

口腔扁平上皮癌細胞株に対するゾレドロン酸の抗腫瘍効果

に与える細胞外カルシウムイオンの分子薬理的解析

Molecular and pharmacological analysis of extracellular Ca^{2+} -dependent enhancement of antitumor effect of zoledronic acid in human oral cancer cells

富山大学大学院医学薬学研究部 歯科口腔外科学講座
井上さやか

目次

1. 要旨.....	4
2. 序文.....	5
2-1. ビスフォスフォネート製剤 (BPs 製剤)	5
2-2. 口腔癌.....	5
2-3. 口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤.....	6
3. 研究材料および方法.....	8
3-1. 細胞株および細胞培養.....	8
3-2. 薬剤.....	8
3-3. 細胞増殖能の測定.....	8
3-4. アポトーシス解析 (FITC 標識アネキシン V-PI 染色)	9
3-5. ウェスタンブロット法による解析.....	9
3-6. 蛍光免疫染色法による解析.....	9
3-7. ミトコンドリア膜電位測定.....	10
3-8. 細胞形態の観察.....	10
3-9. LDH 活性の解析.....	10
3-10. 細胞内へのカルシウムイオンの取り込み.....	11
3-11. Rhod2 によるミトコンドリアカルシウムイオンの解析.....	11
3-12. 統計解析.....	11
4. 結果.....	12
4-1. 様々な癌細胞株においてゾレドロン酸が細胞増殖およびアポトーシスに及ぼす影響.....	12
4-2. ゾレドロン酸による細胞増殖抑制効果に及ぼす細胞外カルシウムイオンの影響.....	12
4-3. ゾレドロン酸によるアポトーシス誘導に及ぼす細胞外カルシウムイオンの影響.....	14
4-4. ゾレドロン酸の増殖抑制効果に対する細胞株の特異性と細胞外カルシウムイオンの役割.....	15
5. 考察.....	17
5-1. ゾレドロン酸が抗腫瘍効果を引き起こす濃度について.....	17
5-2. 細胞外カルシウムイオンによるゾレドロン酸の細胞増殖抑制効果	

	の増殖について.....	18
5-3.	ゾレドロン酸が誘導するアポトーシスとカルシウムイオンの関与につ いて.....	19
5-4.	本研究の臨床への発展.....	20
6.	謝辞.....	22
7.	図表.....	23
8.	参考文献.....	49

1. 要旨

ビスフォスフォネート製剤 (BPs 製剤) は様々な癌細胞に対して直接的な抗腫瘍効果があると報告されている。一方、口腔扁平上皮癌は原発巣において直接顎骨浸潤する特徴を持つ。私は、窒素含有で骨吸収抑制が最も強い BPs 製剤であるゾレドロン酸 (ZA) とカルシウムイオンの組み合わせが口腔扁平上皮癌細胞株の増殖やアポトーシスに与える影響を検討した。

口腔扁平上皮癌細胞株、乳癌細胞株、大腸癌細胞株に対して、様々な濃度のカルシウムイオン存在下に ZA を作用させた。培地中に含まれるカルシウムイオン濃度 (0.6 mM) では ZA は 3 μ M で口腔扁平上皮癌細胞株の細胞増殖を抑制した。これは、過去に報告された他の癌細胞株を用いた *in vitro* の実験で増殖抑制を示す ZA 濃度よりもかなり低かった。さらに、細胞外カルシウムイオン濃度を上昇させると ZA の細胞増殖抑制は増強された。そのカルシウムイオンにより増強された ZA の細胞増殖抑制効果は、カルシウムイオンのキレーターである EGTA を添加することにより減弱した。一方、ZA の細胞増殖抑制効果は乳癌細胞株や大腸癌細胞株ではカルシウムイオン濃度を上昇させても、著しい増強は認められなかった。口腔扁平上皮癌細胞株においては、1.6 mM の細胞外カルシウムイオン存在下では ZA はミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みを増強し、ミトコンドリア膜電位を低下させた。また、ミトコンドリアの Bax 発現の増加に伴い、細胞質中にチトクロム c の放出の増加を認め、caspase-9、-3 を活性化させてアポトーシスを引き起こしていた。以上の結果より、口腔扁平上皮癌細胞株において、細胞外カルシウムイオン濃度が上昇すると ZA の殺細胞作用により、ミトコンドリアを介するアポトーシス経路が促進されることが明らかとなった。

ZA は口腔扁平上皮癌に対し、細胞外カルシウムイオン濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示していることから、ZA は顎骨浸潤により局所のカルシウム濃度が上昇している口腔扁平上皮癌症例の治療に有用である可能性が示唆された。

2. 序文

2-1.ビスフォスフォネート製剤 (BPs 製剤)

ビスフォスフォネート (以下 BPs) は、石灰化抑制作用を示す生体内物質であるピロリン酸の P-O-P 構造を、安定な P-C-P 構造に変えたものの総称で、この構造により BPs は骨のハイドロキシアパタイトに親和性を示し、血中に移行した BPs のほとんどは骨に移行することが知られている¹⁾ (図 1)。BPs は古くは水道管の水垢取りに用いられていたが、1960 年代に Fleish らがこの BPs の骨吸収抑制作用について報告して以来、臨床応用についての研究が進み、骨吸収亢進を呈する様々な骨代謝疾患 (骨粗鬆症、骨ペーজেット病、悪性腫瘍による高カルシウム血症) においてその有用性が報告されている。BPs が破骨細胞媒介の骨吸収を抑制するメカニズムは、未成熟前駆細胞から破骨細胞が形成されるのを阻害する、もしくは破骨細胞のアポトーシスを誘導することで直接的に吸収を阻害するとされている²⁻⁴⁾。一方、最近の研究では BPs が様々な癌細胞において増殖抑制、アポトーシスの誘導、細胞接着の抑制、浸潤能力の抑制効果を誘導することが示されている⁵⁾⁶⁾。ゾレドロン酸 (Zoledronic acid 以下 ZA) は、その構造に窒素を含有した最も強力な BPs で、転移癌による高カルシウム血症だけでなく骨痛や骨折などの骨転移に伴う骨合併症予防の第一選択薬として広く用いられている⁷⁾。ZA をはじめとした窒素含有 BPs (以下 N-BPs) はファルネシルピロリン酸合成酵素を抑制し、その結果、Ras、Rac、Rho のような、細胞機能のキーとなる調整蛋白質のイソプレニル化を減少させ、培養されたヒト癌細胞において増殖を阻止し、アポトーシスの促進に貢献する (図 2)。また、癌細胞が骨基質に接着するのを妨げ、細胞の転移、浸潤を抑制し、血管新生も阻害するとされている⁸⁾ (表 1)。

2-2. 口腔癌

口腔癌は本邦における全癌の 1~2% を占めるにすぎないが、全世界の癌関連死亡原因の 6 番目に多い癌であり、全世界で年間 30 万人以上が新たに罹患するとされている⁹⁾¹⁰⁾。日本では口腔癌罹患患者は 1975 年には 2,100 人、2005 年には 6,900 人であったが、2015 年には 7,800 人になると予測され、人口の高齢化に伴って口腔癌の罹患数も増加しつつある¹¹⁾。病理組織学的に口腔癌の約 90% は扁平上皮癌であり、全ステージを合わせた疾患特異的 5 年生存率は 61% とさ

れている¹²⁾。口腔扁平上皮癌の一番の好発部位は舌であるが、歯肉、臼後三角、頬粘膜、口底からも発生し、強い局所浸潤能を有しているために、隣接する上下顎骨に浸潤する。人体に発生する上皮性新生物の中でも直接に骨浸潤する性質は極めて稀である(図3)。顎骨に浸潤をきたした口腔扁平上皮癌には進展癌が多く、その結果所属リンパ節転移や遠隔臓器への転移が認められること、放射線療法の効果が期待できにくいことから予後不良な症例が多いとされてきた¹³⁾⁻¹⁶⁾。また、腫瘍が浸潤した顎骨を切除することにより、術後に構音障害や嚥下障害などの身体的ダメージや精神的な問題を引き起こすことがある¹⁷⁾¹⁸⁾。そのため、顎骨浸潤の制御を行うことは、臨床医にとっては患者の予後の改善および術後の機能障害を軽減する上で重要な問題である。

2-3. 口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤

近年、転移性癌による骨破壊や口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤は、癌細胞により直接引き起こされるだけでなく、破骨細胞を介して起こっているとの報告があり¹⁹⁾²⁰⁾、口腔扁平上皮癌の浸潤にも乳癌の骨転移で述べられてきたものと同様な、骨破壊の悪循環が関与するとされている。すなわち、骨を浸潤する癌細胞は上皮小体ホルモン関連蛋白(PTHrP)やIL-6を放出することで、骨芽細胞を刺激してRANKリガンドを産生させる。RANKリガンドは破骨細胞前駆体および破骨細胞の表面に存在するRANKと結合することで、破骨細胞の分化および活性化を促進する。破骨細胞が活性化すると骨吸収が亢進し、骨破壊が進むとともに骨基質からIGFやTGFβなどの増殖因子が分泌される。その増殖因子の刺激で癌細胞の増殖が進み、癌細胞がPTHrPやIL-6を放出するという悪循環をもたらすこととなる(図4)。そこで、癌細胞に直接的に抗腫瘍効果を有し、また、間接的に破骨細胞の活性を抑制するZAの作用に注目が集まっている。実際に、口腔扁平上皮癌の浸潤による顎骨吸収をZAが抑制したマウスモデルの報告がある²¹⁾。しかしながら、原発巣において口腔扁平上皮癌が引き起こす骨浸潤や骨破壊をZAがどのようなメカニズムで抑制するかは十分には解明されていない。癌細胞が骨破壊を起こすと骨基質からは増殖因子だけでなく、カルシウムイオンも放出される。口腔癌の場合、原発巣において腫瘍細胞が顎骨を直接浸潤して増大しているため、ZAを投与した場合には癌細胞がZAとカルシウムイオンの影響を直接受けることになる。もし、顎骨浸潤によりカルシウムイオン濃度が高まった環境下でZAが抗腫瘍効果を発揮するのであれば、口腔癌治

療の一助となる可能性もあり、根治性の向上あるいは縮小手術により機能障害を最小限にすることが期待できるかもしれない。そのため、本研究ではカルシウムイオン存在下に臨床的治療濃度の ZA がヒト口腔扁平上皮癌細胞株の増殖やアポトーシスに及ぼす影響を検討し、その薬理学的作用を解明することを目的とした。

3. 研究材料および方法

3-1. 細胞株および細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-4 と SAS と KOSC は富山大学歯科口腔外科学講座の研究室に現存したものを使用し、ヒト乳癌細胞株の MCF-7 とヒト大腸癌細胞株の SW480 とヒト肺基底上皮腺癌細胞の A549 は DS ファーマババイオメディカル (Osaka, Japan) より購入し、実験に供した。これらの細胞株を 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で 5% FBS (Biowest, Paris, France) と 2.05% L-グルタミンと 100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco, Carlsbad, CA, USA) を含む RPMI1640 培地 (Gibco, Paisley, UK) で培養した。

3-2. 薬剤

ゾレドロン酸 (ゾメタ®) はノバルティスファーマ (Basel, Switzerland) より購入した。ゲムシタビンとシスプラチンと EGTA は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。水酸化カルシウムはシグマアルドリッチ (St. Louis, MO) より購入した。RPMI1640 には培地中に 0.6 mM の塩化カルシウムが含まれており、そこに水酸化カルシウムを添加することで、0.6 から 2.0 mM のカルシウムイオン濃度の培地を作成した。カルシウムイオンと同じく水和物になると二価のイオンとなる塩化ストロンチウムは和光純薬工業株式会社より購入し、0.6 から 2.0 mM のストロンチウムイオン濃度の培地を作成した。

3-3. 細胞増殖能の測定

細胞増殖能の測定は TACSTTM MTT 細胞増殖アッセイキット (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) を用いて行った。簡潔に述べると、96 ウェル組織培養プレートで成長させた細胞に様々な濃度のカルシウムイオン存在下に ZA や EGTA、ゲムシタビン、シスプラチンを 48 時間から 72 時間作用させ、アッセイキットの説明書に従い MTT 溶液 (テトラゾリウム塩) から産生されるフォルマザン産物の色素量を測定波長 560 nm で分光吸光度計 (GENios; Tecan Group, Männedorf, Switzerland) を用いて測定し、コントロールの吸光度を 100% として細胞増殖能に及ぼす影響を測定した。

3-4. アポトーシス解析 (FITC 標識アネキシン V-PI 染色)

アポトーシス細胞の測定は FITC Annexin V アポトーシス検出キット (BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium) を用いた。6 ウェル組織培養プレートで成長させた細胞に、0.6 mM か 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に様々な濃度の ZA を 48 時間作用させ、PBS で洗浄した後にトリプシンを用いて細胞を回収して、結合バッファーに浮遊させて FITC 結合アネキシン V と PI (プロピジウムヨウ化物) で染色した。室温で 15 分インキュベートした後、フローサイトメーター (FACS Canto II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。アネキシン V 陽性/PI 陰性細胞を初期アポトーシス、アネキシン V 陽性/PI 陽性細胞を後期アポトーシスとして、それぞれ全体の細胞数の中に占める割合を測定した。

3-5. ウェスタンブロット法による解析

各種アポトーシス関連タンパクを検出する目的でウェスタンブロット法を用いた。様々な濃度のカルシウムイオン存在下に ZA を作用させた HSC-4 細胞を可溶化剤 (M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE, Rockford, AL)) で可溶化し、サンプルを調整した。ミトコンドリアと細胞質の分画は K-ASSAY[®] Cytochrome c Releasing Apoptosis Assay (Kamiya Biochemical Company, Seattle, WA, USA) を用い、また、細胞膜と細胞質の分画は Mem-PER[™] Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて行った。以前に報告した方法に従って²²⁾、SDS-PAGE で分画した後に PVDF 膜に転写し、caspase-3、caspase-9 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、チトクロム c (Kamiya Biochemical Company)、Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology)、Akt、リン酸化 Akt (Cell Signaling) に対する特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法によりアポトーシス関連タンパク質を検出した。 β -Actin 抗体 (Cell Signaling) を総タンパク質のローディングコントロールとして用い、ミトコンドリア外膜のマーカースとして VDAC 抗体 (Cell Signaling) を、細胞膜のマーカースとして Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を用いた。

3-6. 蛍光免疫染色法による解析

アポトーシスの実行に直接関わるカスパーゼである caspase-3 はアポトーシスの過程で切断を加えられることで活性化する。活性化した cleaved caspase-3 の局在の変化を検討するために、蛍光免疫染色法を用いた。コラーゲンコートされた 8 ウェルのカルチャースライド (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) で成長させた、HSC-4 細胞に様々な濃度のカルシウムイオンと 1 μ M の ZA を 72 時間作用させ、4%ホルムアルデヒドで固定をし、一次抗体として抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling) を反応させた。蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を反応させた。細胞質と核をそれぞれ FITC-conjugated anti-pan cytokeratin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と Hoechst 33258 (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) で対比染色して共焦点顕微鏡 (Leica TCS-SP5) 下に観察した。

3-7. ミトコンドリア膜電位測定

ミトコンドリア膜電位の変化を解析する目的で DiOC₆(3)染色を行った。6 ウェル組織培養プレートで成長させた HSC-4 細胞に、0.6 mM か 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に様々な濃度の ZA を 60 時間作用させた。陽電化を有する色素である DiOC₆(3)で細胞を染色後、ミトコンドリア膜電位に依存してミトコンドリア内に集積した DiOC₆(3)の蛍光量をフローサイトメーター (FACS Canto II) で測定することで、ミトコンドリア膜電位変化を定量した。

3-8. 細胞形態の観察

ZA とカルシウムイオンが細胞形態に及ぼす影響を観察する目的で、6 ウェル組織培養プレートで成長させた HSC-4 細胞に ZA とカルシウムを 72 時間作用させ、倒立顕微鏡 (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。

3-9. LDH 活性の解析

培地中のカルシウムイオン濃度の上昇が、ネクローシスを誘導していないかどうかを検討するために、死細胞や細胞膜に傷害を受けた細胞から培地上清中に放出された LDH 量を細胞傷害性検出キット PLUS (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いた。HSC-4 細胞に様々な濃度のカルシウムイオン存在下で ZA を 48 時間作用させ、測定波長 560 nm で分光吸光度計 (Filter Max F5; Molecular Devices, Tokyo, Japan) を用いて測定し、非特異的な細胞

溶解液で放出された LDH をポジティブコントロールとして、その吸光度を 100% として LDH 活性を測定した。

3-1 0. 細胞内へのカルシウムイオンの取り込み

細胞内へのカルシウムイオンの取り込みに及ぼす ZA の影響を検討する目的で、放射性核種である $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用い、細胞に取り込まれた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を測定した。5 $\mu\text{Ci/ml}$ の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (カルシウムイオン濃度としては 0.0088 mM 相当) を含む 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に 1 μM の ZA を 60~120 分作用させた後に、細胞を回収し可溶化した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を液体シンチレーションカウンター (AccuFLEX LSC-7400, Hirachi Aloka Medical, Japan) で測定した。

3-1 1. Rhod2 によるミトコンドリアカルシウムイオンの解析

ミトコンドリアに取り込まれるカルシウムイオン変化を測定する目的で、カルシウム感受性蛍光色素である Rhod2 を用いてカルシウムイオン濃度変動を測定した。5 μM の Rhod2-AM 色素を HSC-4 細胞内に負荷し、細胞質から余剰な色素をウォッシュアウトした後に ZA とカルシウムイオンを 30 分作用させて、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX61) にて観察した。

3-1 2. 統計解析

全データは、独立した 3 回以上の実験から得た結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。データは Prism ソフトウェア (ver. 6; GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて解析し、有意差は対応のない t 検定か one-way ANOVA にて検定し、分散分析の後に Tukey の多重比較検定を行った。交互作用は repeated-measures ANOVA で分析した。 P 値 < 0.05 の場合、統計学的に有意差ありとした。

4. 結果

4-1. 様々な癌細胞株においてゾレドロン酸が細胞増殖およびアポトーシスに及ぼす影響

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4、SAS)、大腸癌細胞株 (SW480)、乳癌細胞株 (MCF-7) の細胞増殖に対する ZA の影響について、MTT アッセイを用いて調べた。口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4、SAS) に対しては、培地中に含まれるカルシウムイオン濃度 (0.6 mM) では ZA は濃度依存的に細胞増殖を抑制し、ZA は 3 μ M 以上で有意な増殖抑制を示した。ZA の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は HSC-4 では 5 μ M で、SAS では 8 μ M であった。一方、SW480 と MCF-7 では 20 μ M でないと増殖抑制を認めず、IC₅₀ 値は 50 μ M 以上であった (図 5)。

細胞周期に及ぼす影響を HSC-4 に 0 μ M、1 μ M、3 μ M、20 μ M の ZA を 72 時間作用させた後に、PI で DNA を染色し FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) を用いて解析した。3 μ M の ZA では G2/M 期の細胞が増加していたが、死細胞に相当する sub-G1 期の増加は軽微であった。20 μ M の ZA では sub-G1 期の増加を認めた (図 6)。

次に、アネキシン V と PI 染色により HSC-4 と MCF-7 に 48 時間 ZA を作用させてアポトーシスした細胞の割合を検出した。HSC-4 では 10 μ M 以上でアネキシン V 陽性/PI 陰性細胞の初期アポトーシスおよびアネキシン V 陽性/PI 陽性細胞の後期アポトーシスを示す割合が増加した。一方、MCF-7 では 50 μ M にならないと初期および後期アポトーシスは出現しなかった (図 7)。

このことから、今回実験に用いた口腔扁平上皮癌細胞株は大腸癌細胞株や乳癌細胞株よりも低濃度の ZA で増殖抑制を示し、細胞周期において G2/M アレストを起こすことで ZA がアポトーシスを誘導していることが分かった。

4-2. ゾレドロン酸による細胞増殖抑制効果に及ぼす細胞外カルシウムイオンの影響

1 μ M の ZA 単独では HSC-4 に及ぼす増殖抑制効果はほとんど認めなかったため、培地中の細胞外カルシウムイオン濃度を増加させて ZA の効果を観察した。ZA が存在しないと、カルシウムイオン濃度を増加させても細胞増殖に影響は与えなかった。しかしながら、1 μ M の ZA を添加するとカルシウムイオン濃度依存的に細胞増殖の抑制を認めた (図 8)。

他の抗腫瘍効果を示す製剤においても、カルシウムイオン濃度依存性に増殖抑制を示すかどうかを検討する目的で、口腔癌治療に用いる抗がん剤であるゲムシタビンとシスプラチンを HSC-4 に作用させた。シスプラチンにおいてはカルシウムイオン濃度が上昇するとわずかに増殖抑制が増強されていたが、ゲムシタビンにおいては、全く影響を与えなかった (図 9)。

倒立顕微鏡で HSC-4 の細胞形態に及ぼす影響を観察したところ、1 μM の ZA と 1.6 mM のカルシウムイオンはそれぞれ単独では細胞形態に変化は認められなかったが、併用した場合には明らかに細胞形態は変形しており細胞数の減少も認めた (図 10)。

1 μM の ZA と 1.6 mM のカルシウムイオンを併用したことによる細胞増殖抑制効果は、カルシウムイオンのキレート剤である EGTA を添加することで減弱した (図 11)。これにより、ZA の細胞増殖抑制効果をカルシウムイオンが増強していると推察された。

細胞外カルシウムイオンの増加が細胞のネクロシスを引き起こすとの報告があり、LDH アッセイを用いてカルシウムイオン濃度 (0.6~2 mM) が HSC-4 に及ぼす影響を調べた。カルシウムイオン単独では濃度を増加させても HSC-4 細胞からの LDH 放出には変化は見られなかった。1 μM の ZA 存在下では、1 mM 以上のカルシウムイオン濃度になると LDH 放出が増加したが、細胞溶解液を用いたポジティブコントロールと比較するとわずかな放出であった (図 12)。これにより、本研究で使用している濃度のカルシウムイオンで引き起こされるネクロシスはわずかであることが分かった。

さらに、通常含まれる培地中のカルシウムイオンである 0.6mM とカルシウムイオンを添加した 1.6 mM の 2 つの条件で ZA の投与濃度を上昇させて HSC-4、SAS、SW480、MCF-7 の各細胞株における細胞増殖抑制効果を確認した。HSC-4 細胞において 0.6 mM カルシウムイオン存在下では 1 μM 以下の ZA は増殖抑制を示さなかったが、1.6 mM カルシウムイオン存在では 0.1 μM や 0.5 μM で増殖抑制を示した。同じ結果は口腔扁平上皮癌細胞株である SAS でも認めた。1.6 mM カルシウムイオン存在下での ZA の IC₅₀ 値は HSC-4 では 0.09 μM 、SAS では 0.31 μM であった。一方、SW480 と MCF-7 では ZA の増殖抑制に及ぼすカルシウムイオンの効果はわずか、1.6 mM カルシウムイオン存在下でも 1 μM 以下の ZA は増殖抑制を示さなかった (図 13)。これにより、今回用いた口腔扁平上皮癌細胞株に対して、カルシウムイオン存在下ではより低濃度の ZA で

増殖抑制を示し、その作用は今回用いた大腸癌細胞株と乳癌細胞株よりも特異的であることが判明した。

4-3. ゴレドロン酸によるアポトーシス誘導に及ぼす細胞外カルシウムイオンの影響

HSC-4 において ZA が引き起こすアポトーシスに対して細胞外カルシウムイオンが及ぼす影響について検討した。図 14 に示すように、1.6 mM カルシウムイオン存在下では ZA を作用させなくても初期アポトーシス細胞数(アネキシン V 陽性/PI 陰性細胞)は、ごくわずかではあるが増加した。しかしながら、ZA を作用させると ZA 濃度依存的にカルシウムイオンと ZA を作用させた群での初期アポトーシス細胞数が増加した。また、カルシウムイオンの有無による初期アポトーシス細胞数の割合の差は ZA の濃度が上昇するに従って大きくなり、その交互作用は統計学的に有意であった ($P < 0.0001$)。このことより、ZA が濃度依存的に引き起こすアポトーシスを細胞外カルシウムイオンは増強させていることがわかった。

次に、ZA とカルシウムイオンがアポトーシス関連タンパクに及ぼす影響についてウェスタンブロット法を用いて検討した。caspase-9 はミトコンドリア傷害の結果として活性化されるアポトーシスの誘導型タンパク質分解酵素である。細胞外カルシウムイオン濃度の増加に伴い、ZA は活性化した caspase-9 の発現を増加させた。そして、活性化した caspase-9 は下流の caspase-3 を活性化させる。活性化された caspase-3 は 1.4 mM と 1.6 mM のカルシウムイオン存在下で ZA を作用した時に発現していた (図 15)。蛍光免疫染色法により活性化された caspase-3 の発現を観察したところ、図 16 に示すように 1.4 mM と 1.6 mM のカルシウムイオン存在下で 1 μ M の ZA を作用した時に発現を認めた。

アポトーシスが誘導される時にはミトコンドリアへのカルシウムイオンの輸送が必要となる。そこで、口腔扁平上皮癌細胞株においてミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みに ZA が影響を及ぼすかどうか検討した。ミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みは Rhod2 蛍光イメージを用いた。1.6 mM のカルシウムイオンを単独で作用させた時よりも、1 μ M の ZA と 1.6 mM のカルシウムイオンを作用させた時の方がより高いミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度を示した (図 17)。

ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度が上昇するとミトコンドリア膜透

過性遷移孔が開口して、ミトコンドリア膜電位が低下し、それによりチトクロム c が放出されることで細胞死を招くとされている。ZA とカルシウムイオンが誘導したアポトーシスがミトコンドリア経路によるものなのかを検討するために、HSC-4 細胞株を用いて、ミトコンドリア膜電位を DiOC₆(3)染色を用いて検討した。ZA とカルシウムイオンの組み合わせで作用させた HSC-4 細胞においてミトコンドリア膜電位の明らかな低下を認めた (図 18)。1.6 mM カルシウムイオン存在下で ZA を作用させると低濃度 (0.01 μ M と 0.1 μ M) では 8.0~10.7% の細胞がミトコンドリア膜電位の低下を示したのに対し、1 μ M の ZA を 1.6 mM カルシウム下で作用させると 60.7% の細胞がミトコンドリア膜電位の低下を示した。HSC-4 細胞において 1 μ M の ZA と 1.6 mM カルシウムイオンの組み合わせがミトコンドリア膜電位を有意に低下させることが分かったため、次にミトコンドリア外膜の透過性をコントロールすることによりアポトーシスを制御するとされる Bcl-2 ファミリーについて検討した。Bax は通常、細胞質に局在しているが、様々なストレスによりミトコンドリアに移動し、そこでチトクロム c の放出を促進するとされる。1 μ M の ZA と 1.6 mM カルシウムイオンを作用させるとミトコンドリア分画の Bax 発現は増加し、それに伴ってミトコンドリアから細胞質に放出されたチトクロム c の発現も増加を認めた (図 19)。抗アポトーシス蛋白の Bcl-2 や Akt は Bax のミトコンドリア移行を抑制するとされているため、ZA とカルシウムイオンを作用させて検討した。その結果、HSC-4 細胞において 100% の Bcl-2 は細胞膜分画に存在し、その発現は ZA やカルシウムイオン濃度を上昇させても変化はみられなかった。さらに、Akt の発現やそのリン酸化レベルについても影響は見られなかった (図 20)。

4-4. ゴレドロン酸の増殖抑制効果に対する細胞株の特異性と細胞外カルシウムイオンの役割

ZA と細胞外カルシウムイオンによる細胞増殖抑制作用が口腔扁平上皮癌細胞株にだけ認められるものであるかどうかを検討する目的で他の扁平上皮癌細胞株である KOSC と肺基底上皮腺癌細胞である A549 に対して、同様にカルシウムイオン存在下での ZA の増殖抑制効果について検討した。その結果、KOSC は他の口腔扁平上皮癌細胞株と同様にカルシウムイオン存在下ではより低濃度で ZA の増殖抑制を認めたが、その抑制効果は他の 2 細胞株よりも緩やかであった。肺基底上皮腺癌細胞である A549 においても、口腔扁平上皮癌と同程度の低

濃度 ZA で増殖抑制を認め、カルシウムイオンの添加により抑制効果は増強された (図 21)。このことより、カルシウムイオンと ZA の相乗効果は口腔扁平上皮癌細胞にだけに認められる作用ではないと示唆された。

また、同じ二価の陽イオンであるストロンチウムイオンを用いた場合に、ZA の増殖抑制効果が増強されるかどうかを検討した。その結果、カルシウムイオンを用いた場合と同様の相乗効果を認めた (図 22)。さらに、細胞内へのカルシウムイオンの取り込みに及ぼす ZA の影響を検討する目的で、細胞に取り込まれた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を測定した。HSC-4 細胞株において 1.6 mM カルシウムイオン存在下に 1 μM ZA を作用させた場合も ZA を作用させなかった場合も、いずれも時間経過とともに細胞内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み量は増加を認めたが、ZA の作用による差は認められなかった (図 23)。これらのことから、細胞外カルシウムイオン濃度の上昇は、細胞質内のカルシウム上昇に結びつかず、4-3. で示したミトコンドリアカルシウムイオン濃度の上昇は、小胞体から放出されたカルシウムイオンに起因すると考えられた。また、ストロンチウムイオンでもカルシウムイオンと同様な ZA の増殖抑制に対する相乗効果を認めることから、ZA は二価の陽イオンと結合することで、薬理作用が増強される可能性が示唆された。

5. 考察

5-1. ゴレドロン酸が抗腫瘍効果を引き起こす濃度について

窒素含有の BPs 製剤 (N-BPs) の生化学的作用は、メバロン酸経路における鍵となる酵素である、ファルネシルピロリン酸合成酵素 (FPPS) の抑制により、低分子量 G タンパク質 (Ras、Rho など) のプレニル化を抑制することである。その結果、N-BPs は細胞障害性の ATP アナログ (ApppI) を合成し、それがミトコンドリア ADP/ATP トランスロカーゼを抑制し、アポトーシスを誘導するとされる (図 2)。近年では、N-BPs が様々な種類のヒト癌細胞株に対して直接的抗腫瘍効果を示すと報告されており²³⁾²⁵⁾、その生化学的作用は、癌細胞の接着、移動、浸潤、増殖を抑制し、癌細胞のアポトーシスを誘導する⁶⁾²⁶⁾²⁷⁾。N-BPs の一つであるゴレドロン酸 (ZA) が *In vitro* で増殖抑制やアポトーシスの誘導を示す濃度は 10~50 μM とされている²⁸⁾²⁹⁾ (表 2) が、ZA は点滴静注後 15 分で最高血中濃度である 1.47 μM に達するが、投与後 24 時間にはピークの濃度の 1%程度まで下がるとされており、ZA の臨床的治療濃度と比較するとあまりにも高い濃度である。過去の報告は乳癌細胞株や前立腺癌細胞株などの腺癌細胞株を用いたものが多く、増殖抑制を示す ZA 濃度が高いのに対して、ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) に ZA を作用させたところ、臨床的治療濃度に近い 1 μM で増殖抑制を示す知見をすでに得ており³⁰⁾、同じ上皮系細胞である口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4、SAS) を用いて、ZA の増殖抑制効果を検討したところ、3 μM で明らかな増殖抑制効果を認めた。

前述したように BPs は骨ミネラルに強い親和性を示すため、投与後は速やかに骨に集積する。そのため、骨浸潤により骨より ZA が放出されることにより、骨局所における ZA の濃度は血中濃度よりも高まっているとは推察される。実際に骨転移巣における ZA の濃度は計測されていないが、癌細胞株を移植した動物モデルに ZA を投与することで、転移性癌の増殖抑制を示した報告が散見されるため、ある程度の濃度の ZA が転移巣の癌細胞に作用していると推測される。一方、血中のカルシウムイオンは 1.1~1.4 mM とされているが、骨吸収部位ではカルシウムイオン濃度は 40 mM にも上昇すると報告されている³¹⁾。そこで、転移巣では骨から ZA とカルシウムイオンが放出されることになり、癌細胞は ZA とカルシウムイオンの両者の影響を受けると予想される。Journé ら³²⁾の乳

癌細胞株の MCF-7 と MDA-MB-231 に対して ZA を作用させた研究において、培地中のカルシウムイオン濃度を 0.6 mM から 1.6 mM に上昇することで、MCF-7 では IC₅₀ 値がそれぞれ 20 μM から 2 μM、MDA-MB-231 では 50 μM から 15 μM に低下したが、それでも ZA の臨床的治療濃度よりも高く、カルシウムイオン存在下において臨床的治療濃度の ZA が癌細胞に及ぼす影響は十分に解明されていなかった。しかし、今回の研究で培地中のカルシウムイオン濃度を増加させると、口腔扁平上皮癌細胞株に対して臨床的治療濃度の ZA が増殖抑制を示すことを初めて明らかにした (HSC-4 の IC₅₀ 値は 0.09 μM、SAS では 0.31 μM)。そして、その作用はカルシウムイオンのキレーターである EGTA により減弱された。さらに、今回の ZA による細胞増殖抑制効果は、カルシウムイオン濃度に関わらず、MCF-7 や SW480 細胞株よりも口腔扁平上皮癌細胞で顕著であった。このことから、ZA は乳癌細胞株や大腸癌細胞株よりも口腔癌細胞に対して、より強い殺細胞効果を示す可能性が示唆された。

5-2. 細胞外カルシウムイオンによるゾレドロン酸の細胞増殖抑制効果の増強について

シスプラチンやゲムシタビンという口腔扁平上皮癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示す薬剤は細胞外カルシウムイオンによってほとんど増強されなかった。このことより、カルシウムイオンによって増強された口腔扁平上皮癌細胞株に対する増殖抑制効果は、ZA に特異的なものと考えられた。今回の研究で、カルシウムイオン濃度が上昇することにより ZA による細胞増殖抑制効果が増強されたため、細胞内へのカルシウムイオンの取り込みに及ぼす ZA の影響が重要であると考えられた。しかしながら、ZA の有無により HSC-4 細胞内の ⁴⁵Ca²⁺ 取り込み量は変化しなかった。Thompson ら³³⁾ は J774 マクロファージとウサギ破骨細胞を用いて、N-BPs の細胞内取り込みに及ぼすカルシウムイオンの影響を検討しているが、1 mM のカルシウムイオン濃度が AF-ALN や [¹⁴C] ZA の取り込みを上昇させることを報告している。今回の研究で、EGTA は ZA の増殖抑制に及ぼすカルシウムイオンの影響を打ち消していたが、これは EGTA が ZA とカルシウムイオンの結合に競合したためと考える。なぜならリン酸化合物は金属キレート性を有するからである³⁴⁾。これらのことから、細胞外カルシウムイオン濃度が上昇することで、ZA とカルシウムイオンの結合体が増加し、細胞レベルでの薬物動態が変化し、癌細胞内の ZA 蓄積に影響を及ぼすと推察され

る。また、HSC-4 に及ぼす ZA の増殖抑制効果はカルシウムイオンと同じ二価の陽イオンであるストロンチウムイオンでも増強されたが、同様の結果は Thompson ら³³⁾も示しており、N-BPs の取り込みは Fluid-Phase のエンドサイトーシスによるものとした上で、カルシウムイオンやストロンチウムイオンの存在が、いくつかの物理化学的メカニズムにより N-BPs のエンドサイトーシスを促進すると述べている。以上のことより、その薬物動態は完全に明らかにされていないが、ZA とカルシウムイオンが結合することで、細胞内に ZA が取り込まれやすい環境となり、ZA による増殖抑制効果を増強したものと推測する。一方、カルシウムイオンはネクロシスによる細胞死を引き起こすとの報告がある³⁵⁾³⁶⁾が、今回の実験では、カルシウムイオンを作用させても LDH 放出はわずかで、カルシウムイオン濃度を増加させても放出される LDH 量に変化は見られなかった。

5-3. ゴレドロン酸が誘導するアポトーシスとカルシウムイオンの関与について

通常、アポトーシスを引き起こすシグナルは大きく 2 つに分けられる。1 つは細胞膜に存在するデスレセプターを介する *extinsic pathway* と呼ばれる経路で、もう 1 つはミトコンドリアを介する *intrinsic pathway* と呼ばれる経路である。この 2 つの経路は最終的にタンパク分解酵素であるカスパーゼが活性化することによってアポトーシスに至る³⁷⁾。ミトコンドリア経路のアポトーシス誘導機序として 2 つの可能性があり、1 つは細胞内カルシウム濃度の上昇がミトコンドリア内膜にあるミトコンドリア膜透過性遷移孔 (PTP) を開口させ、ミトコンドリア膜電位が低下し、それによりチトクロム c がミトコンドリアから放出されて *caspase-9* が活性化され、さらに *caspase-3* の活性化へと進みアポトーシスが実行されるという説である³⁸⁾。今回の実験では、カルシウムイオンと ZA を作用させた HSC-4 細胞においてミトコンドリア膜電位の有意な低下を認め、細胞質中のチトクロム c の発現増加を認めた。また、細胞外カルシウムイオンの増加に伴い ZA は、HSC-4 細胞における *caspase-3* と *caspase-9* の活性化を誘導した。しかし、培地中に含まれる程度のカルシウムイオン濃度では ZA はカスパーゼの活性化を引き起こさなかった。もう 1 つ可能性のある機序は、細胞質内に存在するアポトーシス促進因子タンパクの関与である。*Bcl-2* はミトコンドリア外膜に存在し、チトクロム c の放出を抑制している。一方、*Bax* はアポ

トースス促進因子タンパクの一つで、通常 Bax は細胞質に局在しているが、様々なストレス刺激を受けるとミトコンドリアへ移行する。Bax は活性化されると構造変化を起こし、ミトコンドリア外膜に挿入され、ミトコンドリアの外膜を透過性にしてミトコンドリア外膜透過性亢進 (MOMP) を起こす。それにより膜間腔にあるチトクロム c が漏出する。細胞質に放出されたチトクロム c はアダプタータンパク質である Apaf-1 を介して caspase-9 とその下流の caspase-3 を活性化し細胞死を誘導するとされる³⁹⁾⁴⁰⁾ (図 24)。さらに、Bax の活性は小胞体からのカルシウムイオンの放出を招き、その結果ミトコンドリアカルシウムイオン濃度の上昇とチトクロム c の放出を引き起こすとされる⁴¹⁾。今回、Bax のミトコンドリア移行に関して、HSC-4 細胞の細胞質とミトコンドリア分画を用いて検討したところ、カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、ZA はミトコンドリア分画における Bax の発現を増加させた。また、Rhod2 によるミトコンドリアカルシウムイオン染色においては、細胞外カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、ZA はミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みを増加させた。これらの結果から、口腔扁平上皮癌細胞が高濃度カルシウムイオンに作用された場合、ZA は Bax を活性化し、その結果ミトコンドリアカルシウムイオン濃度を上昇させ、ミトコンドリア膜電位の低下を引き起こし、ミトコンドリアから細胞質へチトクロム c を放出させていると解釈した。しかし、Bax の活性化を抑制するとされる抗アポトーシス蛋白の Bcl-2 や生存シグナル伝達因子の Akt の発現に関して、細胞外カルシウムイオン濃度を上昇させても ZA は変化を起こさなかった。Bax の活性化を制御する因子に関しては、さらなる検討が必要と考えられるが、今回の結果は口腔扁平上皮癌細胞株において、細胞外カルシウムイオン濃度が上昇すると ZA の増殖抑制効果が増強されるのは、ミトコンドリアを介する intrinsic apoptosis pathway が促進されることが明らかとなった。

5-4. 本研究の臨床への発展

口腔領域に関連する BPs のトピックスとして、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (BRONJ) という副作用を有する反面、歯科用インプラントを BPs でコーティングすることによりインプラント表面に新生骨を形成し、骨との結合が上がったとする報告や、実験的歯周炎ラットにおいて BPs 投与が歯槽骨の吸収を抑制したとする報告があり、BPs の口腔領域における治療薬としての応用が期待されている⁴²⁾⁴³⁾。

口腔癌治療に関しては、顎骨浸潤する口腔扁平上皮癌細胞を用いたマウスにおける同種移植や異種移植モデルにおいて、N-BPsが腫瘍の増殖や浸潤を抑制するという、いくつかの前臨床研究が行われている²¹⁾⁴⁴⁾。しかしながら、口腔癌細胞浸潤による骨吸収がもたらすカルシウムイオン濃度の上昇がBPsの抗腫瘍効果にどのような影響を及ぼし、その治療効果に関与するかどうかは解明されていない。今回の研究において細胞外カルシウムイオン濃度が上昇することにより、臨床的治療濃度である低い濃度のZAが口腔扁平上皮癌細胞株に対して示す殺細胞効果が増強されることを明らかにした。口腔扁平上皮癌は原発巣が顎骨に近く、比較的早期に顎骨に浸潤し、原発巣は骨からの影響を受けやすいと考える。そのため、骨から放出されたカルシウムイオンがZAの抗腫瘍効果を増強することは十分に期待できるため、口腔癌患者にとって、ZAの投与が有益なものとなる可能性はある。しかし、今回用いた口腔扁平上皮癌細胞株の中でも、カルシウムイオンによるZAの抗腫瘍効果の増強の程度に差を認めたが、ZAが誘導するアポトーシスに関しては、1種類の細胞株でしか検討していないため、複数株で検討することが、その差の原因解明につながると考える。さらに、ZAが細胞内に取り込まれる機序およびそこに関わるカルシウムイオンの作用が明らかになれば、ZAの抗腫瘍効果を期待できる細胞株ひいては口腔癌患者を選別することが可能になると考える。口腔癌治療におけるBPsの新しい応用への道を開くべく、さらに研究を進展させたい。

6. 謝辞

本論文内容は公表された論文⁴⁵⁾をもとに構成しました。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた富山大学大学院医学薬学研究部 歯科口腔外科学講座 野口 誠教授、分子医科薬理学講座 服部裕一教授および三重大学大学院医学系研究科口腔・顎顔面外科学分野 新井直也教授に心より感謝申し上げます。

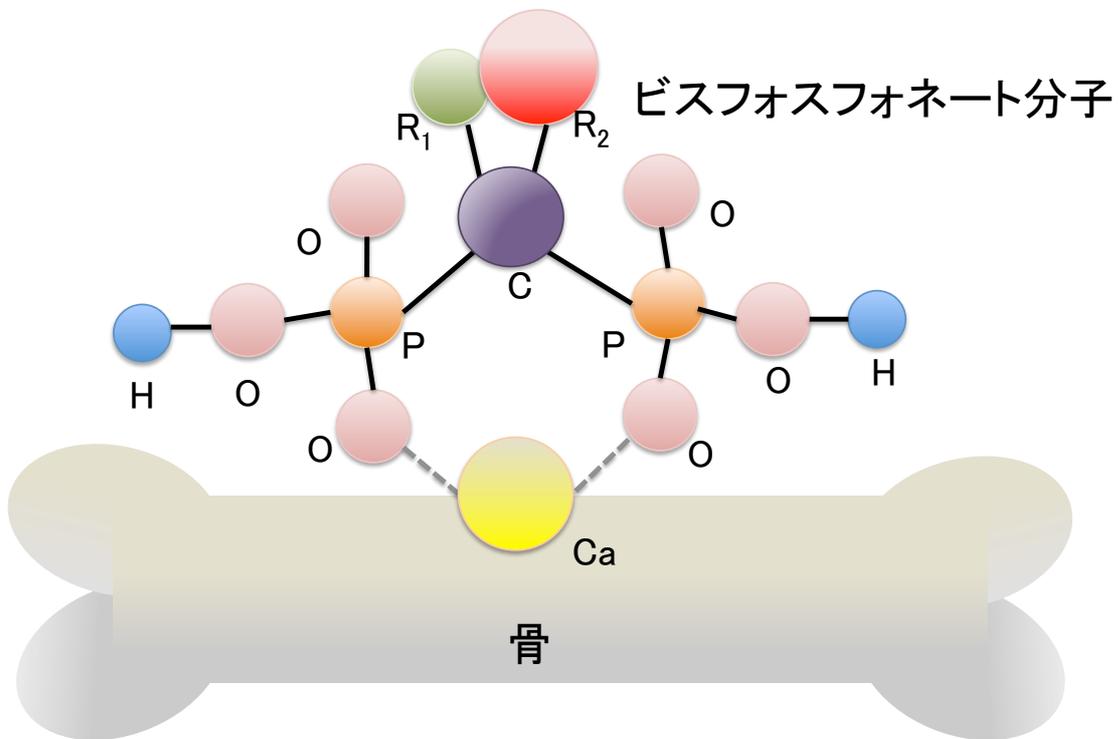
また、ミトコンドリア機能解析、蛍光免疫染色法、放射線アイソトープの手法、解析を含め御指導、御協力いただきました富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学教室 近藤 隆教授、趙 慶利先生、病態病理学講座 山本誠士先生、富山大学生命科学先端研究センターアイソトープ実験施設 庄司美樹先生に心から感謝申し上げます。統計解析において御助言、御指導いただきましたバイオ統計学・臨床疫学 折笠秀樹教授に深く感謝いたします。

最後に、歯科口腔外科学講座および分子薬理学講座の各位にはご支援を賜ったことを、ここに深謝いたします。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

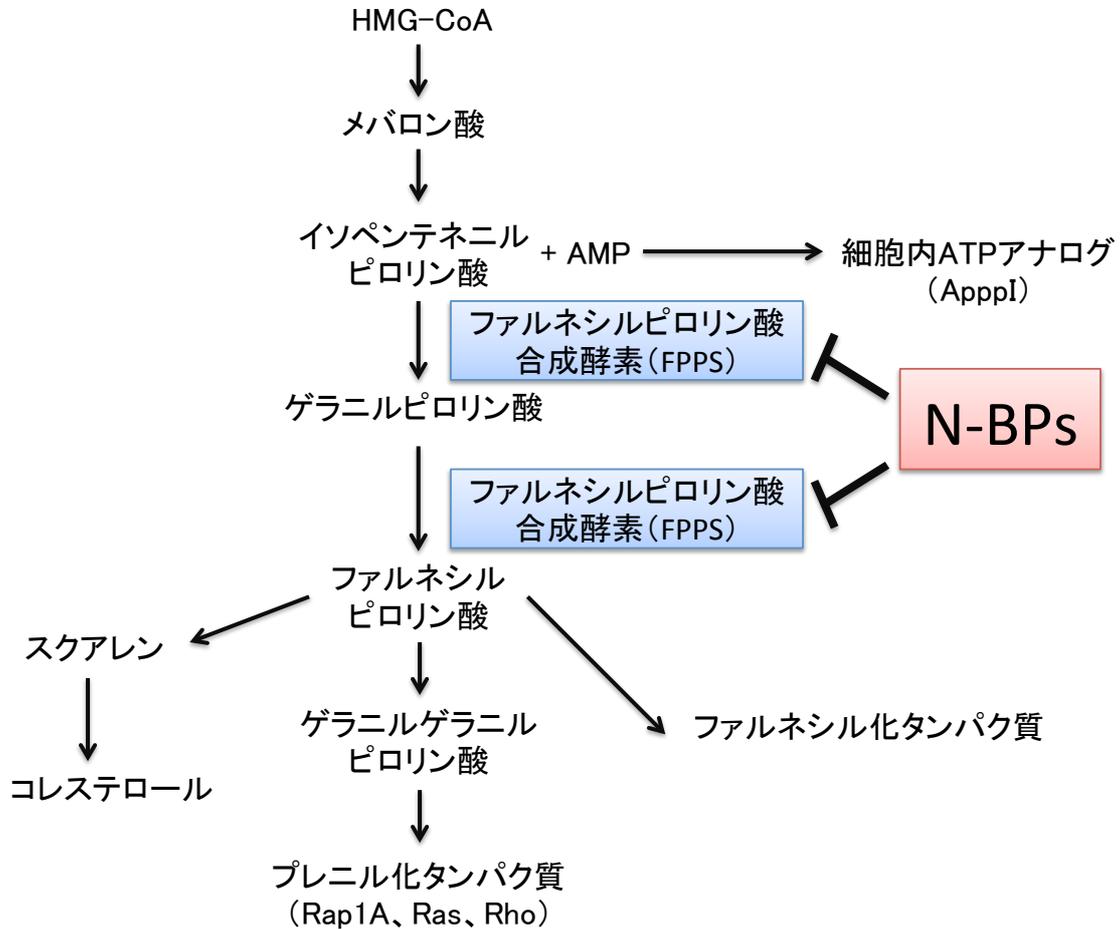
7. 図表

(図1) BPsの構造



BPsは生体内物質であるピロリン酸のアナログであり、ピロリン酸の構造中心にあるP-O-P結合の酸素原子が炭素原子に置き換えられてP-C-P結合となっており、酸素分子が炭素分子に置き換えられたことにより加水分解を受けず、生体では代謝を受けない。炭素原子上の2つの水素原子を置換することにより、様々なBPs製剤を合成することができ、その側鎖(R1、R2)により生物学的および薬理学的特性、毒性が異なる。BPsは側鎖に窒素を含むタイプと含まないタイプに分けられ、窒素を含まないものを第一世代、窒素を含む官能基を有するものを第二世代、窒素を含み、さらに環状構造を有するものを第三世代と分類されるZAは第三世代で、その骨吸収抑制作用は第一世代の10,000倍以上と極めて強力である。BPsは骨ミネラルとの親和性が極めて高く、投与経路に関わらず骨に選択的に集積する。

(図2) N-BPsによるメバロン酸経路の阻害



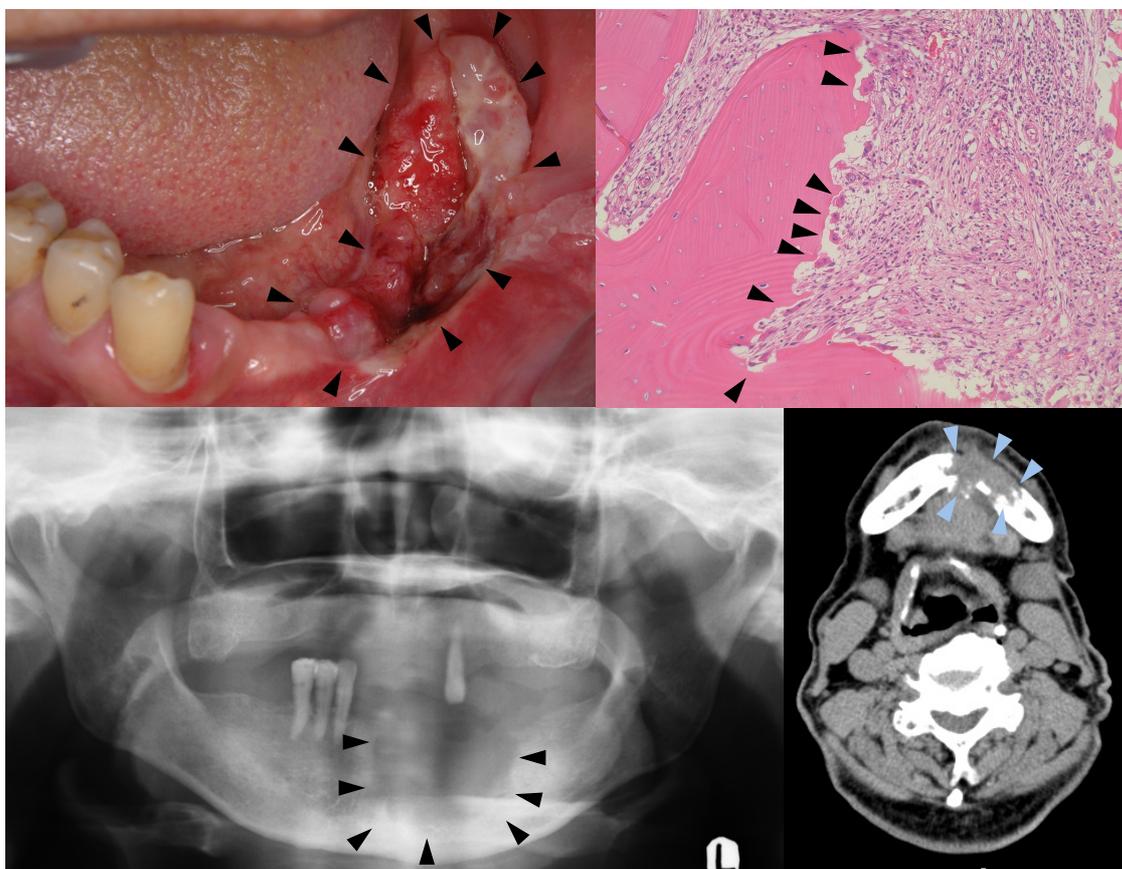
メバロン酸の代謝によりファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸などのイソプレノイド脂質が生成する。これらは Ras、Rho および Rap1A などの低分子量 G タンパク質のプレニル化において重要な役割を演じている。窒素含有 BPs (N-BPs) はファルネシルピロリン酸合成酵素 (FPPS) を抑制して、メバロン酸代謝経路を阻害する。それにより、低分子量 G タンパク質による細胞骨格の構成や細胞内情報伝達などの機能を阻害して細胞機能を抑制する。また、N-BPs による FPPS の抑制により、細胞障害性の ATP アナログ (ApppI) が産生されることにより、アポトーシスを誘導する。

(表 1) N-BPs の抗腫瘍効果

直接作用	間接作用
癌細胞の骨指向性の低下	破骨細胞の分化、活性化を抑制
癌細胞の接着および浸潤抑制	血管新生の阻害
癌細胞のアポトーシス誘導	$\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍活性
癌細胞の増殖抑制	

N-BPs には癌細胞に直接的に作用して抗腫瘍効果を起こす直接作用と、間接的に抗腫瘍効果を示す間接作用があると報告されている。

(図 3) 下顎歯肉扁平上皮癌症例

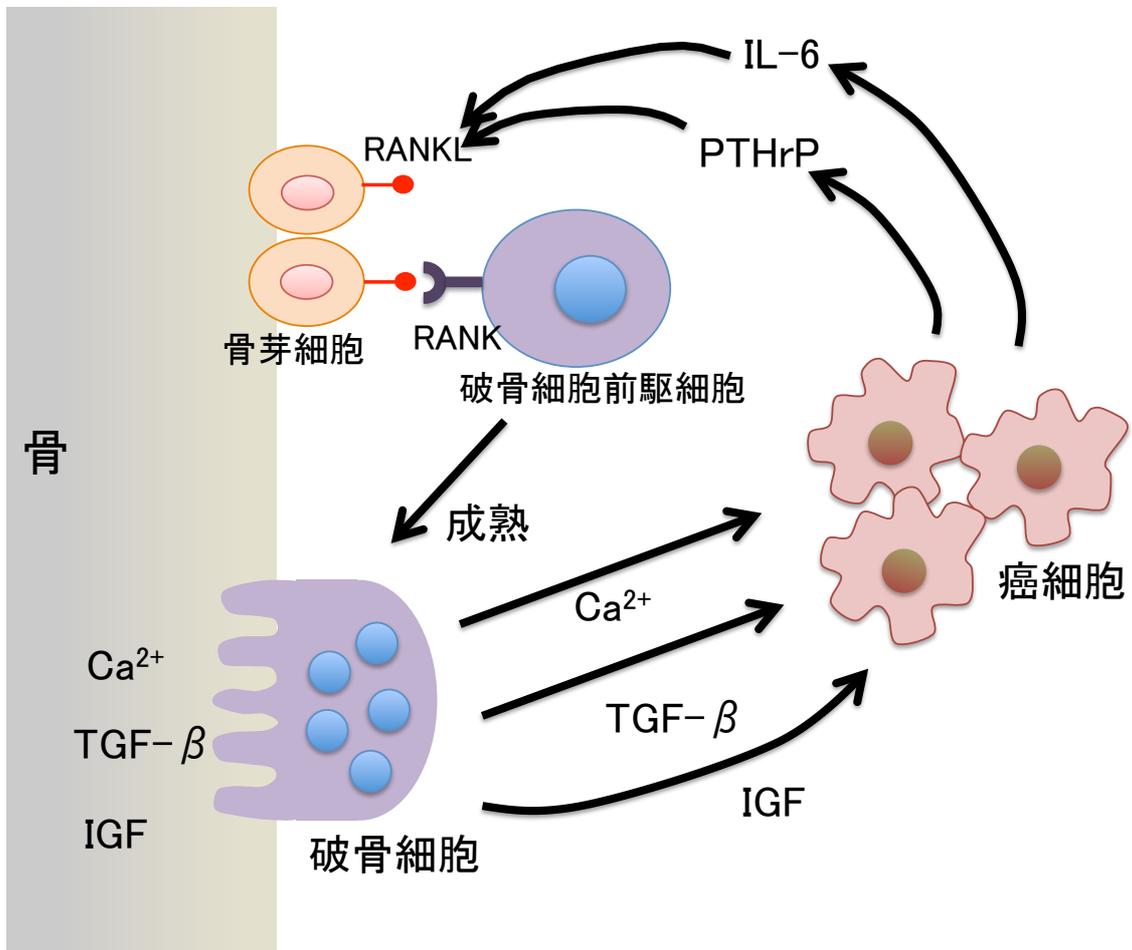


上段左：下顎歯肉扁平上皮癌（cT4N2bM0, Stage IVA）症例の口腔内写真。矢頭の部分に腫瘍性病変を認める。

下段：初診時パノラマレントゲンおよび CT 写真。矢頭の範囲に顎骨浸潤を認める。

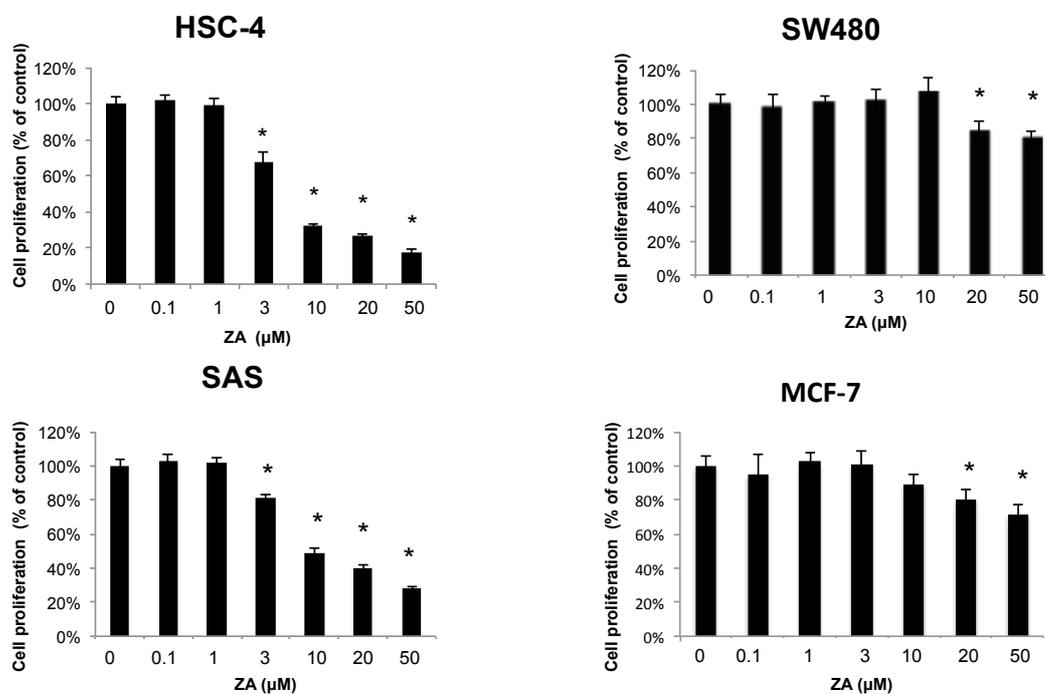
上段右：術前化学療法後に下顎骨区域切除術時の切除組織。腫瘍浸潤の最深部で破骨細胞が下顎骨を吸収している。矢頭は破骨細胞による骨吸収窩を示す。

(図 4) 口腔扁平上皮癌による骨浸潤の細胞学的および分子学的メカニズム



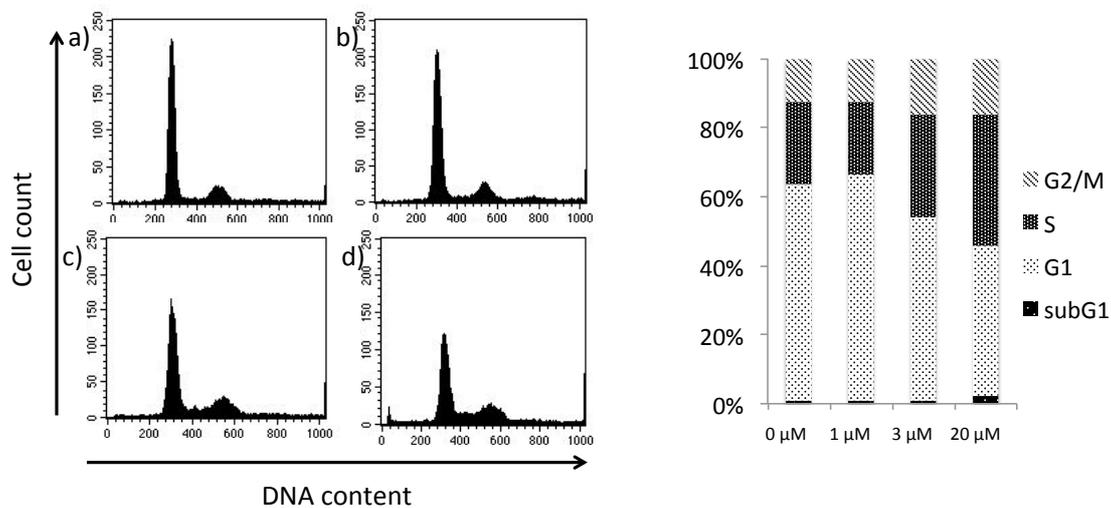
癌細胞が産生する PTHrP などが破骨細胞を活性化し、骨吸収が促進された結果骨由来増殖因子が遊離され、癌細胞が増殖しさらに大量の破骨細胞活性化因子が産生されるという悪循環 (viscous cycle) が形成される。

(図5) ZAが各種癌細胞株の細胞増殖に及ぼす影響



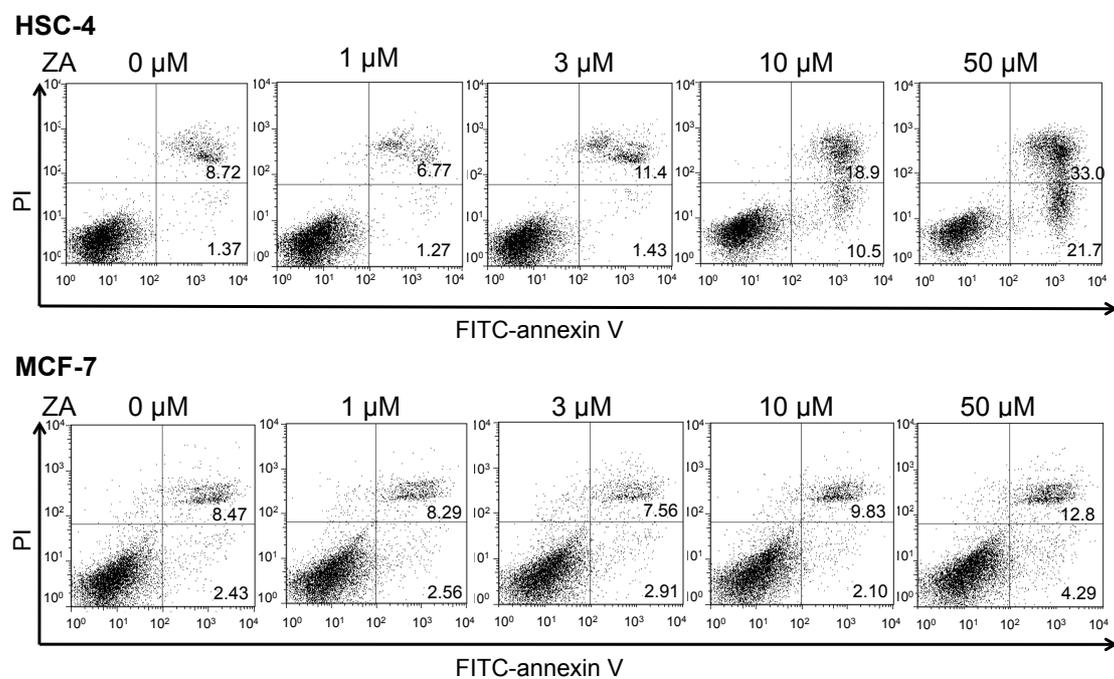
ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4、SAS)、ヒト大腸癌細胞株 (SW480)、ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) に 0.1~50 μM の ZA を 72 時間作用させ、MTT アッセイを用いて細胞増殖を評価した。ZA を作用させないものをコントロールとして、コントロールに対する割合を示した ($n=3$)。* : $P<0.01$

(図6) ZAが細胞周期に及ぼす影響



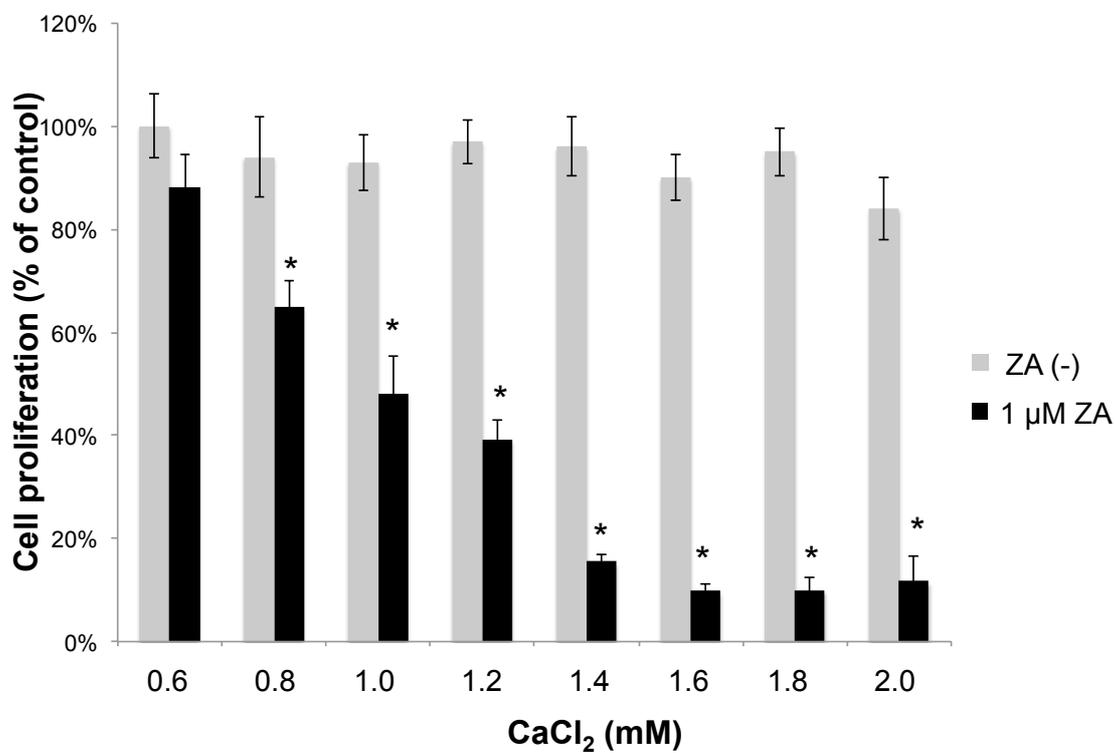
HSC-4 に a) 0 μM 、b) 1 μM 、c) 3 μM 、d) 20 μM の ZA を 72 時間作用させた後に、50 $\mu\text{g/ml}$ の PI で染色し、FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) を用いて解析した。

(図7) ZA が口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4) と乳癌細胞株 (MCF-7) のアポトーシスに及ぼす影響



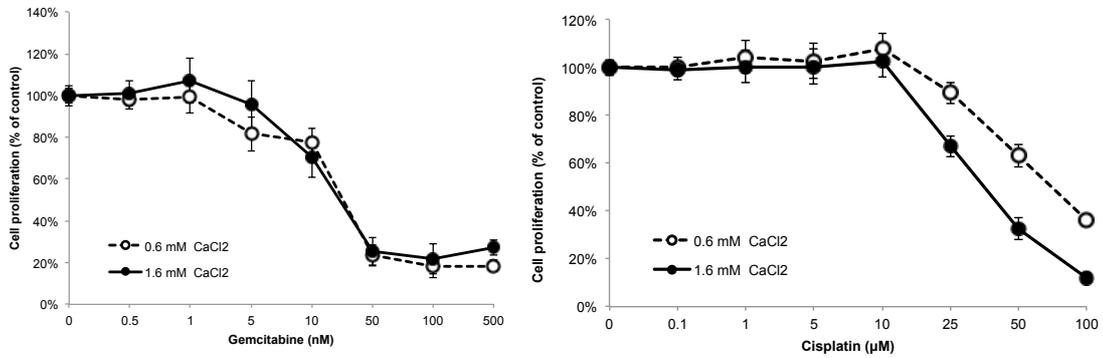
フローサイトメトリーを用いてアネキシン V と PI 染色により HSC-4 と MCF-7 に ZA を 48 時間作用させてアポトーシスした細胞の割合を検出した。アネキシン V 陽性/PI 陰性細胞の初期アポトーシスおよびアネキシン V 陽性/PI 陽性細胞の後期アポトーシスの細胞の割合をそれぞれ表示した。

(図8) HSC-4 細胞株に対する ZA の増殖抑制効果に細胞外カルシウムイオンが及ぼす影響



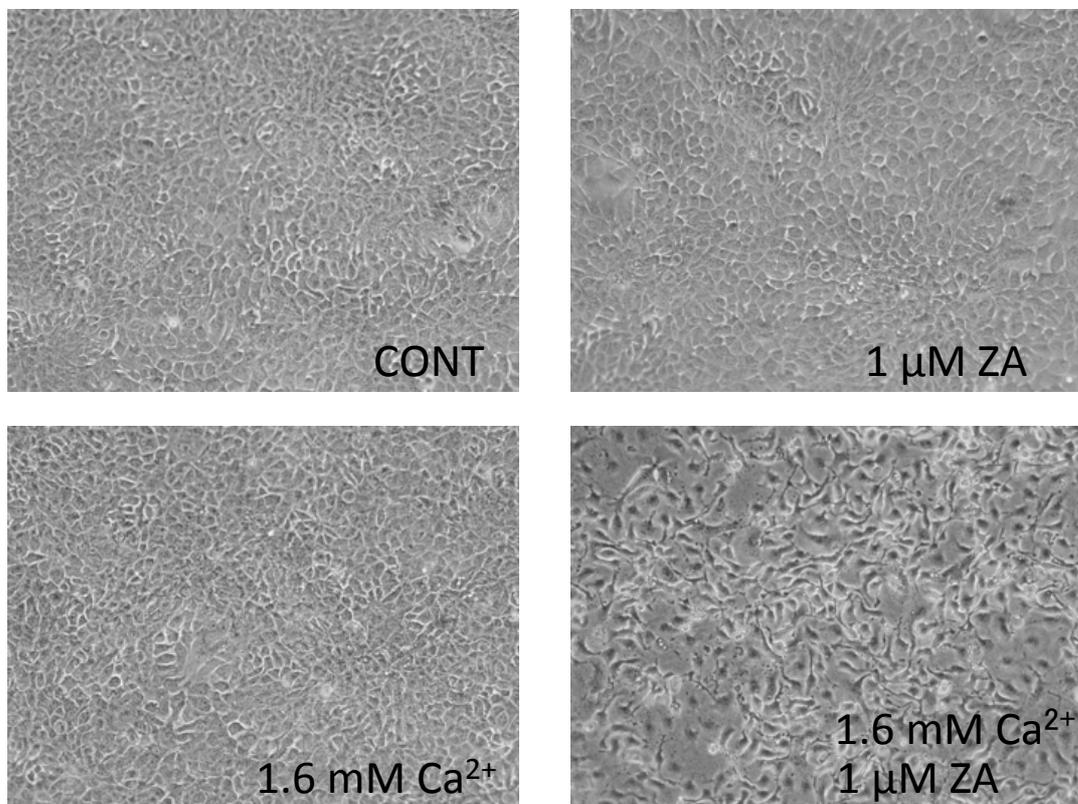
HSC-4 細胞株を 1 μM の ZA 非存在下もしくは存在下で細胞外カルシウムイオン濃度を 0.6 mM から 2.0 mM まで増加させて、細胞増殖に及ぼす影響を検討した ($n=3$)。*: $P<0.01$

(図9) ゲムシタビン、シスプラチンが HSC-4 細胞株に及ぼす増殖抑制と細胞外カルシウムイオンによる影響



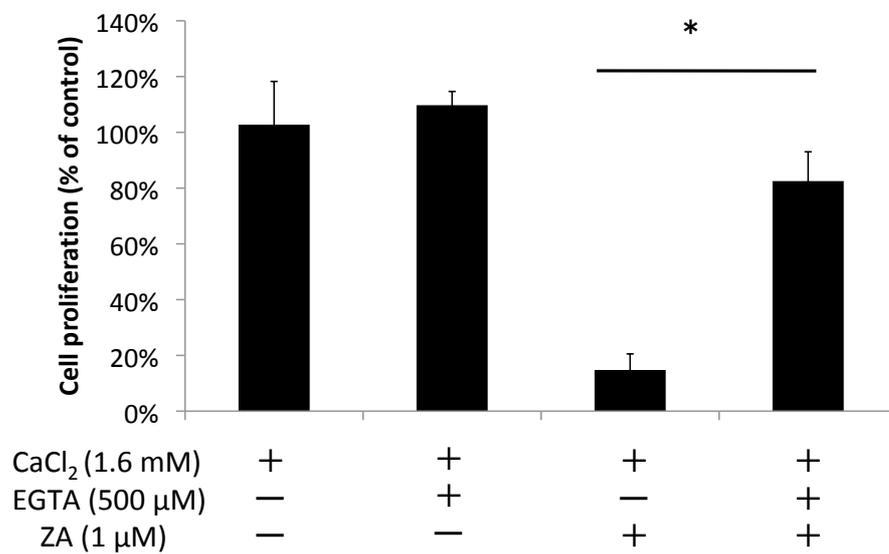
HSC-4 細胞株に対してゲムシタビン (左図) とシスプラチン (右図) を培地中のカルシウム濃度を 0.6 mM と 1.6 mM に変化させ 72 時間作用し、細胞増殖に及ぼす影響を MTT アッセイを用いて検討した。白塗り (○) は 0.6 mM カルシウムイオン、黒塗り (●) は 1.6 mM カルシウムイオンを示す ($n=3$)。

(図 10) ZA とカルシウムイオンが細胞形態に及ぼす影響



HSC-4細胞を0.6 mMカルシウムイオン含有の培地のみ(CONT)、1 μMのZA、1.6 mMカルシウムイオン、1 μM ZA と 1.6 mMカルシウムイオンの4条件で72時間作用させ、倒立顕微鏡で細胞形態に及ぼす影響を観察した。

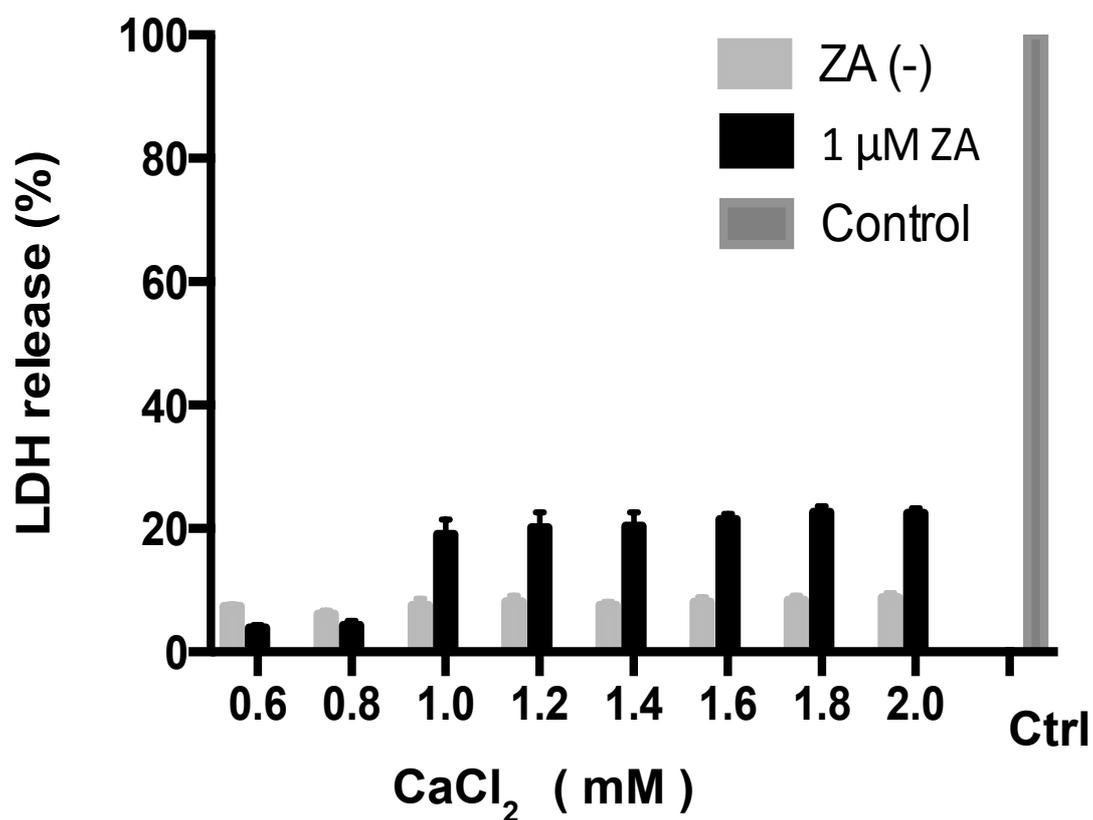
(図 11) ZA とカルシウムイオンによる増殖抑制に及ぼす EGTA の影響



1 μM の ZA と 1.6 mM のカルシウムイオンを併用したことによる細胞増殖抑制効果は、カルシウムイオンのキレート剤である EGTA を添加することで減弱した ($n=3$)。

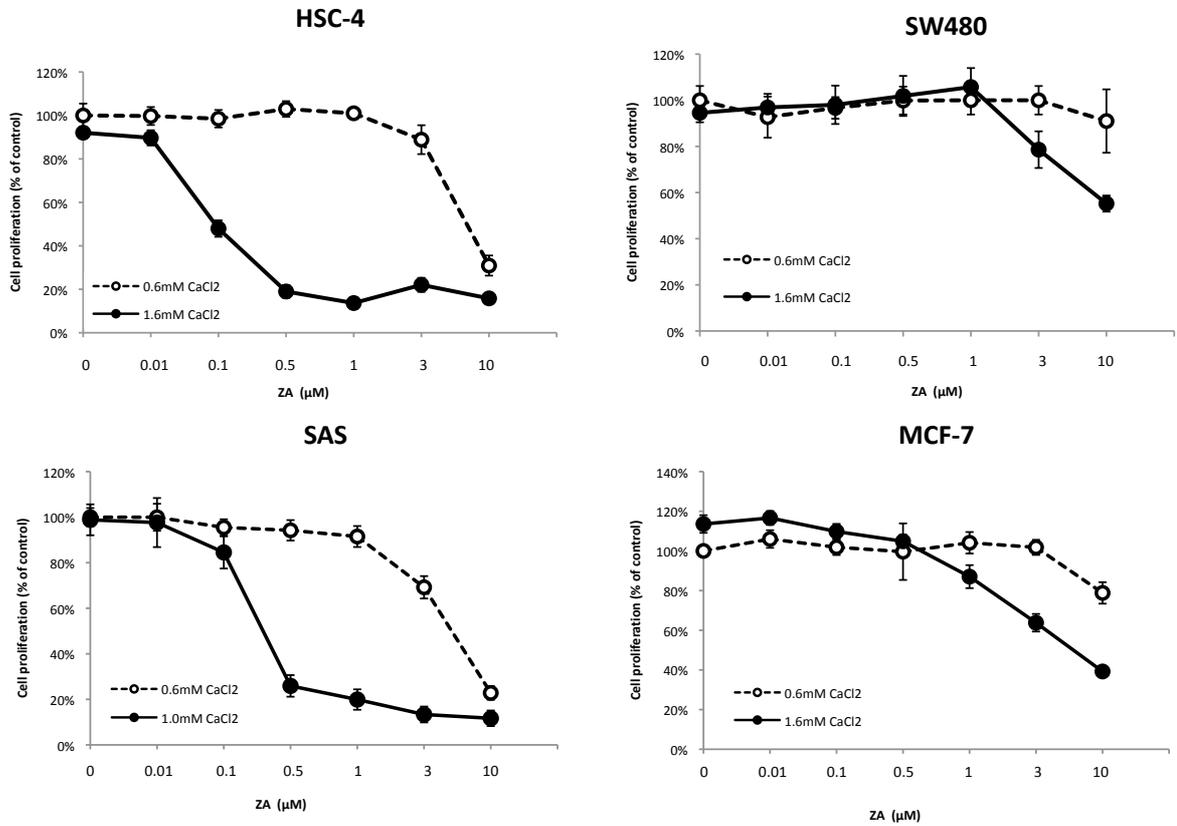
*: $P<0.01$

(図 12) 細胞外カルシウムイオン濃度が HSC-4 細胞のネクローシスに及ぼす影響



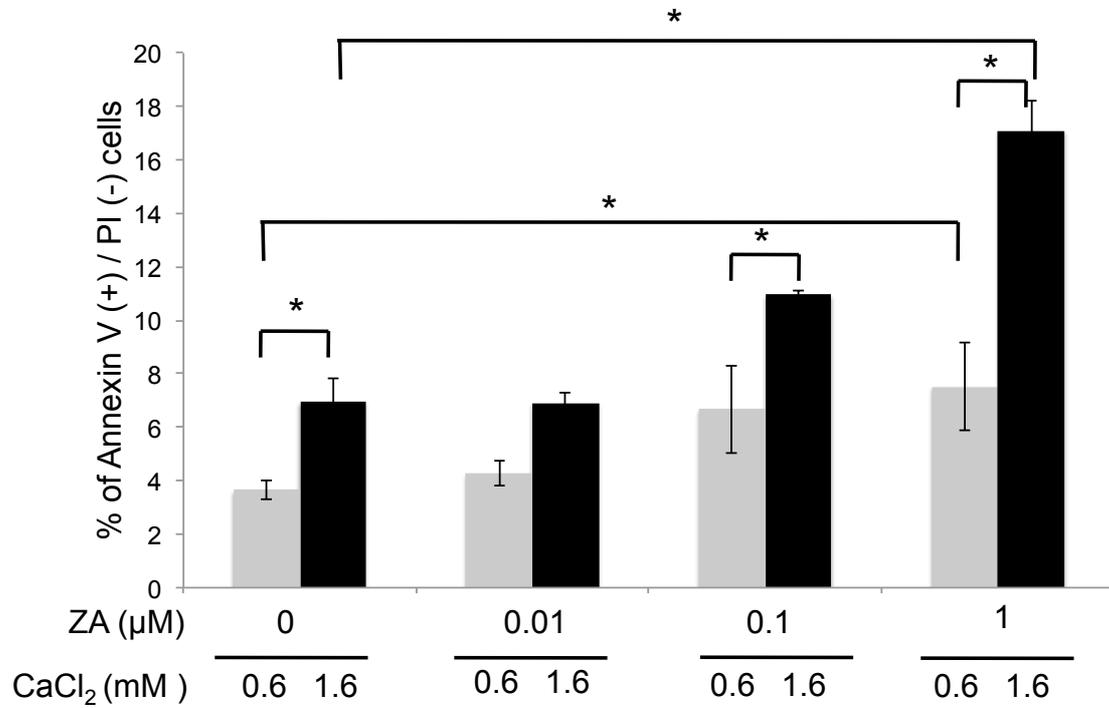
HSC-4 細胞は様々な濃度のカルシウムイオン下に 1 μM の ZA 含有もしくは非含有で 48 時間処理された。その際に培地中に放出される LDH 量をポジティブコントロールに対する割合で示した。

(図 13) 各種癌細胞株に及ぼす ZA とカルシウムイオンの影響



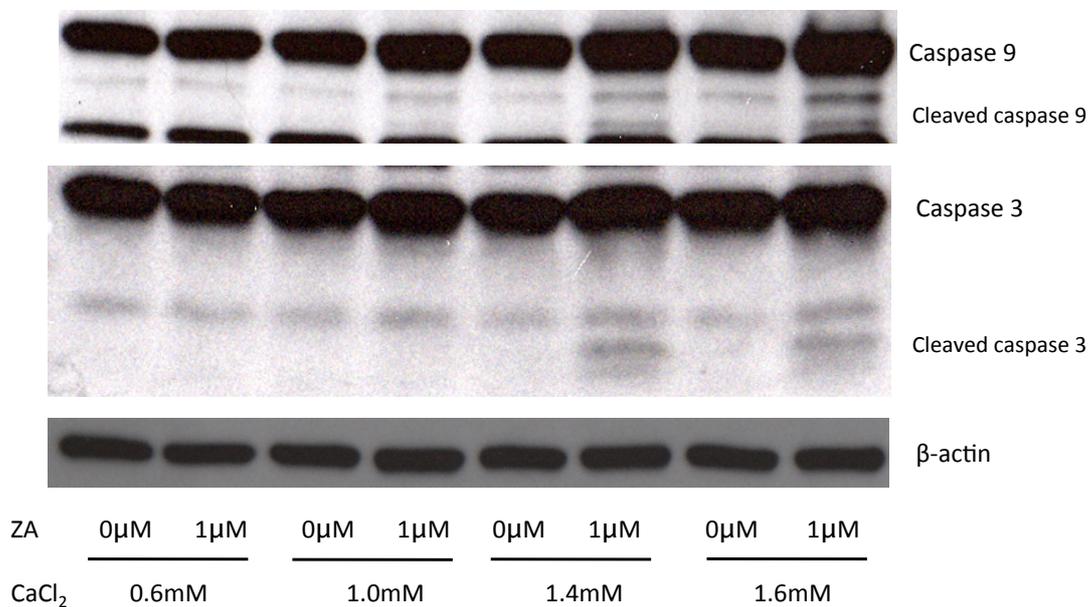
通常含まれる培地中のカルシウムイオンである 0.6 mM とカルシウムイオンを添加した 1.6 mM の 2 つの条件で ZA の投与濃度を 0.01、0.1、0.5、1、3、10 μM と上昇させて HSC-4、SAS、SW480、MCF-7 の各細胞株における細胞増殖抑制効果を調べた。白塗り (○) は 0.6 mM カルシウムイオン、黒塗り (●) は 1.6 mM カルシウムイオンを示す ($n=3$)。

(図 14) HSC-4 細胞において ZA が引き起こすアポトーシスに対して細胞外カルシウムイオンが及ぼす影響



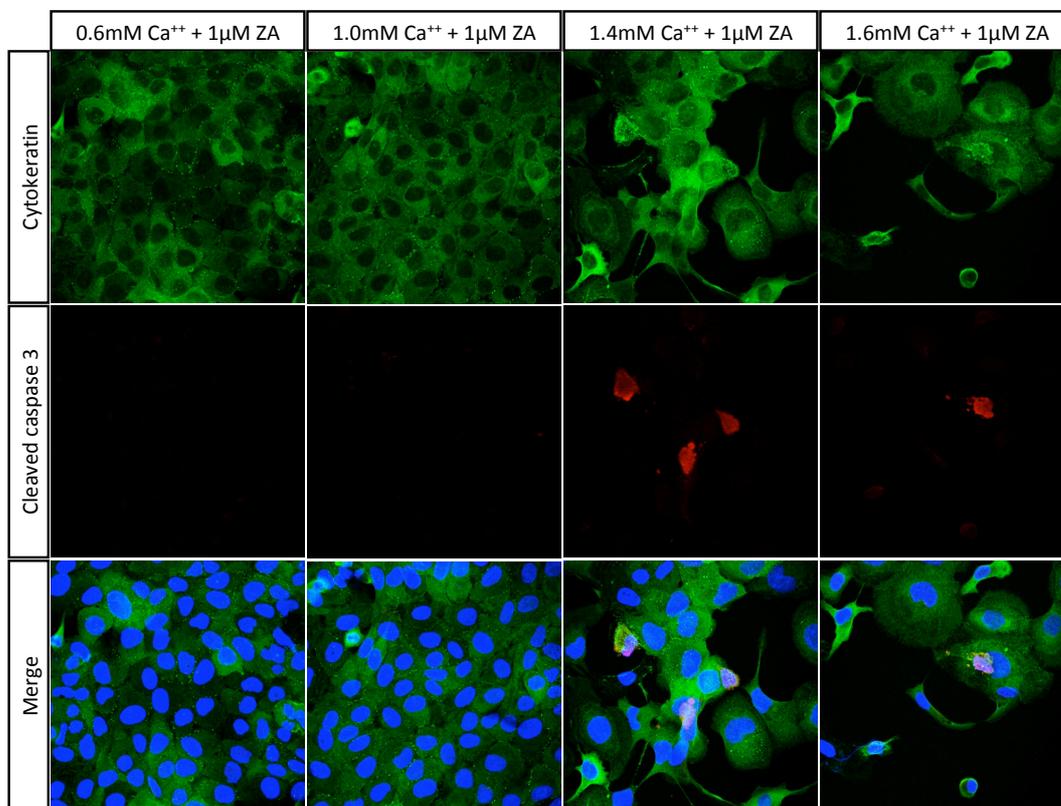
0.6 mMと1.6 mMカルシウムイオンの2つの条件でZAの投与濃度を0.01、0.1、1 μM と上昇させて48時間HSC-4に作用させ、フローサイトメトリーを用いてアネキシンV陽性/PI陰性の細胞数を測定した ($n=3$) *: $P<0.01$ 。

(図 15) ZA とカルシウムイオンがカスパーゼの発現に及ぼす影響



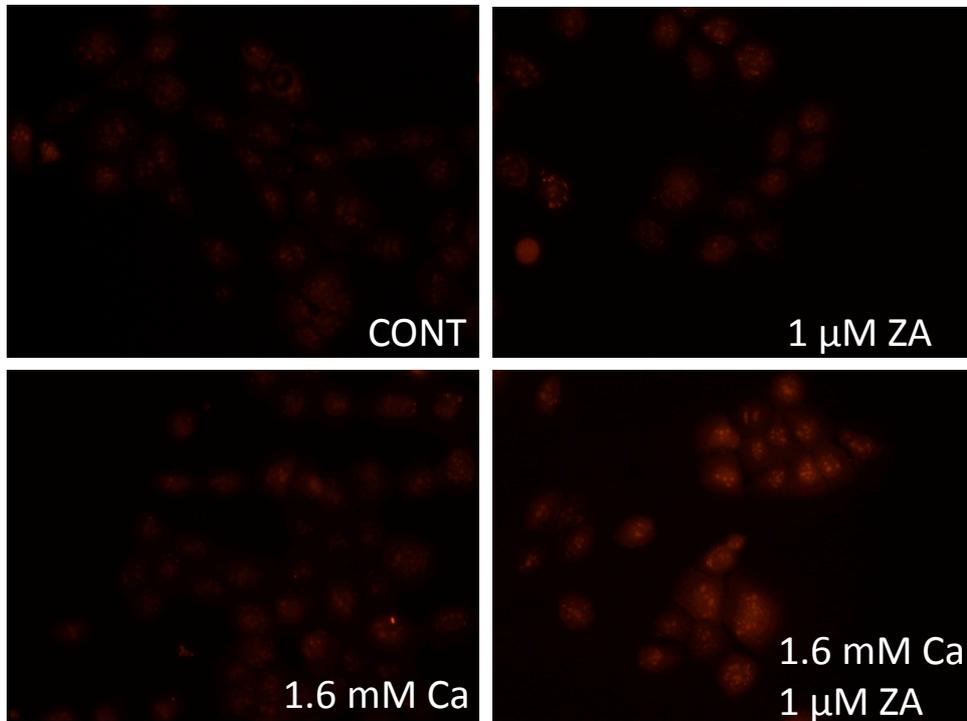
0.6、1.0、1.4、1.6 mM と細胞外カルシウムイオン濃度を増加させて、HSC-4 細胞に 1 µM の ZA を 48 時間作用させた。抽出した総タンパクをウエスタンブロット法で caspase-9 と caspase-3 の発現を調べた。β-Aktin は総タンパクのローディングコントロールとして用いた。

(図 16) 蛍光免疫染色法による caspase-3 活性化



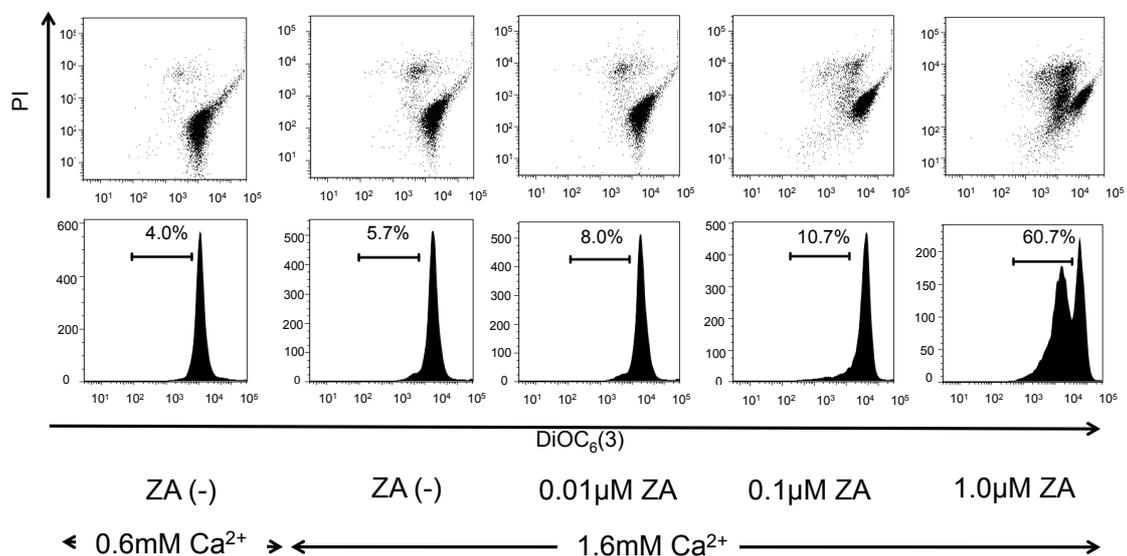
HSC-4 細胞に各濃度のカルシウムイオンと 1 μM の ZA を 72 時間作用させ、活性化の指標である cleaved caspase-3 (赤色) を共焦点顕微鏡で観察した。上段の緑色はサイトケラチンを対比染色し、下段の青色は核を対比染色した。

(図 17) ZA とカルシウムイオンが HSC-4 細胞のミトコンドリアカルシウムの取り込みに及ぼす影響



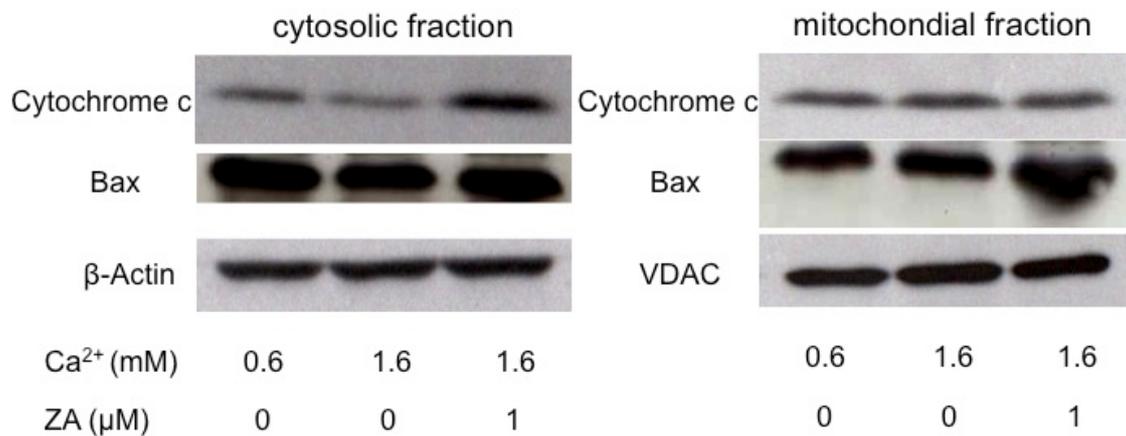
HSC-4 細胞を 0.6 mM カルシウムイオン含有の培地のみ (CONT)、1 μ M の ZA のみ 30 分間作用、1.6 mM カルシウムイオンのみ 30 分間作用、1 μ M ZA と 1.6 mM を 30 分間作用の 4 条件で、ミトコンドリアへのカルシウムイオンの取り込みを Rhod2 蛍光イメージで検討した。

(図 18) ZA とカルシウムイオンが HSC-4 細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響



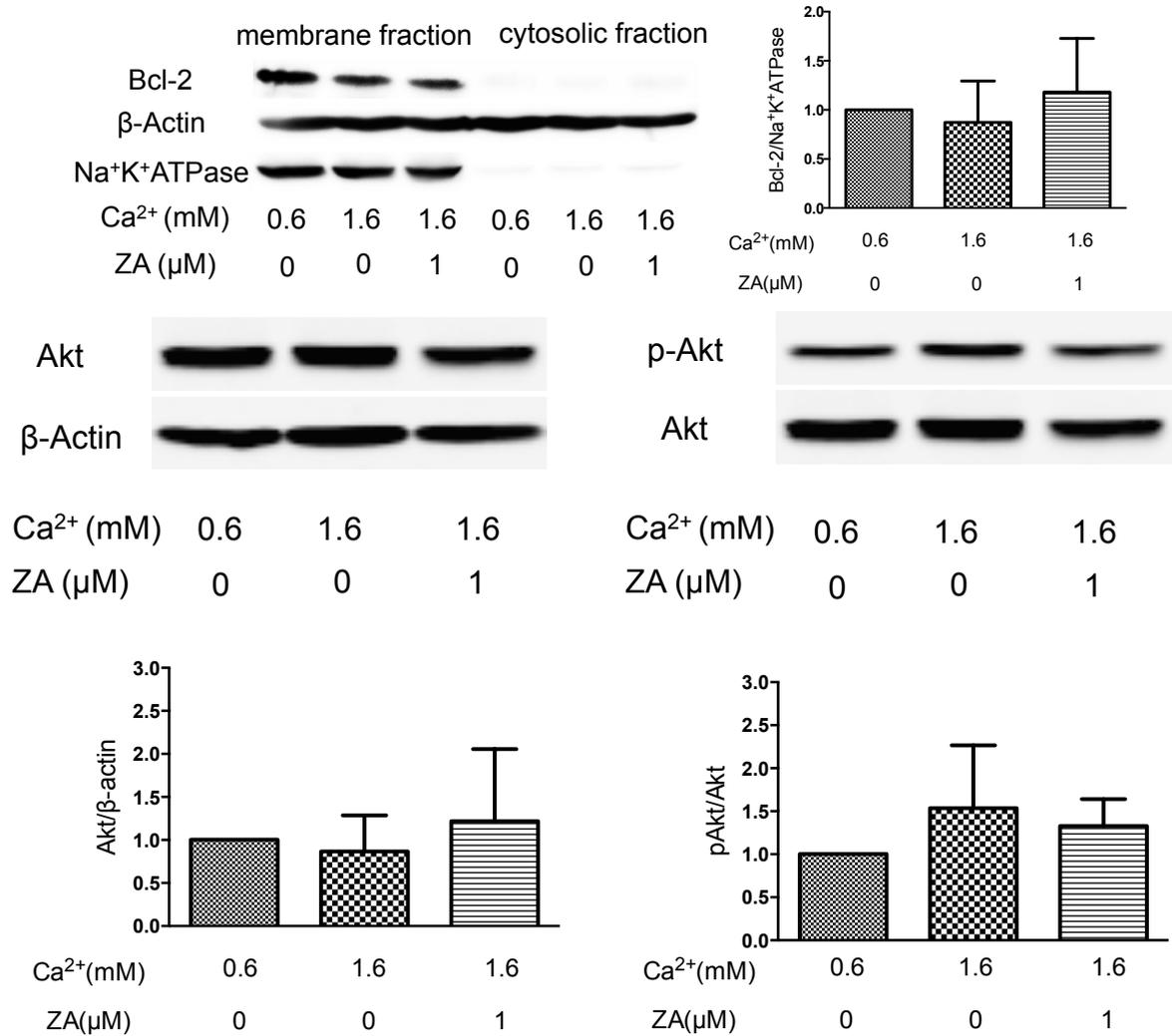
HSC-4 細胞を様々な濃度の ZA (0.01, 0.1, 1 µM) を 1.6 mM カルシウムイオン存在下で 60 時間作用させ、DiOC₆(3)染色を用いてミトコンドリア膜電位の変化を測定した。図中のパーセンテージはミトコンドリア膜電位の低下を示す細胞の割合を表す。

(図 19) ZA とカルシウムイオンが Bax 移行とチトクロム c 放出に及ぼす影響



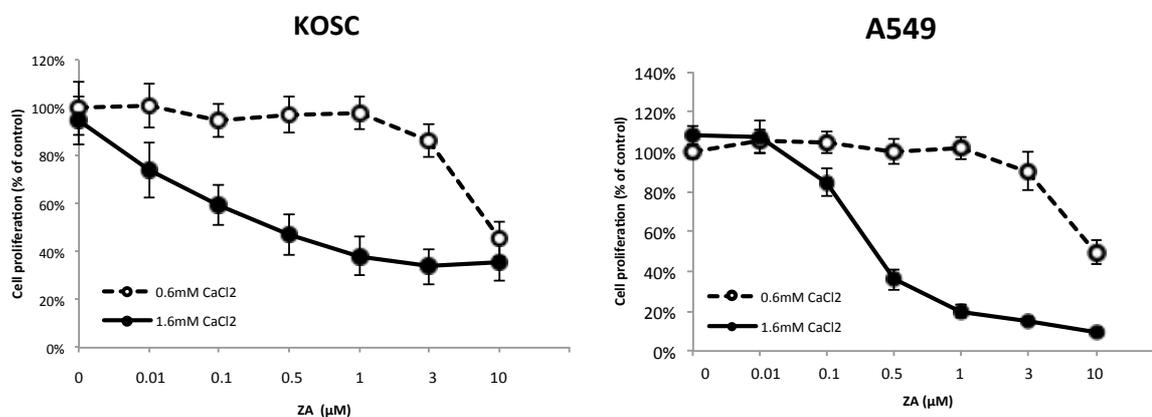
HSC-4 細胞を 0.6 mM か 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に 1 μ M の ZA で 48 時間処理し、細胞質分画（左図）とミトコンドリア分画（右図）に分けて、ウエスタンブロット法を用いてチトクロム c と Bax の出現を調べた。VDAC はミトコンドリアマーカーとして用いた。

(図 20) ZA とカルシウムイオンが Bcl-2 および Akt 発現に及ぼす影響



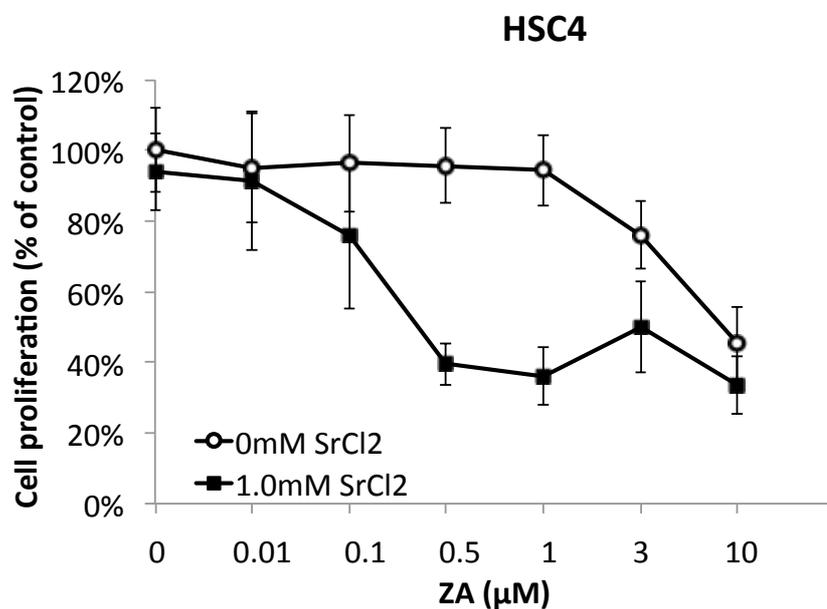
HSC-4 細胞を 0.6 mM か 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に 1 μM の ZA で 48 時間処理し、細胞膜分画と細胞質分画に分けて (上段)、ウエスタンブロット法を用いて Bcl-2 の発現を調べた。Na⁺K⁺ATPase は細胞膜のマーカーとして用いた。Akt の発現およびそのリン酸化レベルは総タンパクを用いて調べた (中段)。

(図 21) その他の口腔扁平上皮癌細胞株 (KOSC) と肺基底上皮腺癌細胞株 (A549) に対する ZA とカルシウムイオンの細胞増殖への影響



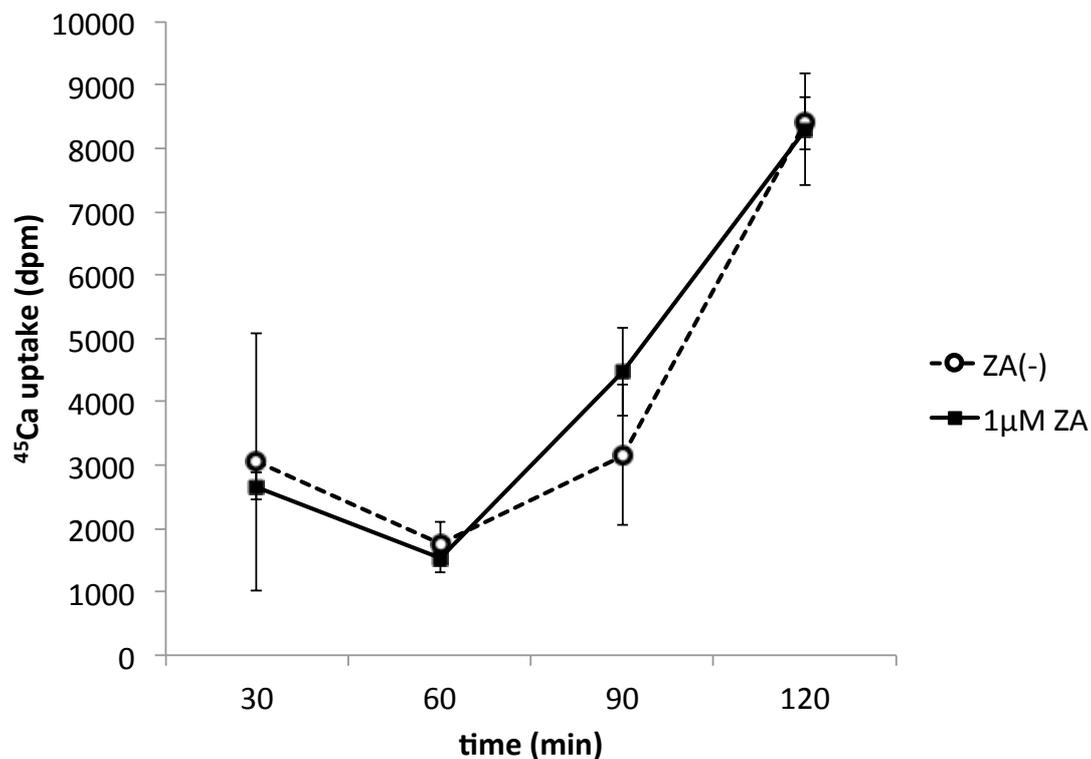
通常含まれる培地中のカルシウムイオンである 0.6 mM とカルシウムイオンを添加した 1.6 mM の 2つの条件で ZA の投与濃度を 0.01、0.1、0.5、1、3、10 μM と上昇させて KOSC と A549 細胞株における細胞増殖抑制効果を調べた。白塗り (○) は 0.6 mM カルシウムイオン、黒塗り (●) は 1.6 mM カルシウムイオンを示す ($n=3$)。

(図 22) HSC-4 細胞に対する ZA とストロンチウムイオンの影響



1.0 mM のストロンチウムイオン含有および非含有下に、ZA の投与濃度を 0.01、0.1、0.5、1、3、10 μM と上昇させて HSC-4 における細胞増殖抑制効果を調べた。白塗り (○) はストロンチウムイオン非含有、黒塗り (■) は 1.0 mM ストロンチウムイオンを示す ($n=3$)。

(図 23) 高濃度細胞外カルシウムイオン存在下で HSC-4 細胞に取り込まれるカルシウム量に及ぼす ZA の影響



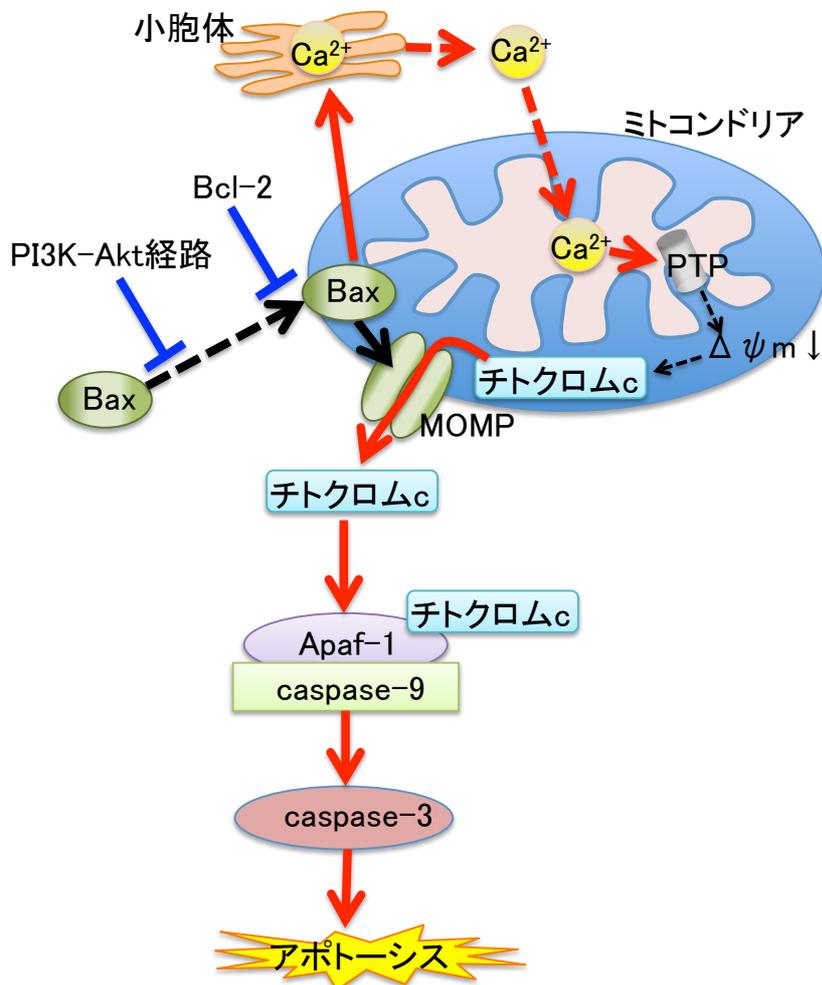
5 $\mu\text{Ci/ml}$ の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (カルシウムイオン濃度としては 0.0088 mM 相当) を含む 1.6 mM のカルシウムイオン存在下に 1 μM の ZA を 60~120 分作用させた後に、細胞を回収し可溶化した ^{45}Ca を液体シンチレーションカウンターで測定した。白塗り (○) はコントロール、黒塗り (●) は 1 μM の ZA を示す ($n=3$)。

(表 2) ZA が増殖抑制を引き起こす濃度に関する過去の報告

報告者 報告年	細胞	IC ₅₀ values
Lee 2001 ²⁵⁾	Human prostate cancer cells (PC3)	25 μ M
Journé 2008 ³²⁾	Human breast cancer (MDA-MB-231)	50 μ M
Sewing 2008 ⁴⁶⁾	Human colon cancer (HCT-116)	12.5 μ M
Romani 2009 ⁴⁷⁾	Human cholangiocarcinoma (TFK-1)	37 μ M
Salvatore 2011 ⁴⁸⁾	Human lung adenocarcinoma epithelial cell line (A549)	20 μ M
Tamura 2011 ⁴⁹⁾	Human tongue squamous cell carcinoma (HSC-3)	50 μ M

ZA の直接的抗腫瘍効果は口腔扁平上皮癌を含む様々な癌細胞株で研究されており、*in vitro* で増殖抑制やアポトーシスの誘導を示す ZA の濃度は 10~50 μ M とされている。

(図 24) ミトコンドリア経路のアポトーシス機序



通常 Bax は細胞質に局在しているが、様々なストレス刺激を受けるとミトコンドリアへ移行する。そのミトコンドリア移行は PI3K-Akt 経路や抗アポトーシス蛋白の Bcl-2 によって抑制される。Bax の活性は小胞体からのカルシウム放出を促し、細胞内カルシウム濃度の上昇はミトコンドリア内膜にあるミトコンドリア膜透過性遷移孔 (PTP) を開口させ、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) が低下し、それによりチトクロム c がミトコンドリアから放出される。また、Bax は活性化されると構造変化を起こし、ミトコンドリア外膜に挿入され、ミトコンドリアの外膜を透過性にしてミトコンドリア外膜透過性亢進 (MOMP) を起こす。それにより膜間腔にあるチトクロム c が漏出する。細胞質に放出されたチトクロム c はアダプタータンパク質である Apaf-1 を介して caspase-9 とその下流の caspase-3 を活性化しアポトーシスが実行される。

8. 参考文献

1. 米田俊之, 2002. 新しい骨のバイオサイエンス, 羊土社, 東京, pp. 126-127.
2. Fleisch, H., Russell, R.G., Biaz, S., Casey, P.A., Müflibauer, R.C., 1968. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. *Calcif. Tissue Res.* 2(suppl), 10–10A.
3. Fleisch, H., Russell, R.G., Francis, M.D., 1969. Diphosphates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165, 1262–1264.
4. Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Boyce, B.F., 1995. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1478–1487.
5. Boissier, S., Ferreras, M., Peyruchaud, O., Magnetto, S., Ebetino, F.H., Colombel, M., Delmas, P., Delaissé, J.M., Clézardin, P., 2000. Bisphosphonates Inhibit Breast and Prostate Carcinoma Cell Invasion, an Early Event in the Formation of Bone Metastases. *Cancer Res.* 60, 2949–2954.
6. Mönkkönen, H., Kuokkanen, J., Holen, I., Evans, A., Lefley, D.V., Jauhiainen, M., Auriola, S., Mönkkönen, J., 2008. Bisphosphonate-induced ATP analog formation and its effect on inhibition of cancer cell growth. *Anticancer Drugs* 19, 391–399.
7. Coleman, R.E., 2012. Adjuvant bone-targeted therapy to prevent metastasis: lessons from the AZURE study. *Curr. Opin. Support Palliat. Care* 6, 322–329.
8. Hamma-Kourbali Y., Di Benedetto M., Ledoux D., Oudar O., Leroux Y., Lecouvey M., Kraemera M. 2003. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 816–823.
9. Johnson, N.W., 2003. Global epidemiology, in: Shah, J.P., Johnson, N.W., Batsakis, J.G. (Eds.), *Oral Cancer*, Martin Dunitz, London, pp. 3-32.
10. Choi, S. Myers, J.N., 2008. Molecular pathogenesis of oral squamous cell

- carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 87, 14-32.
11. 日本口腔腫瘍学会口腔癌治療ガイドライン作成ワーキンググループ・日本口腔外科学会口腔癌診療ガイドライン策定委員会 合同委員会編, 2009. 科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン 2009年度版, 金原出版株式会社, 東京, pp. 11-13.
 12. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006. Bethesda (MD): National Cancer Institute. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/
 13. 上野 正, 岡 達, 他. 1961. 口腔癌の療法と予後に関する研究(第 3 報)下顎癌 122 例について, *口病誌*, 28, 432- 444.
 14. 上野 正, 1969. 口腔癌の治療に関する研究, *口病誌*, 36:4- 19.
 15. 重松 康, 1977. 口腔癌の放射線治療, *日医放誌*, 37, 261- 285.
 16. 小浜源郁, 1990. 下顎歯肉癌, 清水正嗣, 小浜源郁編, 口腔癌 「診断と治療」, デンタルダイヤモンド社, 東京, pp. 212-231.
 17. Totsuka Y., Usui Y., Tei K., et al., 1991. Results of surgical treatment for squamous carcinoma of the lower alveolus: segmental vs. marginal resection. *Head neck* 13, 114-12.
 18. Totsuka Y., Usui Y., Tei K., et al., 1991. Mandibular involvement by squamous cell carcinoma of lower alveolus: analysis and comparative study of histologic and radiologic features. *Head neck* 13, 40-50.
 19. Semba, I., Matsuuchi, H., et al., 1996. Histomorphometric analysis of osteoclastic resorption in bone directly invaded by gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 25, 429-435
 20. Yoneda, T., Williams, P., et al., 1995. Suramin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer. *Cancer Res* 55, 1989-1993.
 21. Martin, C.K., Werbeck, J.L., Thudi, N.K., Lanigan, L.G., Wolfe, T.D., Toribio, R.E., Rosol, T.J., 2010. Zoledronate acid reduces bone loss and tumor growth in an orthotopic xenograft model of osteolytic oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 70, 8607–8615.
 22. Kamiyama, K., Matsuda, N., Yamamoto, S., Takano, K., Takano, Y., Yamazaki, Y., Kageyama, S., Yokoo, H., Nagata, T., Hatakemaya, N., Tsukada, K., Hattori, Y., 2008. Modulation of glucocorticoid receptor

- expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea pig lungs using methylprednisolone. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295, L998–L1006.
23. Shipman, C.M., Rogers, M.J., Apperley, J.F., Russell, R.G.G., Croucher, P.I., 1997. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br. J. Haematol.* 98, 665–672.
 24. Senaratane, S.G., Pirianov, G., Mansi, J.L., Arnett, T.R., Colston, K.W., 2000. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 82, 1459–1468.
 25. Lee, M.V., Fong, E.M., Singer, F.R., Guenette, R.S., 2001. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 61, 2602–2608.
 26. Clézardin, P., 2009. Insights into the antitumor effects of bisphosphonates from preclinical models and potential clinical implications. *IBMS Bonekey* 6, 210–217.
 27. Dunford, J.E., Thompson, K., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Hahn, F.M., Poulter, C.D., Ebetino, F.H., Rogers, J., 2001. Structure–activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 235–242.
 28. Green, J.R., 2003. Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97, 840–847.
 29. Yuasa, T., Kimura, S., Ashihara, E., Habuchi, T., Maekawa, T., 2007. Zoledronic Acid –a Multiplicity of Anti-Cancer Action. *Current Medical Chemistry.* 14, 2126-2135.
 30. Arai, N., Inoue, S., Tomihara, K., Tsuno, H., Noguchi, M., 2012. In vitro synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. *Oral Dis.* 1, 1–6.
 31. Silver, I.A., Murrills, R.J., Etherington, D.J., 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophage and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 175, 266–276.
 32. Journé, J., Kheddoumi, N., Chaboteaux, C., Duvillier, H., Laurent, G., Body, J.J., 2008. Extracellular calcium increases

- bisphosphonate-induced growth inhibition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* doi: 10.1186/bcr1845.
33. Thompson, K., Rogers, M.J., Coxon, F.P., Crockett, J.C., 2006. Cytosolic entry of bisphosphonate drug requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol. Pharmacol.* 69, 1624–1632.
 34. Matczak-Jon, E., Kurzak, B., Kafarski, P., Woźna, A., 2006. Coordination abilities of piperid-1-yl-methane-1, 1-diphosphonic acids towards zinc (I), magnesium (II) and calcium (II): potentiometric and NMR studies. *J. Inorg. Biochem.* 100, 1155–1166.
 35. Festjens, N., Vanden, T., Vandenabeele, P., 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1371–1387.
 36. Kim, Y.R., Lee, S.E., Kang, I.C., Nam, K.I., Choy, H.E., Rhee, J.H., 2013. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium-mediated mitochondrial dysfunction. *J. Infect. Dis.* 207, 1406–1415.
 37. Hattori, Y., Takano, K., Teramae, H., Yamamoto, S., Yokoo, H., Matsuda, N., 2010. Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. *J. Pharmacol. Sci.*, 114, 354–365.
 38. Li, J., Yuan, J., 2008. Caspase in apoptosis and beyond, *Oncogene* 276, 194–6206.
 39. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.G., Didelot, C., Kroemer, G., 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13, 1423–1433.
 40. Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Can. Res. Suppl.* 59, 1593s–1700s.
 41. Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.
 42. Giger E.V., Castagner B., Leroux J.C., 2013. Biomedical applications of bisphosphonates. *J. Control. Release* 167, 175–188.

43. 大廣 洋一, 栗林 和代, 足利 雄一, 小野 貢伸, 鄭 漢忠, 北村 哲也, 進藤 正信, 2013. 口腔癌治療における術前化学療法併用放射線治療の現状. 北海道歯誌 33 : 192-195.
44. Cui, N., Nomura, T., Noma, H., Yokoo, K., Takagi, R., Hashimoto, S., Okamoto, M., Sato, M., Yu, G., Guo, C., Shibahara, T., 2005. Effect of YM529 on a model of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma in mice. *Clin. Cancer Res.* 11, 2713–2719.
45. Inoue S., Arai N., Tomihara K., Takashina M., Hattori Y., Noguchi M., 2015. Extracellular Ca²⁺-dependent enhancement of cytotoxic potency of zoledronic acid in human oral cancer cells. *Eur. J. Pharmacol* 761, 44-54.
46. Sewing, L., Steinberg, F., Schmidt, H., Göke, R., 2008. The bisphosphonate zoledronic acid inhibits the growth of HCT-116 colon carcinoma cells and induces tumor cell apoptosis. *Apoptosis* 13, 782–789.
47. Romani A.A., Desenzani S., Morganti M.M., La Monica S., Borghetti A.F., Soliani P. 2009. Zoledronic acid determines S-phase arrest but fails to induce apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 78, 133–141.
48. Salvatore M.D., Orlandi A., Bagala C., Quirino M., Cassano A., Astone A., Barone C., 2011. Anti-tumour and anti-angiogenic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Proliferation.* 44, 139–146.
49. Tamura, T., Shomori, K., Nakabayashi, M., Fujii, N., Ryoke, K., Ito, H., 2011. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* 25, 1129–1143.