

論文の内容の要旨

論文題目：低酸素環境が大腸癌細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響に関する検討

氏名：室野 浩司

【背景】

切除不能な進行再発大腸癌に対しては、化学療法や放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われるが、生存期間は中央値 24 カ月と短く、現状では十分な治療成績が得られていない。治療効果が限定的な要因の一つとして低酸素環境による癌細胞の性質変化が注目されている。癌組織では新生血管の形成が不十分であり、腫瘍内部は低酸素状態に陥ることが多い。低酸素環境下にある癌細胞は、化学療法や放射線照射に対する治療抵抗性を獲得することが知られているが、近年、そのメカニズムとして Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の高発現が注目されている。低酸素環境下において HIF-1 α が癌細胞に高発現すると、抗アポトーシス活性の獲得、細胞周期の停止などにより抗癌剤や放射線治療から逃れ他臓器へ浸潤・転移し増殖する原因となり得る。しかし、大腸癌細胞の低酸素環境下における治療抵抗性獲得の機序に関しては不明な点も多く、また、大腸癌治療において一般的に使用される抗癌剤の HIF-1 α 発現に及ぼす影響についての報告はない。

本研究では、低酸素環境下における大腸癌細胞の抗癌剤感受性を検討し、抗癌剤の効果と HIF-1 α 発現の関係を明らかにすることを目的とした。

【対象および方法】

低酸素環境

マルチガスインキュベーターを用い、低酸素環境（1% 酸素、5% 二酸化炭素、94% 窒素濃度）にて癌細胞を培養した。対照として、正常酸素環境（通常のインキュベーター、5% CO₂）にて培養した。

大腸癌細胞株および抗癌剤

大腸癌細胞株は、ヒト由来の HT29 および SW480 を検討に用いた。抗癌剤として、大腸癌に対して一般的に使用される薬剤である 5-Fluorouracil (FU)、オキサリプラチンおよびイリノテカン代謝産物

である SN38 を用いた。

抗癌剤が細胞増殖に及ぼす影響の検討

低酸素環境および抗癌剤が大腸癌細胞の増殖能に及ぼす影響を、蛍光（カルセイン-AM ; calcein tetraacetoxymethyl ester solution ; Sigma-Ardrich）標識を用いて測定した。

フローサイトメトリー法によるアポトーシスおよび細胞周期の測定

アポトーシスの評価は、FITC 標識 Annexin V および Propidium Iodide (PI) にて二重染色を行い、Annexin V 陽性の分画をアポトーシス細胞集団と判定した。一方、細胞周期の解析は Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit を用い、核内の DNA を PI にて染色しフローサイトメトリー法を用いて各細胞周期の割合を計測した。

Western blotting によるタンパク発現の検討

大腸癌細胞株（HT29、SW480）に抗癌剤を添加して正常酸素／低酸素下で 24 時間培養した後、蛋白を抽出し、電気泳動を行った後、Hybond ECL ニトロセルロース膜 に転写し、現像した。

【結果】

低酸素環境下において抗癌剤が増殖能に及ぼす影響

正常酸素下では 5-FU・オキサリプラチンの作用により大腸癌細胞（HT29 および SW480）の増殖が抑制されたが、低酸素下では増殖抑制効果が見られなかった。一方で SN38 投与により、正常酸素下では両細胞で増殖抑制を認め、HT29 細胞では、低酸素下でも同程度の増殖抑制効果が認められた。SW480 細胞でも、正常酸素下と同様に増殖抑制効果を認めたが低酸素下において SN38 の増殖抑制効果はやや減弱した。

抗癌剤のアポトーシス誘導効果に及ぼす低酸素環境の影響

正常酸素環境下においては、5-FU (10 μ M)、オキサリプラチン (10 μ M)、SN38 (1 μ M) 投与により、両細胞株のアポトーシス誘導効果を認めた。一方、低酸素環境下においては 5-FU、オキサリプラチンのアポトーシス誘導効果は減弱したが、SN38 投与では正常酸素下と同等のアポトーシスが誘導された。

抗癌剤投与による細胞周期分布に及ぼす低酸素の影響

正常酸素下で 5-FU (5 μ M) および SN38 (0.5 μ M) を投与した場合、S 期細胞の割合が増加し、オ

キサリプラチン (5 μM) 投与では S 期および G2/M 期の割合が増加した。一方で、低酸素下での培養では、G0/G1 期細胞の割合が増加し、それに伴い、5-FU やオキサリプラチン投与時に正常酸素下で見られた S 期や G2/M 期細胞の割合増加は減弱した。一方で SN38 投与時には低酸素下においても、正常酸素下と同様に HT29 細胞の S 期の割合が増加した。

大腸癌細胞の HIF-1 α 発現に及ぼす低酸素および抗癌剤投与の影響

正常酸素下で培養した大腸癌細胞株がほとんど HIF-1 α を発現しないのに対して、低酸素下では HIF-1 α が発現した。低酸素下で 5-FU (40 μM)、およびオキサリプラチン (20 μM) を作用した際、HIF-1 α の発現の減弱は見られなかったが、SN38 の作用により、HIF-1 α 発現が減少した。

【考察】

本研究にて大腸癌細胞株 (HT29、SW480) は、低酸素下 (1% 酸素下) において 5-FU やオキサリプラチンに対する治療抵抗性を獲得し、抗腫瘍効果が減弱することを確認した。一方、イリノテカンの活性代謝物である SN38 の抗腫瘍効果は、低酸素環境の影響を受けないことを確認した。これらの抗癌剤の作用機序および低酸素下における抗癌剤獲得の機序について解析したところ、低酸素下では、正常酸素下で認められた 5-FU およびオキサリプラチンのアポトーシス誘導効果は減弱したものの、SN38 は低酸素および正常酸素で同程度のアポトーシスを誘導した。

また、細胞周期分布に及ぼす影響も同様で、5-FU およびオキサリプラチン投与により正常酸素下で誘導される S 期、G2/M 期の細胞割合の増加は、低酸素下で減弱したが、SN38 による S 期細胞の割合増加は正常酸素および低酸素下で同様に見られた。低酸素下においては、いずれも G0/G1 期細胞割合の増加が見られ、それによって抗癌剤効果が減弱したと考えられた。これまでに、低酸素下では口腔癌や卵巣癌において G0/G1 期の細胞割合が増加し、その結果、抗癌剤の抗腫瘍効果が減弱されることが報告されているが、大腸癌細胞でも同様であることを確認した。

上記のことから、低酸素下で発現が増加することが知られている HIF-1 α 発現に及ぼす抗癌剤の影響について検討した。これまでの報告どおり、低酸素下では HT29 および SW480 細胞においても HIF-1 α が高発現した。その条件下で 5-FU やオキサリプラチンを投与しても HIF-1 α の発現に変化は認められなかったが、SN38 投与により両細胞において HIF-1 α 発現が減弱した。低酸素下では HIF-1 α 発現を介して抗アポトーシス活性や G0/G1 期細胞周期停止が誘導されることが報告されており、SN38

は低酸素下での HIF-1 α 発現を抑制することで、抗アポトーシス活性や G0/G1 期の細胞周期停止作用を減弱し、低酸素下においても正常酸素下と同等の抗腫瘍効果を発揮した可能性があると考えられた。ただし、SM38 が HIF-1 α 抑制効果を介して低酸素環境のアポトーシスや細胞周期への影響を減弱させたかどうかについて正確に評価するためには HIF-1 α ノックダウンまたは過剰発現細胞を用いた検討を行う必要がある。

一般的に切除不能大腸癌に対する化学療法として 5-FU、ロイコボリンに加えてオキサリプラチンを併用する FOLFOX 療法ならびにイリノテカンを併用する FOLFIRI 療法が広く用いられており、両者において奏効率も同等とされている。一方で術後の補助化学療法として用いる場合にはオキサリプラチンを加えた化学療法の有用性が確認されているが、イリノテカンに関しては再発予防には寄与しなかったとする報告がある。その理由は明らかになっていないが、本研究においてイリノテカンの代謝産物である SN38 は HIF-1 α の発現抑制効果を有しており、腫瘍が大きく内部が低酸素であると予想されるような腫瘍に対しては FOLFOX よりも FOLFIRI の抗腫瘍効果が期待できるが、術後補助化学療法のように腫瘍が肉眼で確認できないほど非常に小さい腫瘍に関しては FOLFOX の方が強い効果を期待できる可能性が考えられた。副作用の観点から一次治療として FOLFOX が用いられることが多いが、腫瘍が非常に大きく内部が低酸素であると予想されるような腫瘍や HIF-1 α が高発現している腫瘍に関しては FOLFIRI が有効である可能性があり、今後の検討が必要であると考えられた。

結論

低酸素環境の大腸癌に及ぼす影響を検討し、以下の結論を得た。

- 1) 低酸素環境により 5-FU やオキサリプラチンの効果は減弱したが、SN38 に対する効果に及ぼす影響は軽度であった。
- 2) 低酸素環境下において、抗アポトーシス活性や G0/G1 期細胞周期停止を示すことが知られており、5-FU やオキサリプラチンの効果が減弱する原因と考えられた。
- 3) 低酸素環境により HIF-1 α が高発現するが、SN38 投与下ではその発現が抑制された。

本研究が発端となり、HIF-1 α の抑制メカニズムがさらに解明され大腸癌に対して HIF-1 α の発現を考慮した化学療法の選択が行われるようになることを期待する。