

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790981
 研究課題名（和文） ガス分子による癌治療 一酸化窒素（NO）ドナーを用いた肺癌治療の
 開発
 研究課題名（英文） Anti-cancer therapy by gaseous molecules

研究代表者
 朝倉 啓介（ASAKURA KEISUKE）
 慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）
 研究者番号：90383786

研究成果の概要：

ヒト肺癌細胞株・悪性胸膜中皮腫細胞株に対して、*in vitro* で一酸化窒素ドナー-DETA-NO がアポトーシスを誘導することを確認した。その効果は低酸素（1%）環境下で増強した。ヒト肺癌細胞株・悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス胸腔移植モデルを作成した。特に悪性胸膜中皮腫のリンパ節転移モデルはこれまでに報告がない貴重なモデルである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 活性酸素やフリーラジカルが生命維持に不可欠な生体成分や代謝系を破壊することにより、広範な疾患に関与していることが明らかになりつつある。一方、活性酸素は感染防御の主役を担うと同時に、生体高分子の酸化還元反応を介してシグナルを伝える生理活性分子でもある。一酸化窒素ラジカル(Nitric Oxide:NO)は、その多彩な生理機能のゆえに

注目を浴びている酸素代謝産物である。本ガス状ラジカルは細胞膜脂質二重層を自由に透過し、動脈組織では平滑筋細胞内のグアニル酸シクラーゼを直接活性化して循環動態を制御、中枢および末梢組織では神経伝達物質として作用する。これは従来のリガンドと受容体の関係に関する古典的な概念とは全く異なるものである。

(2)NOが腫瘍に与える影響について近年多くの知見が得られてきている。マクロファージ (Jiang H et al 1992)、クッパー細胞 (Fukumura D et al 1996)、NK細胞 (Xiao L et al 1995)、内皮細胞 (Li LM et al 1991) が放出するNOが、各種癌細胞において殺癌効果を持つことが明らかになっている。またNOは膀胱癌 (Gansauge S et al 1998)、乳癌 (Mortensen K et al 1999)、大腸癌 (Kwak JY et al 2000)、膀胱癌 (Fabbri F et al 2005) にアポトーシスを誘導する。その一方で、Bリンパ球 (Mannick JB et al 1994)、胸腺細胞 (Gerano AM et al 1995)、肝細胞 (Tzeng E et al 1998) において低濃度のNOがアポトーシスを抑制することも観察されている。NOが腫瘍細胞に対して抑制的に働くか促進的に働くかは、癌細胞の性質、発癌局所の循環動態、局所のNO濃度、酸素代謝動態などにより大きく異なると考えられる。その様相を定量的に把握することが、NOによるエネルギー依存性反応の特異的制御や殺癌作用を有効に発現させるために不可欠である。

(3)NOによる細胞障害機構としては、ミトコンドリア電子伝達系の阻害、DNAに対する直接的ダメージ、ERストレスを介したアポトーシス、MAPKを介したアポトーシスなどが重要とされているが、腫瘍細胞においては十分に解明されているとは言えない。

(4)腫瘍細胞においては分裂増殖の制御機構が破綻している。腫瘍が組織塊としてある程度以上の大きさに達すると血管新生が誘導されることが明らかとなっているが、血管新生も統制に乏しく、組織量と血管の量および分布とのバランスが正常組織と比べて著しく不均等である。このため腫瘍組織は酸素分圧1~4Torrという極端な低酸素状態(正常組

織は30~40Torr)におかれている。このような低酸素状態にある腫瘍細胞は放射線治療、化学療法に対する感受性が低下していることが知られている。腫瘍組織における低酸素状態は腫瘍細胞の悪性化、治療抵抗性を高める大きな要因の一つと考えられている。一方、本研究で展開を試みた治療法は、この腫瘍組織の特殊環境を逆に利用できる可能性がある。なぜなら大気下ではほんの数秒であるNOの寿命は、低酸素環境下では数分~数十分に延長するため、生体内では大気下よりもはるかに強い抗腫瘍効果を発揮すると期待されるからである。これはNOドナーが腫瘍組織に特異的に障害効果をもたらす治療的投与量が設定され得る可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的はNOドナーを用いた新しい抗癌治療の開発であり、*in vitro*、*in vivo*において最も効率的に殺腫瘍効果を発揮するNOドナーの種類、投与量を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)細胞培養実験

細胞株としてヒト肺癌細胞株 (PC-9、PC-13、A549、RERF-LC-A1、RERF-LC-KJ)、悪性胸膜中皮腫細胞株 (ACC-MESO1、ACC-MESO4) を用いる。D-MEM培地 (10%ウシ胎児血清、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml) を主として使用し、実験中原則としてP3まで継代する。細胞数はマイクロメーターで計測し、生死判定はトライパブルー染色で行う。細胞をdishから剥がすには0.05%トリプシン/EDTAを用いる。

NO ドナー : DETA -NO(Cayman chemical、半減期 20 時間)、SIN -1(Biomol International)、NOC -5 (半減期 93 分)、NOC -12 (半減期 327 分)、SPER/NO (半減期 230 分)、NCX4040 (NO -donating aspirin) などを用いる。これらを様々な濃度で培地中に添加し効果を判定する。抗腫瘍効果の観点からは、NO ドナーは半減期が長いものがより望ましい。その点で、37 度で 20 時間という長い半減期をもつ DETA -NO は最も有力と考えられる NO ドナーである。

細胞培養:P3 まで継代した腫瘍細胞を 60mm ディッシュに 20×10^3 個/cm² で撒く。培地は D-MEM 培地 (10%ウシ胎児血清、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml を添加) を用いる。各種 NO ドナーを様々な濃度で D-MEM 培地に加え(例えば DETA/NO、SIN -1 の場合は終濃度 100 μ M ~ 500 μ M)、すぐにインキュベーターに入れる。NO ドナーを加えないコントロール群も作る。インキュベーターは酸素濃度 20% (normoxia) と酸素濃度 1% (hypoxia) の 2 つを用意する。いずれの条件も温度 37 $^{\circ}$ C、湿度 70% とする。酸素濃度 1% のインキュベーターは、腫瘍細胞の虚血再灌流障害を避けるために実験終了まで決して扉を開けない。NO ドナー投与 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間後にインキュベーターからディッシュを取り出す。マイクロメーターで細胞数をカウントし、細胞密度を把握、発育速度を測定比較する。トライパブル染色を用いて生存細胞数を概算する。培養液中の LDH 濃度を測定し、細胞死を定量的に評価する。多種の NO ドナーや濃度設定が必要なたため、実験群は多数にわたる。このためまずは生存細胞数を評価して、候補 NO ドナーの種類、濃度、培養時間の絞込みを行う。

アポトーシスアッセイ : 腫瘍細胞死のうちアポトーシスによるものの比率を評価する。前述したように NO による細胞死にはネクローシスとアポトーシスの両者がありうる。アポトーシスの評価には APOPercentage™(Biocolor Ltd) を用いる。方法は、インキュベーターから取り出したディッシュの培地にキット付属の色素を添加し、インキュベーターに戻す。30 分後にディッシュを取り出したのち、培地を除去し、細胞を PBS で洗浄する。アポトーシス細胞のみが染色されるので、その数を計測する。

(2) マウス移植腫瘍実験

動物種 : NOD/SCID nu1 マウス (NOG マウス) (実験動物中央研究所)
NOG マウスは T 細胞、B 細胞機能に加えて NK 細胞機能も障害されている免疫不全マウスであり、従来の免疫不全マウスよりヒト腫瘍細胞の生着率が高く、転移巣を形成しやすいという特徴がある。

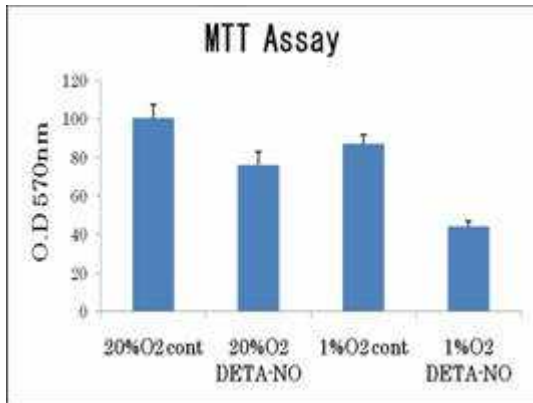
腫瘍細胞株 : RERF-LC-A1、RERF-LC-KJ、ACC-MESO1

腫瘍発育観察 : NOG マウス背部皮下に腫瘍 2×10^6 個を注入する。3 週間で 2-3cm 大の皮下腫瘍が形成されるので、その時点で腫瘍内に各種 NO ドナーを様々な濃度で経皮的に注入する。また、NOG マウスの胸腔内に腫瘍 2×10^6 個を注入すると 1 ヶ月で胸腔内に 1cm 大の腫瘍が形成される。胸腔内に NO ドナーを (DETA -NO なら 200 μ M/200 μ L を週 3 回・4 週間) 注入して腫瘍発育に与える影響を評価する。

4 . 研究成果

(1) In vitro において最も強い殺細胞効果を発揮したのは DETA -NO (Cayman chemical) であった。DETA -NO は中時間作用型 (半減期 500 時

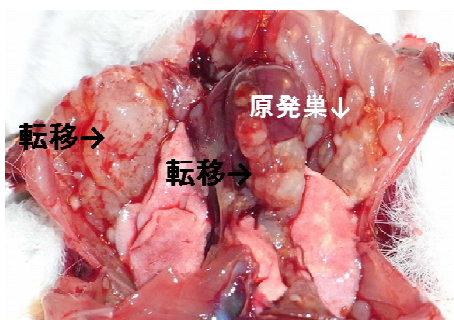
間)のNOドナーであるため細胞に対して比較的長時間作用することができる。またNOの半減期は低酸素環境下で長くなるため、1%酸素環境下で殺細胞効果が増強した。DETA-NOの濃度が200 μ Mで低酸素濃度下と通常酸素濃度下の抗腫瘍効果の差が最大化した。100 μ Mではどちらの条件でも増殖抑制効果が小さく、500 μ Mではどちらの条件でも腫瘍細胞は全滅してしまった。



【図1】ACC-MESO1細胞に200 μ M・DETA-NOを投与して24時間後のMTTアッセイ

(2)また、200 μ MのDETA-NOを投与によりACC-MESO1細胞にアポトーシスが誘導されることを、JC-1アッセイで確認した。

(3)In vivoでのNOドナーの抗腫瘍効果を検討するために、実験動物中央研究所が開発した免疫不全マウス・NOD/SCID/ nullマウス(NOGマウス)を用いた。NOGマウスの背部皮下にRERF-LC-KJ、RERF-LC-AIが生着し、肝転移を形成することを確認した。また、ACC-MESO1を胸腔内に生着し、さらに縦隔・対側リンパ節転移を生じることを確認した。いずれも局所効果だけでなく転移の抑制効果も評価できる有用なモデルであるが、特にヒト悪性胸膜中皮腫のリンパ節転移モデルはこれまでに報告がないものである。



【図2】ヒト悪性胸膜中皮腫のリンパ節転移モデル

(4)NOGマウス皮下に移植したRERF-LC-KJ細胞腫瘍塊に200 μ M・200 μ LのDETA-NOを週3回・4週間局注すると、4週間後の腫瘍サイズがコントロール群に比べて有意に小さくなった。現在、前述した胸腔内移植モデルを用いて、胸腔内へのDETA-NO注入による抗腫瘍効果を検討している。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

朝倉啓介、「肺末梢小型陰影に対するCTガイド下肺針生検例の検討」第30回日本呼吸器内視鏡学会(2007年6月7日、東京)

Keisuke Asakura, “Percutaneous needle biopsy for peripheral lung lesions smaller than 2cm performed under fluoroscopic CT guidance” 12th World Conference On Lung Cancer (2007年9月3日、韓国・ソウル)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

朝倉 啓介(ASAKURA KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)
研究者番号: 90383786

(2)研究分担者

(3)連携研究者