

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461988

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種性転移に対する低浸透圧併用による抗癌剤腹腔内投与効果増強の試み

研究課題名(英文) Hypotonic stimulation enhances cellular uptake and cytotoxic effect of anticancer drug in gastric cancer cells

研究代表者

塩崎 敦 (Shiozaki, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40568086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌細胞株(MKN45)を各種低浸透圧環境下に、Oregon greenで蛍光標識されたパクリタキセル(PTX)で処理したところ、低浸透圧レベルに依存して、細胞内PTX濃度が上昇することが確認された。浸透圧の細胞増殖への影響は浮遊状態で特に顕著であり、低浸透圧刺激+PTX群の細胞増殖が最も抑制された。PTXの膜輸送体(OATP1B3、MDR1)の発現を解析したが、浸透圧変化に伴う遺伝子発現変化は認められなかった。ヌードマウス腹膜播種モデルを用い、播種結節へのPTX取り込みを蛍光顕微鏡で解析したところ、浸透圧の低下に伴い、PTXの播種結節への取り込みが、結節辺縁より上昇することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Intraperitoneal injection of paclitaxel (PTX) is the promising treatment option for peritoneal dissemination of gastric cancer (GC). This study examined whether hypotonic stimulation enhances cellular uptake and cytotoxic effect of PTX in GC cells. After MKN45 cells were incubated with Oregon green 488 PTX in the iso- or hypotonic solution, cellular uptake of PTX was determined by flow cytometer. After cells were incubated with PTX for 1h under iso- or hypotonic condition, the number of viable cells was counted at 48h after stimulation in order to examine cytotoxic effect of PTX. Since the fluorescence intensity of a MKN45 cell was significantly higher in the hypotonic condition, hypotonic stimulation enhanced cellular uptake of PTX. The number of viable MKN45 cells after stimulation was smaller in the hypotonic condition, suggesting that hypotonic stimulation enhanced cytotoxic effect of PTX. Hypotonic stimulation enhances cellular uptake and cytotoxic effect of PTX in MKN45 cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤の腹腔内投与療法は、胃癌腹膜播種性転移における有効な治療手段として注目されているが、浸透圧・イオン輸送体・水輸送体制御等の細胞生理学的観点から治療効果増強を試みた研究報告はほとんど存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、"低浸透圧刺激により抗癌剤の細胞内取り込みが亢進し、胃癌腹膜播種性転移に対する腹腔内投与の治療効果を増強できる。"という実験仮説の検証を行う。その結果から、低浸透圧刺激併用抗癌剤腹腔内投与療法という、細胞生理学的理論・手法を応用した、胃癌腹膜播種性転移に対する斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト胃癌細胞株における低浸透圧刺激下での細胞内 PTX 取り込みの解析

ヒト胃癌細胞株 (MKN45) を各種低浸透圧環境下に、蛍光標識された PTX で処理し、細胞内への PTX 取り込み、細胞外への PTX 排出をプレートリーダーを用いて測定する。また、浮遊細胞における PTX 取り込みも、フローサイトメトリーで解析する。

(2) ヒト胃癌細胞株における低浸透圧刺激・PTX の殺細胞効果の解析

胃癌細胞株を様々な PTX 濃度・低浸透圧条件下で一定時間処理した後、再培養することにより、増殖活性への影響を解析する。同時に、細胞周期・アポトーシスへの影響をフローサイトメトリーで解析する。

(3) マウス腹膜転移モデルを用いた、低浸透圧併用 PTX 腹腔内投与における、播種結節内 PTX 取り込み状況の解析

ヌードマウスの腹腔内にヒト胃癌細胞を接種し、腹膜播種モデルを作製。種々のレベルの低浸透圧液と、蛍光標識された PTX を一定期間腹腔内に投与する。腹膜播種結節を採取後、MVX10 MacroView (Olympus) や、凍結切片を蛍光顕微鏡で観察し解析する。蛍光標識された PTX の腫瘍組織内分布状況を解析することにより、浸透圧依存性に PTX が播種結節に移行するか否かを *in vivo* で確認する。

4. 研究成果

ヒト胃癌細胞株を用い、低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み・抗腫瘍作用への増強効果を解析した。まず、ヒト胃癌細胞株 (MKN45) を接着状態で各種低浸透圧環境下 (1/2, 1/4 浸透圧) に、Oregon green で蛍光標識された PTX (Flutax-2) で 2hr 処理し、細胞内への PTX 取り込みをプレートリーダーで測定したところ、低浸透圧レベルに依存して、細胞内 PTX 濃度が上昇することが確認できた (図 1)。また同時に、細胞外への PTX 排出を測定したが、低浸透圧依存的な傾向は認めら

れなかった。

次に、ヒト胃癌細胞株をトリプシン処理後、浮遊細胞 (single cell) の状態での低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み・抗腫瘍作用への増強効果を解析した。Oregon green で蛍光標識された PTX (Flutax-2) で処理し、細胞内への PTX 取り込みをフローサイトメトリーで解析したところ、低浸透圧刺激により、細胞内 PTX 濃度が上昇することが確認できた (図 2)。

低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み増強のメカニズムを解析するため、PTX の膜輸送体として知られる、OATP1B3、MDR1 の mRNA 発現を解析したが、浸透圧変化に伴う遺伝子発現変化は認められなかった (図 3)。このことより、低浸透圧に伴う PTX の細胞内取り込み亢進は、脂質二重層を介して生じた可能性が高いと考えられた。

更に、胃癌細胞株を低浸透圧刺激の有無・PTX の投与の有無別に 4 群化し、single cell の状態で一定時間処理後に再培養し、細胞増殖を解析したところ、低浸透圧刺激+PTX 群の細胞増殖が最も抑制された (図 4)。一方で、4 群における細胞周期 (図 5)・アポトーシス解析 (図 6) を行ったが、PTX に生じた変化に対する低浸透圧の上乗せ効果は認められなかった。

次に、ヌードマウス腹膜播種モデルを用い、播種結節への PTX 取り込みを解析した。腹膜播種結節を採取後、MVX10 MacroView を用いて解析したところ、蛍光標識された PTX の播種結節への取り込みが確認できた。また、凍結切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、浸透圧の低下に伴い、蛍光標識された PTX の播種結節への取り込みが結節辺縁より上昇することが確認できた (図 7)。これらの成果を英文論文としてまとめ、投稿予定である。

一方で、*in vivo* モデルにおける低浸透圧液腹腔内投与の安全性の確認、マウス胃癌腹膜転移モデルを用いた低浸透圧処理による腹膜播種形成抑制効果を解明した (Biomed Res Int. 2014)。また、癌細胞への温熱刺激における、水輸送体アクアポリン 5 の Autophagy を介する制御機序の解明 (Int J Oncol. 2017) や、イオン・水輸送体の制御を介して、低浸透圧殺細胞効果が増強されることを示した (J Cancer. 2016)。これらの成果から、イオン・水輸送体や温度制御が、低浸透圧による薬剤取り込みの更なる増強に活用できる可能性が示唆された。

同時に、消化器癌における AE1 (Oncotarget. 2017)、NHE1 (Oncotarget. 2017)、TRPM7 (Anticancer Res. 2017)、CA12 (Journal of Cancer. 2015)、KCC3 (Biomed Res Int. 2014)、NKCC1 (World J Gastroenterol. 2014) 等の細胞生理学的因子の機能解析・臨床病理学的意義を解明した。更に、癌幹細胞に特異的に発現するイオンチャネルを同定し、選択的阻害による標的治療への可能性を解明した (J Gastroenterol. 2017)。

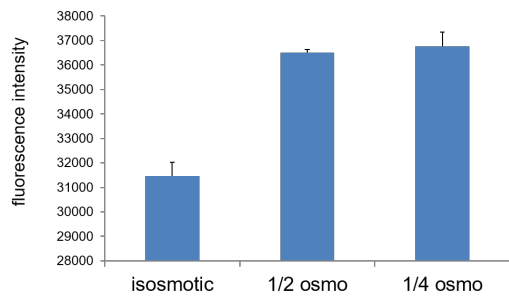


図1 低浸透圧刺激下の蛍光標識PTXの細胞内への取り込み亢進（接着細胞）

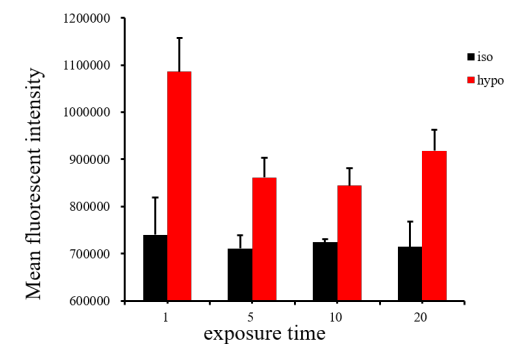
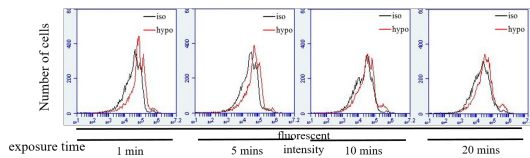


図2 低浸透圧刺激下の蛍光標識PTXの細胞内への取り込み亢進（浮遊細胞）

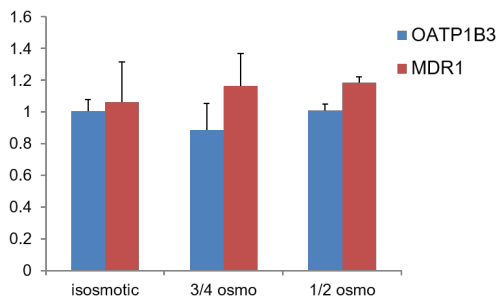


図3 低浸透圧刺激とPTX膜輸送体発現

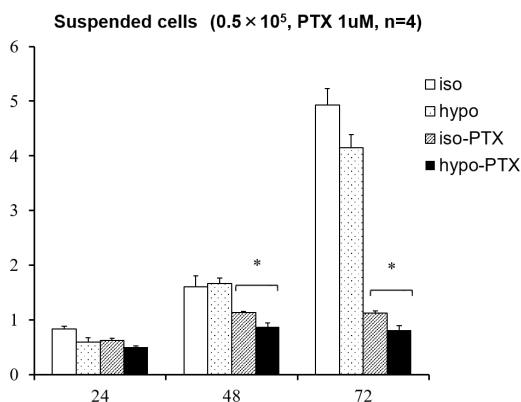


図4 低浸透圧刺激・PTXの細胞増殖への影響

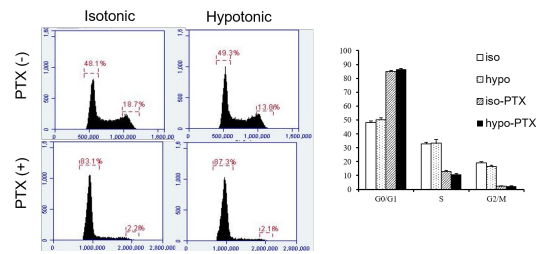


図5 低浸透圧刺激・PTXと細胞周期

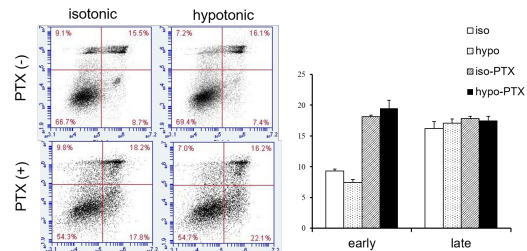


図6 低浸透圧刺激・PTXとアポトーシス

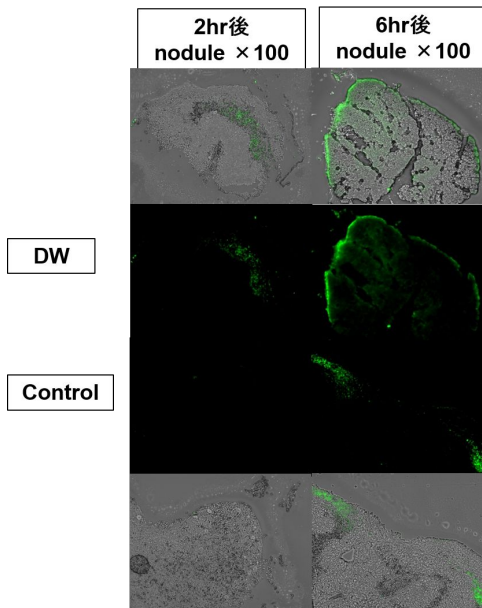


図7 播種結節への低浸透圧下PTXの取込み

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 26 件)

- (1) Shiozaki A, Kudou M, Ichikawa D, et al. Expression and role of anion exchanger 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:17921-17935. 査読有
- (2) Shiozaki A, Kudou M, Ichikawa D, et al. Esophageal cancer stem cells are suppressed by tranilast, a TRPV2 channel inhibitor. *J Gastroenterol*. 2017 Apr 7. doi: 10.1007/s00535-017-1338-x. [Epub ahead of print] 査読有

- (3) Shiozaki A, Ichikawa D, Kosuga T, et al. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J Physiol Sci*. 2017;6:353-360. 査読有
- (4) Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Heat shock exerts anticancer effects on liver cancer via autophagic degradation of aquaporin 5. *Int J Oncol*. 2017;50:1857-1867. 査読有
- (5) Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Transient Receptor Potential Melastatin 7 as an Independent Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017;37:1161-1167. 査読有
- (6) Hikami S, Shiozaki A, Kitagawa-Juge M, et al. The Role of cIAP1 and XIAP in Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Dig Dis Sci*. 2017;62:652-659. 査読有
- (7) Ariyoshi Y, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Na⁺/H⁺ exchanger 1 has tumor suppressive activity and prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:2209-2223. 査読有
- (8) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Hand-assisted technique beneficial for laparoscopic transhiatal esophagectomy with en-bloc dissection of middle and lower mediastinal lymph nodes: roles of the operator's left hand. *Esophagus*. 2017;14:138-145. 査読有
- (9) Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Inhibition of Regulatory Volume Decrease Enhances the Cytocidal Effect of Hypotonic Shock in Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer*. 2016;7:1524-33. 査読有
- (10) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Successful subcarinal dissection using a laparoscopic transhiatal approach for esophageal cancer with an anomalous pulmonary vein. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;64:239-42. 査読有
- (11) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Successful Management of a Perforated Interposed Substernal Ileocolon Caused by Right Pleural Hernia. *Ann Thorac Surg*. 2016;101:e5-7. 査読有
- (12) Ochi F, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Carbonic Anhydrase XII as an Independent Prognostic Factor in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer*. 2015;6:922-9. 査読有
- (13) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Laparoscopic transhiatal approach for resection of an adenocarcinoma in long-segment Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol*. 2015;21:8974-80. 査読有
- (14) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Esophagectomy with gastric tube reconstruction for patients who previously underwent free jejunal transfer. *Esophagus*. 2015;12:267-271. 査読有
- (15) Kitagawa M, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of gastric cancer MKN28 cells: accelerated degradation of the inhibitor of apoptosis family members. *Arch Biochem Biophys*. 2015;566:43-8. 査読有
- (16) Takemoto K, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Evaluation of the efficacy of peritoneal lavage with distilled water in colorectal cancer surgery: in vitro and in vivo study. *J Gastroenterol*. 2015;50:287-97. 査読有
- (17) Shimizu H, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol*. 2014;49:655-66. 査読有
- (18) Shiozaki A, Shimizu H, Ichikawa D, et al. Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17863-76. 査読有
- (19) Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, et al. Cellular physiological approach for treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20:11560-6. 査読有
- (20) Shiozaki A, Takemoto K, Ichikawa D, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:936401. 査読有
- (21) Shiozaki A, Ichikawa D, Takemoto K, et al. Efficacy of a hypotonic treatment for peritoneal dissemination from gastric cancer cells: an in vivo evaluation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:707089. 査読有
- (22) Shiozaki A, Nako Y, Ichikawa D, et al. Role of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in cell cycle progression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J*

- Gastroenterol. 2014;20:6844-59. 査読有
- (23) Shiozaki A, Iitaka D, Ichikawa D, et al. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. J Gastroenterol. 2014;49:853-63. 査読有
- (24) Shiozaki A, Fujiwara H, Konishi H, et al. Middle and lower esophagectomy preceded by hand-assisted laparoscopic transhiatal approach for distal esophageal cancer. Mol Clin Oncol. 2014;2:31-37. 査読有
- (25) Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, et al. Perioperative outcomes of esophagectomy preceded by the laparoscopic transhiatal approach for esophageal cancer. Dis Esophagus. 2014;27:470-8. 査読有
- (26) Shiozaki A, Ichikawa D, Fujiwara H, et al. Progress in cellular physiological researches on esophageal cancer. Journal of Tumor. 2014;2:241-245. 査読有
- [学会発表](計 31件)
- (1) 小菅敏幸、塩崎敦、市川大輔ら．低浸透圧刺激による胃癌細胞へのパクリタキセル取り込みおよび殺細胞増強効果．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (2) 塩崎敦、工藤道弘、市川大輔ら．食道扁平上皮癌におけるAnion Exchanger1の機能解析．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (3) 有吉要輔、塩崎敦、市川大輔ら．食道扁平上皮癌におけるNa⁺/H⁺ exchanger1(NHE1)の機能および臨床病理学的意義．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (4) 工藤道弘、塩崎敦、市川大輔ら．食道癌幹細胞におけるtransient receptor potential vanilloid 2阻害剤、traniLASTの抗腫瘍効果．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (5) 小林利行、塩崎敦、市川大輔ら．食道扁平上皮癌におけるAnion exchanger 2発現の意義．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (6) 山里有三、塩崎敦、市川大輔ら．食道扁平上皮癌におけるNISの発現と予後との相関．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (7) 樋上翔一郎、塩崎敦、樹下真希ら．食道扁平上皮癌細胞株を用いたTNF-誘導性アポトーシスにおけるIAPファミリー動態の検討．第75回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）：2016.10.6-8
- (8) Shiozaki A, Kudou M, Ichikawa D, et al. Roles of anion exchanger 1 in esophageal squamous cell carcinoma. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (9) Kitagawa-Juge M, Niisatto N, Shiozaki A, et al. A regulatory role of K⁺-Cl⁻ cotransporter in the cell cycle progression of breast cancer MDA-MB-231 cells. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (10) Kobayashi T, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. AE2, Anion exchanger 2, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (11) Tanaka S, Shiozaki A, Fujiwara H, et al. Expression of ALDH1 and/or CD44 in esophageal squamous cell carcinoma. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (12) Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Transient receptor potential melastatin 7 channel as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (13) Kosuga T, Shiozaki A, Kudou M, et al. Heat shock induces anticancer effects via regulation of aquaporin5. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (14) Ariyoshi Y, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Expression and role of sodium iodide symporter in gastric cancer. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (15) Kudou M, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. TRPV2, a potential novel target for anti-cancer therapy against esophageal cancer stem cells. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (16) Ariyoshi Y, Shiozaki A, Ichikawa

- D. et al. Function of Na⁺/H⁺ exchanger 1 and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto (Japan) : 2016.10.23-26
- (17) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら．胃癌細胞株における低浸透圧細胞破壊効果とカルシウム輸送制御による殺細胞効果増強の検討．第 116 回日本外科学会定期学術集会．大阪国際会議場（大阪府大阪市）：2016.4.14-16
- (18) 工藤道弘、塩崎敦、小菅敏幸ら．肝細胞癌に対する温熱刺激のアクアポリン 5 制御を介した抗腫瘍効果と、その機序の解明．第 116 回日本外科学会定期学術集会．大阪国際会議場（大阪府大阪市）：2016.4.14-16.
- (19) 小菅敏幸、塩崎敦、市川大輔ら．肝細胞癌における RVD 制御を介した低浸透圧殺細胞増強効果．第 116 回日本外科学会定期学術集会．大阪国際会議場（大阪府大阪市）：2016.4.14-16
- (20) 田中幸恵、塩崎敦、藤原斉ら．食道扁平上皮癌における ALDH1 および CD44 発現の検討．第 116 回日本外科学会定期学術集会．大阪国際会議場（大阪府大阪市）：2016.4.14-16
- (21) 小菅敏幸、塩崎敦、市川大輔ら．低浸透圧刺激による胃癌細胞へのパクリタキセル取り込み増強効果．第 74 回日本癌学会学術総会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.10.8-10
- (22) 塩崎敦、竹本健一、市川大輔ら．食道扁平上皮癌における K-Cl 共輸送体、KCC3 の機能解析．第 74 回日本癌学会学術総会．名古屋市：2015.
- (23) 清水浩紀、塩崎敦、市川大輔ら．胃癌の細胞遊走ならびに TNF シグナル伝達における Claudin1 の役割．第 74 回日本癌学会学術総会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.10.8-10
- (24) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら．胃癌細胞株に対する蒸留水細胞破壊効果の検証（in vivo and in vitro study）．第 74 回日本癌学会学術総会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.10.8-10
- (25) 有吉要輔、塩崎敦、市川大輔ら．マウス胃癌腹膜播種モデルにおける低浸透圧療法の安全性と治療効果の検討．第 115 回日本外科学会定期学術集会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.4.16-18
- (26) 越智史明、塩崎敦、藤原斉ら．食道扁平上皮癌における Carbonic Anhydrase XII 発現意義の検討．第 115 回日本外科学会定期学術集会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.4.16-18
- (27) 竹本健一、塩崎敦、市川大輔ら．腹腔内遊離細胞治療を目的とした大腸癌細胞株における低浸透圧細胞破壊効果とクローライドイオン輸送制御による殺細胞効果増強の検討．第 115 回日本外科学会定期学術集会．名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）：2015.4.16-18
- (28) 塩崎敦、清水浩紀、市川大輔ら．胃癌細胞における TNF- シグナル制御因子としての Claudin 1 の役割．第 114 回日本外科学会定期学術集会．国立京都国際会館（京都府京都市）：2014.4.3-5
- (29) Shiozaki A, Ishimoto T, Fujiwara H, et al. Roles of E2F5 in human esophageal squamous cell carcinoma. 14th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. Vancouver (Canada) : 2014.6.25-28
- (30) Nakashima S, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. Prognostic importance of the mitosis specific marker anti-phosphohistone H3 in esophageal squamous cell carcinoma. 14th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. Vancouver (Canada) : 2014.6.25-28
- (31) Nako Y, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. The functional analyses of Na(+)/K(+)/2Cl(-) cotransporter 1(NKCC1) in esophageal squamous cell carcinoma. 14th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. Vancouver (Canada) : 2014.6.25-28

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩崎 敦 (SHIOZAKI ATSUSHI)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40568086

(2) 研究分担者

大辻 英吾 (OTSUJI EIGO)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20244600