideaki Omatsu, Takao Tamura, Midori Hirai, Takeshi Azuma, Toshiyuki Sakaeda, and Kohshi Nishiguchi. Genetic polymorphisms in SLC23A2 as predictive biomarkers of severe acute toxicities after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients

with esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* 11, 321-326 (2014). 査読有 DOI:10.7150/ijms.7654

Hideaki Omatsu, Akiko Kuwahara, Motohiro Yamamori, Megumi Fujita, Tatsuya Okuno, Ikuya Miki, Takao Tamura, Kohshi Nishiguchi, Noboru Okamura, Tsutomu Nakamura, Takeshi Azuma, Takeshi Hirano, Koichiro Ozawa and Midori Hirai: *TNF- α -857C>T Genotype is Predictive of Clinical Response after Treatment with Definitive 5-Fluorouracil/cisplatin-based Chemoradiotherapy in Japanese Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma.* *Int. J. Med. Sci.*, 10, 1755-1760 (2013). 査読有 DOI:10.7150/ijms.6749

Tetsuya Minegaki, Kohji Takara, Ryohei Hamaguchi, Masayuki Tsujimoto and Kohshi Nishiguchi: Factors affecting the sensitivity of human-derived esophageal carcinoma cell lines to 5-fluorouracil and cisplatin. *Oncol. Lett.*, 5, 427-434 (2013). 査読有 DOI:10.3892/ol.2012.1014

[学会発表](計7件)

山根千尋 他：低酸素環境下における食道癌細胞株に対するビスホスホネートによる細胞増殖抑制作用の増強. 日本薬学会第136年会(横浜), 2016.3.27

道家雄太郎 他：低酸素環境下におけるヒト食道癌細胞株の増殖に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響. 第25回日本医療薬学会年会(横浜), 2015.11.22

峯垣哲也 他：ビスホスホネート系薬物のヒト食道癌細胞株に対する細胞毒性メカニズムの解明. 第24回日本医療薬学会年会(名古屋), 2014.9.28

福島沙織 他：ヒト食道癌細胞株の増殖に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響. 日本薬学会第134年会(熊本), 2014.3.30

高梨仁美 他：ヒト食道癌細胞株におけるビスホスホネート系薬物の増殖抑制作用とそのメカニズムの解明. 第3回4大学連携研究フォーラム(京都), 2013.12.9

森岡千尋 他：ヒト食道癌細胞株に対するビスホスホネート系薬物の細胞増殖抑制作用. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会(京都), 2013.10.12

真鍋友紀 他：食道がん化学放射線療法適用後の長期予後と VEGF 遺伝子型との関係 .
第 23 回日本医療薬学会年会 (仙台),
2013.9.28

6 . 研究組織

(1)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： 8 0 3 7 9 4 3 7

(2)研究分担者

辻本 雅之 (Tsujimoto, Masayuki)
京都薬科大学 薬学部・講師
研究者番号： 9 0 3 7 2 7 3 9

峯垣 哲也 (Minegaki, Tetsuya)
京都薬科大学 薬学部・助教
研究者番号： 1 0 5 4 9 3 0 6