

氏名 いのうえ さやか
井上 さやか

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博乙第 56 号

学位授与年月日 平成 27 年 12 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目 **Molecular and pharmacological analysis of extracellular
Ca²⁺-dependent enhancement of anti-tumor effect of
zoledronic acid in human oral cancer cells**
(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学的解析)

論文審査委員

(主査)	教授	杉山 敏郎
(副査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	近藤 隆
(副査)	教授	將積 日出夫
(紹介教員)	教授	野口 誠

論文内容の要旨

【目的】

ビスフォスフォネート製剤（BPs製剤）は、骨吸収亢進を呈する様々な骨代謝疾患（骨粗鬆症、骨ページット病、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。中でもゾレドロン酸（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の抑制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。最近の研究では、BPsが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が、*in vitro*で抗腫瘍効果を示すBPs濃度は臨床的治療濃度と比較するとかなり高い濃度である。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もち、顎骨浸潤の制御を行うことは、臨床医にとって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。BPsは骨ミネラルに強い親和性を示すため、投与後は骨に集積する。そのため、転移癌による骨吸収部位では骨からBPsとカルシウムイオンが放出されると推測される。口腔扁平上皮癌の場合、原発巣において癌細胞が顎骨を直接浸潤して増大するため、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。そこで、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。

【方法並びに成績】

- 1) 口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-4、SAS）、乳癌細胞株（MCF-7）、大腸癌細胞株（SW480）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（HSC-4、SAS）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、培地中の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MCF-7やSW480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。
- 2) フローサイトメトリーで初期アポトーシス細胞数（アネキシンV陽性/PI陰性細胞）を解析した結果、HSC-4細胞株において、ZAは濃度依存的に初期アポトーシス細胞数を増加させ、それはカルシウムイオンの添加により増強された。また、1.6 mMの細胞外カルシウムイオン存在下では1 μ Mの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。次にアポトーシス関連蛋白を検討した結果、1 μ MのZAと1.6 mMのカルシウムイオンはミトコンドリアの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。

【総括】

本研究は、原発巣でありながら骨転移巣のように骨からの影響を受けやすい口腔扁平上皮癌に対して、臨床的治療濃度のZAが増殖抑制やアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討することを目的として行われた。本研究の結果として、口腔扁平上皮癌細胞株に対しては臨床的治療濃度に近いZAが増殖抑制を示すことが明らかにされ、細胞外カルシウムイオン濃度が上昇すると、ZAによるその抑制効果はより顕著に認めら

れた。そのようなZAの増殖抑制作用の特性は乳癌細胞株や大腸癌細胞株では認められなかった。ZAの口腔扁平上皮癌細胞に対する増殖抑制機序にはミトコンドリアを介したアポトーシス経路が関与していた。以上の結果より、ZAは顎骨浸潤により局所のカルシウムイオン濃度が上昇している口腔扁平上皮癌症例の治療に有用となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

【目的】

ビスフォスフォネート製剤 (BPs 製剤) は骨吸収亢進を呈する様々な骨代謝疾患 (骨粗鬆症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症等) に有用で、中でもゾレドロン酸 (ZA) は転移癌による高カルシウム血症だけでなく骨痛抑制等の骨転移に伴う骨合併症治療薬として用いられている。さらに BPs には癌細胞に対して直接的な抗腫瘍効果があると報告されるが、*in vitro* で抗腫瘍効果を示す濃度は臨床的治療濃度よりもかなり高い。口腔扁平上皮癌は直接、顎骨浸潤するので顎骨浸潤制御は患者の予後改善および機能障害軽減上、重要である。BPs は骨に集積するため、骨から BPs とカルシウムイオンが放出されると推測される。そこで、本研究では、井上さんは ZA を投与した場合、顎骨浸潤部位でカルシウムイオン存在下に臨床的治療濃度で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、その効果と作用機序を解明することを目的とした。

【方法及び成績】

1) 口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-4、SAS)、乳癌細胞株 (MCF-7)、大腸癌細胞株 (SW480) を用い、種々の濃度のカルシウムイオン存在下に ZA (1 μ M) を作用させた。口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-4 では培地中のカルシウムイオン濃度である 0.6 mM でも ZA は濃度依存的に細胞増殖抑制を示した。本濃度は既報の癌細胞株を用いた増殖抑制効果を示す濃度よりもかなり低かった (MCF-7、SW480 では 20 μ M 以上の ZA が必要)。さらに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。この増強された 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。他方、ZA の細胞増殖抑制効果は MCF-7 や SW480 ではカルシウムイオン濃度を上昇させても認められなかった。

2) フローサイトメトリーで初期アポトーシス細胞数 (アネキシン V 陽性/PI 陰性細胞) を解析すると、HSC-4 細胞株では ZA は濃度依存的に初期アポトーシス細胞数を増加させ、この効果はカルシウムイオン添加により増強された。また、1.6 mM の細胞外カルシウムイオン存在下では 1 μ M の 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。1 μ M の ZA と 1.6 mM のカルシウムイオン存在下でアポトーシス関連蛋白発現を検討すると、ミトコンドリアの Bax 発現増加に伴い、細胞質中チトクロム C の放出増加を認め、caspase-9、-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導していた。

【総括】

本研究により、口腔扁平上皮癌細胞株においては臨床的治療濃度に近い ZA 濃度であっても癌細胞増殖抑制効果が示されること、さらに細胞外カルシウムイオン濃度を上昇させると ZA による癌細胞増殖抑制効果は、さらに顕著となることが明らかにされた。ZA の口腔扁平上皮癌細胞株に対する増殖抑制機序にはミトコンドリアを介したアポトーシス誘導が関与していた。しかしながら、かかる臨床的治療濃度での ZA の増殖抑制効果は乳癌細胞株や大腸癌細胞株では認められなかった。

以上の結果より、ZA は、特に顎骨浸潤により局所カルシウムイオン濃度が上昇している口腔扁平上皮癌治療においては高い抗腫瘍効果が期待できることが明らかとなり、今後、顎骨浸潤を伴い、局所カルシウムイオン濃度が上昇している口腔扁平上皮癌症例の新たな治療法への道を切り開く可能性を示唆している点で臨床的発展性も期待できる。

よって、本審査委員会は本研究を学術的ならびに臨床的観点から価値の高いものであると評価し、博士(医学)の学位に十分に値するものと判定した。