

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15318

研究課題名(和文) 乳がん骨転移に対する化学放射線療法における新規アプローチ

研究課題名(英文) Novel approach with chemoradiotherapy for bone metastasis on breast cancer

研究代表者

皆巳 和賢(MINAMI, KAZUMASA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：90634593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、乳がんに対して放射線とdopamine receptor標的薬の作用機構が異なる治療を行い、治療耐性を克服し従来の治療法に比べ有意に抗腫瘍効果ならびに転移抑制効果がみられるか否かを検討した。細胞実験の結果、放射線とdopamine receptor標的薬の併用により、有意に殺細胞効果ならびに遠隔転移に関わる因子である、細胞運動能、浸潤能を抑制することに成功した。さらに、動物実験においても、細胞実験同様、抗腫瘍効果ならびに遠隔転移抑制効果がみられた。結論として、乳がんの治療に放射線とdopamine receptor標的薬の併用の意義が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは罹患する年齢が特徴的であり、30代前半から増加し始め40代後半から50代前半でピークを迎える。これは正に子育て世代から働き盛りの世代を直撃するがんであり、社会への打撃も大きい。ステージ となると5年生存率が30%程度まで落ちる。中でも、乳がんの骨転移は比較的発生しやすく痛みを伴うことから患者のQuality of life (QOL) を著しく低下させる。よって、乳がんの骨転移抑制を視野に入れた治療法の確立が課題である。

本研究課題により、放射線とdopamine receptor標的薬の併用が骨吸収抑制を行いつつ、一定の抗腫瘍効果ならびに転移抑制効果が得られる事が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether radiation and dopamine receptor-targeted drugs, which have different mechanisms of action, are significantly anti-tumor and anti-metastatic compared to conventional therapies for breast cancer. In cell experiments, the combination of radiation and dopamine receptor-targeted drugs significantly inhibited the cell survival, motility and invasion. Furthermore, in animal experiments, the antitumor and distant metastasis inhibitory effects were observed as well as in vitro study.

In conclusion, the significance of the combination of radiation and dopamine receptor-targeted drugs in the treatment of breast cancer was demonstrated.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん転移 乳がん X線 炭素イオン線 ドーパミンレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんは現在も、女性のがん種別罹患率でトップである。乳がんは罹患する年齢も特徴的であり、30代前半から増加し始め40代後半から50代前半でピークを迎える。これは正に子育て世代から働き盛りの世代を直撃するがんであり、社会への打撃も大きい。乳がんの骨転移は比較的発生しやすく痛みを伴うことから患者の Quality of life (QOL) を著しく低下させる。近年では、種々の抗がん剤に加え、Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) 阻害剤などを併用する。破骨細胞への分化を抑制し骨吸収(骨が分解され破壊されること)を抑えることが可能であり、結果として骨量の低下を防ぐ。しかし、重篤な副作用が出た場合、顎骨壊死が発生するなどのリスクも伴うことと、これらの薬自体に抗腫瘍効果は殆どない。一方、放射線照射の役割は緩和目的が主である。疼痛を取り除き、骨転移で脆くなった骨の骨折を予防することが可能である。そこで、骨転移性乳がんに対する新たなアプローチとして、化学放射線療法を用いることで乳がんの骨転移治療法を一体化する着想を得た。

自身の先行研究により、ストレス応答因子である eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) のリン酸化が亢進すると破骨細胞分化マーカーである NFATc1 の発現が抑制されること、dopamine receptor D1 agonist である A77636 が、eIF2 $\alpha$  を介して破骨細胞の分化を抑制することを見出した<sup>1,2)</sup>。特に A77636 の効果は、現在臨床で使用されている上記薬剤と同等以上の骨吸収抑制効果を有しており、加えて抗腫瘍効果・細胞運動抑制効果も併せ持つ。ただし、dopamine receptor D1 の agonist を用いた動物実験の結果、一定の薬剤投与量を超えた段階で、タフィラキシー(薬剤の反復投与により薬剤が急速に効果を失うこと)が生じ、一時的に腫瘍を縮小させ、骨量を増強させるものの、完全な腫瘍消失および十分な骨量維持には至らなかった。これでは、現行の治療と同じく進行性の乳がんの根治に至らない。本研究課題では、放射線と dopamine receptor 標的薬の作用機構が異なる治療を行い、治療耐性を克服し従来の治療法に比べ有意に抗腫瘍効果ならびに転移・骨吸収抑制効果がみられるか否かを問こととした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、dopamine receptor D1 agonist、放射線(線、炭素イオン線)の併用による骨転移性乳がんに対する化学放射線療法を確立するための基礎的データを提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞実験

細胞は、ヒト乳癌細胞株 MDAMB-231(トリプルネガティブ型)を用いた。dopamine receptor D1 agonist は、A77636 を用いた。放射線には、 $\gamma$  線、炭素イオン線の2種を用いた。薬剤の毒性試験のために MTT assay を行った。照射3時間前に薬剤を添加し、3 Gy 照射後の細胞生残率を Colony formation assay、遊走能を Boyden chamber assay、浸潤能を Matrigel invasion assay を用いて評価した。タンパク発現解析の為に Western Blotting を行った。

### (2) 動物実験

動物には BALB/c メス 5 週齢を用いた。細胞はマウス乳腺腫瘍細胞 4T1 を用いた。皮下に細胞を移植し腫瘍増殖抑制を判定するモデル、マウス尾静脈から細胞を移植し肺転移能を判定するモデルの2パターン作成した。マウス群は、無治療群、放射線治療群、薬剤治療群、放射線薬剤併用群の4群を作成し、それぞれの群で10匹用意した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞実験

まず初めに、A77636 の細胞毒性を検討する為に MTT assay を行った。薬剤濃度 5  $\mu$ M で細胞死がコントロール(薬剤投与なし)に比べて有意に減少する結果を得た(図 1)。

この結果を基に、 $\gamma$  線と 5  $\mu$ M A77636 による殺細胞効果を Colony formation assay にて検討した結果、 $\gamma$  線単独または A77636 単独投与された細胞に比べて、 $\gamma$  線と A77636 の併用により殺細胞効果が増強される結果を得た。一方、炭素イオン線を用いて同様の実験を行った結果、 $\gamma$  線を用いた実験と同様の傾向がみられた。よって、放射線と dopamine receptor D1 agonist の併用は、それぞれの単独治療よりも殺細胞効果が増強することが示された(図 2)。次に、がん転移に関与する因子である細胞遊走能、浸潤能を検討した。 $\gamma$  線照射単独に比べて  $\gamma$  線と A77636 の併用は、遊走能と低下させた。浸潤能に関しては、A77636 が浸潤能抑制に効果的であり、 $\gamma$  線の寄与は少ないことが分かった。一方、炭素イオン線は、照射単独で細胞遊走能、浸潤能共に抑制した。さらに A77636 との併用により、炭素イオン線単独に比べて有意に浸潤能を抑制する結果を得た(図 3)。

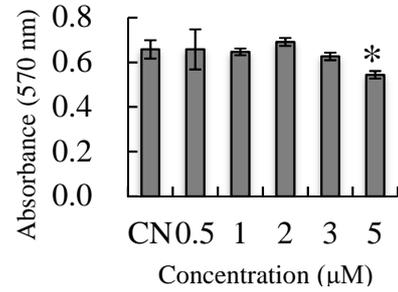


図 1: 乳がん細胞に対する dopamine receptor D1 agonist の毒性試験。\*  $p < 0.05$  (v.s. CN)

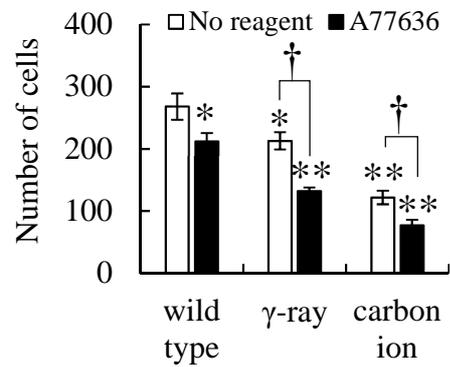


図 2: 乳がん細胞に対する放射線と dopamine receptor D1 agonist 併用による殺細胞効果の比較。\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (v.s. wild type No reagent)、†  $p < 0.05$

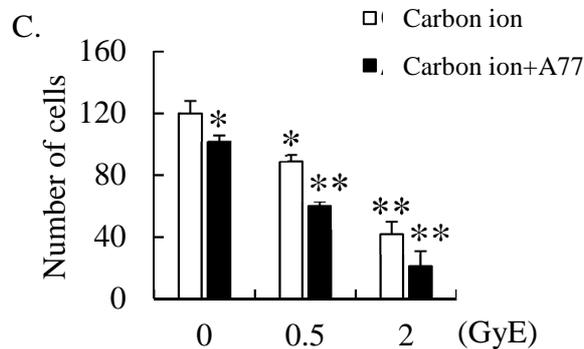
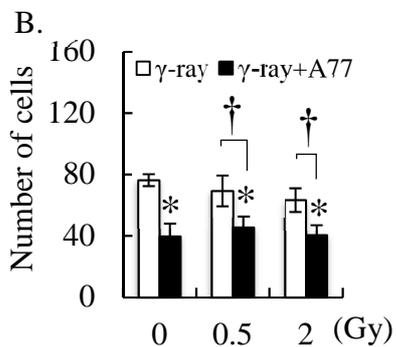
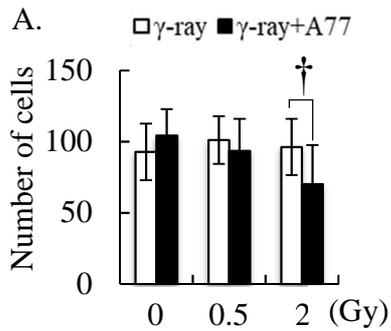


図 3: 乳がん細胞に対する放射線と dopamine receptor D1 agonist 併用による細胞遊走能ならびに浸潤能の評価。 $\gamma$  線と dopamine receptor D1 agonist を用いた遊走能 (A) と (B) 浸潤能。(C) 炭素イオン線と dopamine receptor D1 agonist を用いた浸潤能。\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (v.s.  $\gamma$ -ray 0 Gy or Carbon ion 0 Gy)、†  $p < 0.05$

分子メカニズムとして CaM/Rac 経路に着目した。A77636 は、CaM の発現を抑制し、細胞浸潤能を抑制していることが分かった (図 4-5)。また、A77636 および炭素イオン線照射において、PP1 の発現が抑制されており、炭素イオン線と A77636 の併用効果は、PP1 発現抑制を介して強力に CaM/Rac 経路を制御し、細胞浸潤能を抑制することが分かった (図 6A)。また、A77636 の単独作用として、がんの代謝や骨代謝に関わる Wnt の共受容体である Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP 5) が dopamine receptor 標的薬によって発現低下を起こし、その結果がんの増殖や転移に関わる Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、Matrix metalloproteinases 9 (MMP9)、Src、Snail といったタンパク発現が抑制されることを見出した (図 6B)。

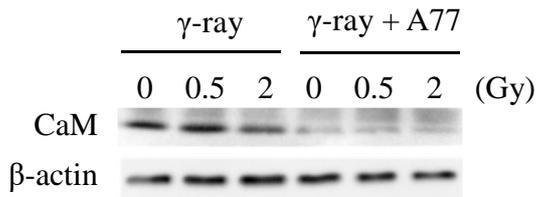


図 4: 乳がん細胞に対する 線照射ならびに dopamine receptor D1 agonist を用いた 24 時間後の CaM タンパク発現。A77=A77636

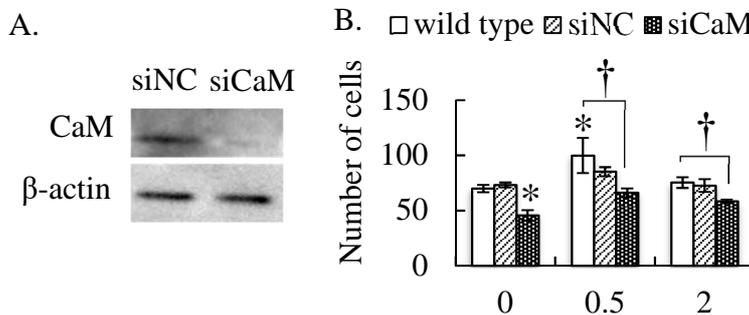


図 5: (A) CaM タンパクのノックダウンならびに (B) CaM ノックダウン乳がん細胞を用いた X 線照射 24 時間後の浸潤能の評価。\* p<0.05 (v.s. wild type 0 Gy)、† p<0.05

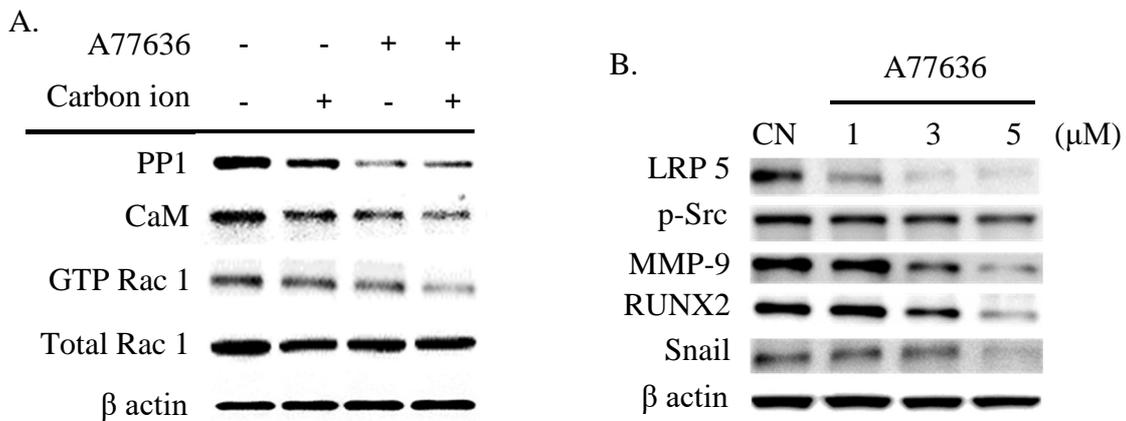


図 6: (A) 炭素イオン線 0.5 GyE 照射ならびに A77636 (5 μM) 投与 24 時間後のタンパク発現解析。(B) dopamine receptor D1 agonist の抗腫瘍効果に関するタンパク発現解析。CN = control

## (2) 動物実験

### A) 腫瘍増殖抑制モデル

腫瘍細胞を右下腿皮下に接種後、腫瘍体積が 100 mm<sup>3</sup> となった時点で治療を開始した。X 線は 10 Gy を、炭素イオン線は X 線 10 Gy 相当である、10 GyE を腫瘍に照射した。A77636 は、治療開始日より毎日 2.0 mg/kg を腹腔投与した。21 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を評価した。6 群の内、最も腫瘍増殖遅延がみられた群は炭素イオン線と A77636 併用群であった (図 7)。しかし、X 線と A77636 併用群と比較して有意な差はみられなかった。

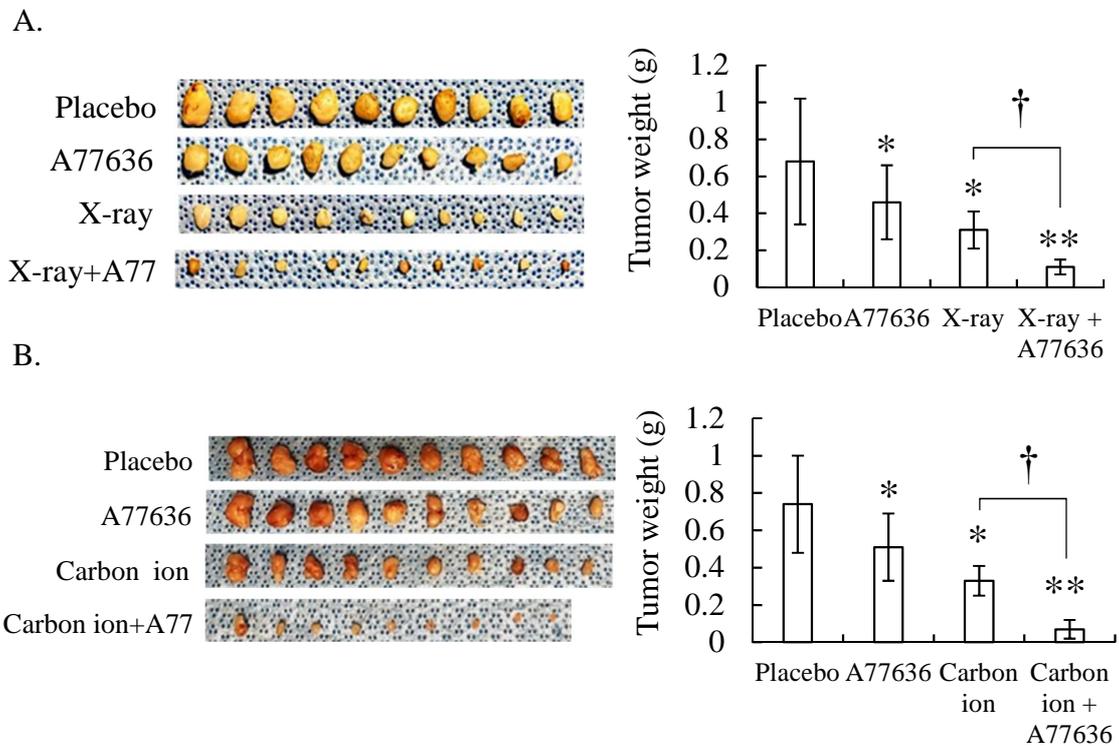


図 7: 放射線と dopamine receptor D1 agonist の併用がマウス腫瘍増殖能に与える影響 (A) X 線と dopamine receptor D1 agonist の併用。(B) 炭素イオン線と dopamine receptor D1 agonist の併用。\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (v.s. Placebo)、†  $p < 0.05$

### B) 肺転移モデル

放射線照射 24 時間後の生残細胞もしくは未照射の細胞をマウス尾静脈から接種した。A77636 は、腫瘍細胞接種日より毎日 2.0 mg/kg を腹腔投与した。21 日目にマウスをサクリファイスした後、肺を摘出し、肺の転移結節数を評価するために肺の薄切標本を作製し、HE 染色を行った。最も、肺転移抑制効果がみられたマウス群は、腫瘍増殖と同様に炭素イオン線と A77636 併用群であった。さらに、X 線と A77636 併用群と比較して有意な差がみられた (図 8)。

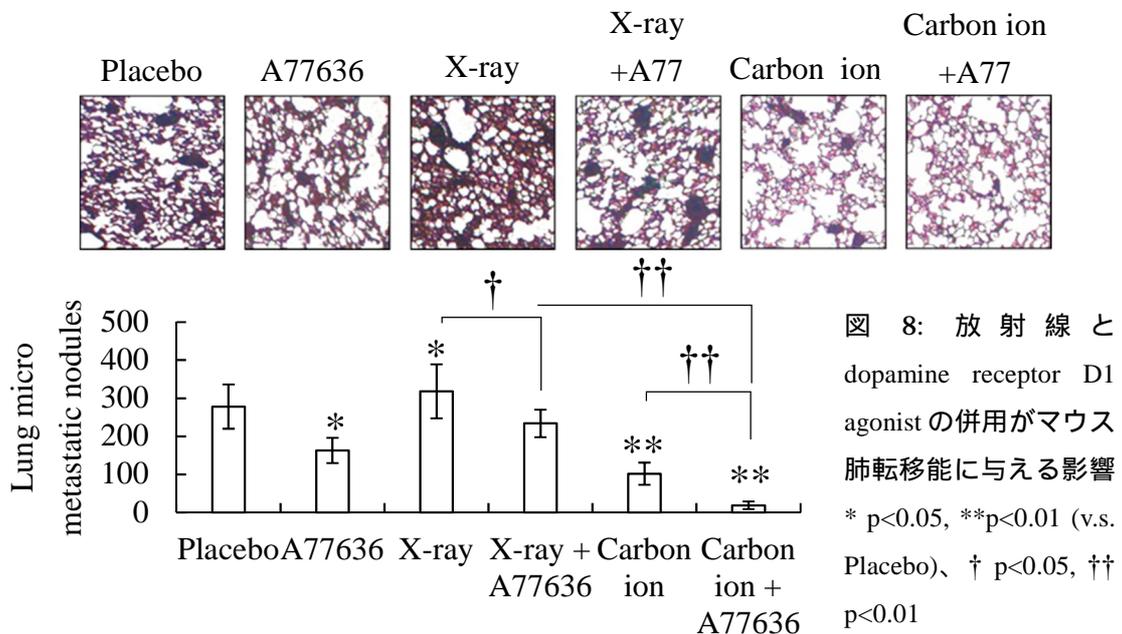


図 8: 放射線と dopamine receptor D1 agonist の併用がマウス肺転移能に与える影響 \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (v.s. Placebo)、†  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takahashi Y, Yasui T, Minami K, Tamari K, Hayashi K, Otani K, Seo Y, Isohashi F, Koizumi M, Ogawa K.	4. 巻 10(6)
2. 論文標題 Carbon ion irradiation enhances the antitumor efficacy of dual immune checkpoint blockade therapy both for local and distant sites in murine osteosarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 633-646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakano H, Minami K, Yagi M, Imaizumi H, Otani Y, Inoue S, Takashina M, Seo Y, Takahashi Y, Sumida I, Ogawa K, Koizumi M.	4. 巻 59(4)
2. 論文標題 Radiobiological effects of flattening filter-free photon beams on A549 non-small-cell lung cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Radiat Res.	6. 最初と最後の頁 442-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rry041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shishido A, Mori S, Yokoyama Y, Hamada Y, Minami K, Qian Y, Wang J, Hirose H, Wu X, Kawaguchi N, Nagumo S, Matsuura N, Yamamoto H.	4. 巻 40(4)
2. 論文標題 Mesothelial cells facilitate cancer stem like properties in spheroids of ovarian cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 2105-2114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jiang F, Jalali A, Deguchi C, Chen A, Liu S, Kondo R, Minami K, Horiuchi T, Li BY, Robling AG, Chen J, Yokota H.	4. 巻 37(3)
2. 論文標題 Finite-element analysis of the mouse proximal ulna in response to elbow loading.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab.	6. 最初と最後の頁 419 - 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-018-0943-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu S, Fan Y, Chen A, Jalali A, Minami K, Ogawa K, Nakshatri H, Li BY, Yokota H.	4. 巻 78(14)
2. 論文標題 Osteocyte-Driven Downregulation of Snail Restrains Effects of Drd2 Inhibitors on Mammary Tumor Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 3865-3876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Minami K	4. 巻 75(2)
2. 論文標題 The Biological Effect of Photon and Particle Beam	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai zasshi	6. 最初と最後の頁 195 - 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.6009/jjrt.2019_JSRT_75.2.195">https://doi.org/10.6009/jjrt.2019_JSRT_75.2.195</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamari K, Sano K, Li Z, Seo Y, Otani K, Tatekawa S, Toratani M, Takaoka Y, Takahashi Y, Minami K, Isohashi F, Koizumi M, Ogawa K	4. 巻 39(9)
2. 論文標題 Ro 90-7501 Is a Novel Radiosensitizer for Cervical Cancer Cells that Inhibits ATM Phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 4805 - 4810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.21873/anticanres.13665">https://doi.org/10.21873/anticanres.13665</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang L, Wang Y, Chen A, Teli M, Kondo R, Jalali A, Fan Y, Liu S, Zhao X, Siegel A, Minami K, Agarwal M, Li BY, Yokota H	4. 巻 33(12)
2. 論文標題 Pitavastatin slows tumor progression and alters urine-derived volatile organic compounds through the mevalonate pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB journal	6. 最初と最後の頁 13710-13721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1096/fj.201901388R">https://doi.org/10.1096/fj.201901388R</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kondo R, Adachi T, Minami K, Koizumi M.
2. 発表標題 Comparison of the effect of X-ray, carbon ion beam and proton beam on metastatic potential.
3. 学会等名 PTCOG 57th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 足立 孝則、皆巳 和賢、近藤 梨加、小泉 雅彦
2. 発表標題 乳がん細胞におけるChk1 inhibitorと放射線併用によるがん転移能への影響
3. 学会等名 第24回 癌治療増感研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minami K
2. 発表標題 Comparison of the effect of photon and particle beam on metastatic potentials.
3. 学会等名 GICore summer school 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 皆巳 和賢、高橋 豊、玉利 慶介、瀬尾 雄二、大谷 啓祐、鈴木 修、磯橋 文明、小泉 雅彦、小川 和彦
2. 発表標題 線質、線量の違いによる細胞遊走・浸潤能に与える影響
3. 学会等名 第21回 菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumasa Minami, Yutaka Takahashi, Keisuke Tamari, Yuji Seo, Keisuke Otani, Osamu Suzuki, Fumiaki Isohashi, Kazuhiko Ogawa.
2. 発表標題 Combination therapy using a dopamine receptor D1 agonist and radiation inhibit mammary tumor growth and bone metastatic potentials.
3. 学会等名 第9回 国際放射線神経生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami K
2. 発表標題 The effect of radiation on metastatic potentials.
3. 学会等名 GICore summer school 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 皆巳 和賢
2. 発表標題 放射線生物学・腫瘍学の基礎
3. 学会等名 日本放射線技術学会 近畿支部 秋季勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考