

197. 局所酸素濃度上昇による癌新規治療法の開発

長谷川 巧実

Key words : 炭酸ガス, 活性酸素, 扁平上皮癌

*神戸大学 医学部附属病院
歯科口腔外科

緒 言

抗癌剤投与による抗悪性腫瘍効果は、活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) が関与することが示されている¹⁾。しかし、癌組織では酸素供給が不十分であり、低酸素状態では腫瘍の悪性化が増し、ROS の発生も不十分であることが知られている。近年われわれは、局所的炭酸ガス投与装置を開発し、血管拡張作用と Bohr 効果により、筋肉内の局所の酸素供給を増やすことを証明した²⁾。また、これを癌組織に応用し、癌組織内の低酸素環境を改善し、細胞内ミトコンドリア量の増加によるミトコンドリア経路のアポトーシスを活性化することにより、抗腫瘍効果を証明した³⁾。しかし、局所の低酸素環境改善と ROS の関係については不明である。そこで本研究の目的は、癌組織に対して局所的炭酸ガス投与装置を応用し、シスプラチン (CDDP: cisplatin) との併用効果を確認するとともに、局所の酸素供給を増やすことで効率的に ROS を増加させ、抗癌剤の効果促進と副作用抑制を観察し、新たな知見を得て口腔癌の新規治療法を開発することである。

方 法

in vitro で、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 (HSC-3) を培養後、サブコンフルエントになった時点で、CDDP 9.6 μ l/ml を投与し、24 時間作用させた。その後、細胞を回収し RNA およびタンパクの回収を行った。CDDP 非投与群を Control 群とした。すでに報告済みである局所炭酸ガス投与によるミトコンドリア経路のアポトーシスの活性化が CDDP 単独投与により生じているかどうかの確認のため、同経路関連因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α) および mitochondrial transcription factor A (TFAM) について Real time PCR 法にて解析した。また、CDDP 投与による ROS 産生量を FACS および蛍光免疫染色にて解析した。*in vivo* で、HSC-3 (2×10^6 cell) を Nude Mouse 背部に皮下移植し、移植 14 日目より局所的炭酸ガス投与を週 2 回 (投与時間 20 分間) 経皮的に行い、25 日間ののちに評価した。投与方法は、われわれがすでに報告した方法 (図 1) で行った³⁾。同様に移植 14 日目より CDDP 4 mg/kg を Mouse 腹腔内に投与し、CDDP 投与群とした。最終的に、Control 群 (CDDP・CO₂ 非投与)、CO₂ 投与群 (CDDP 非投与)、CDDP 投与群 (CO₂ 非投与)、併用群 (CO₂ + CDDP 投与) の 4 群とした。腫瘍の体積を $V = (\text{最大径}) \times (\text{最小径})^2 \times \pi / 6$ で求め、比較検討した。また副作用の評価として、Mouse 体重の測定を行った。最終評価日に、腫瘍を採取し RNA の回収を行った。*in vitro* での実験と同様に、PGC-1 α および TFAM について Real time PCR 法で解析した。*in vivo* では、さらに転移関連因子の検討を行うため、癌の増殖・浸潤に深く関わる因子である vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP9 について Real time PCR 法で解析した。

*現所属：神戸大学 大学院医学研究科 外科系講座 口腔外科学分野

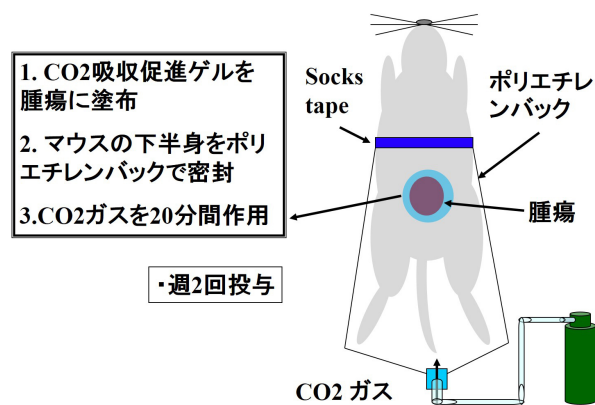


図1. 局所的炭酸ガス投与方法（文献3より改変）.
局所的炭酸ガス投与を週2回（投与時間20分間）経皮的に行った.

結 果

CDDP 単独投与により，ミトコンドリア経路のアポトーシス関連因子である PGC-1 α および TFAM は有意な変化を示さなかった（図2A）. FACS 解析では，データのばらつきが大きく，Control 群と CDDP 投与群において，ROS 発現に明らかな差はなかった（図2B）. 蛍光免疫染色では，CDDP 投与群において，Control 群に比較して ROS 産生の増大や細胞死が確認できた（図2C）.

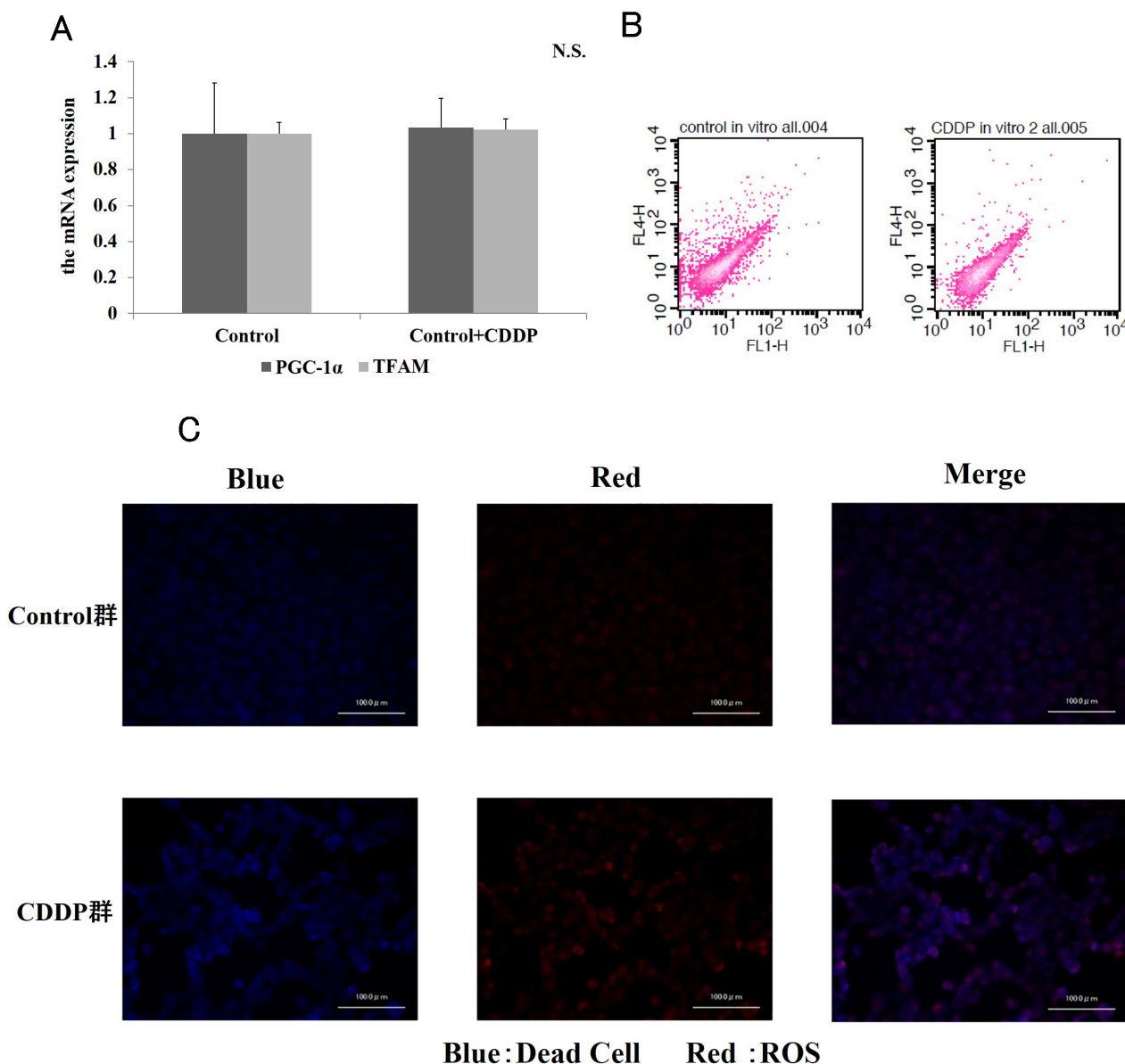


図2. *in vitro*におけるCDDP単独投与によるPGC-1 α , TFAM, ROSの変化.

A) *in vitro*におけるCDDP単独投与によるPGC-1 α およびTFAMの変化. Control群, CDDP群において有意な差はなかった(Mann-Whitney U test). B) *in vitro*におけるCDDP単独投与によるROSの変化(FACS; 横軸 apoptotic cell, 縦軸 ROS activity). Control群とCDDP投与群において, ROS発現に明らかな差はなかった. C) *in vitro*におけるCDDP単独投与によるROSの変化. CDDP投与群において, Control群に比較してROS産生の増大や細胞死が確認できた. Scale bar: 100 μ m

腫瘍体積の結果は, Control群に比較して, CO₂投与群, CDDP投与群, 併用群で有意に腫瘍増大抑制効果を認めた(図3A). しかし, CO₂投与群, CDDP投与群に比較して, 併用群では若干の併用効果は認めるものの, 有意な腫瘍増大抑制効果は認めなかった. 一方, 体重変化については, CDDP投与群, 併用群で若干の減少が認められたが, 有意な差はなく, 重篤な合併症はいずれの群においても生じなかった(図3B).

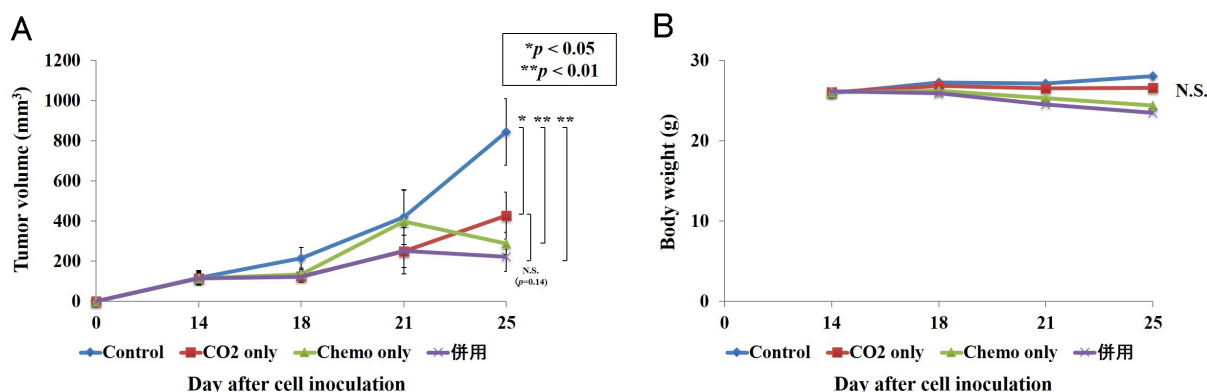


図3. *in vivo*における腫瘍体積と体重の変化.

A) *in vivo*における腫瘍体積の変化. Control群に比較して, CO₂投与群, CDDP投与群, 併用群で有意に腫瘍増大抑制効果を認めた (Kruskal Wallis test & Scheffe test). B) *in vivo*における体重変化. 各群において有意な差はなく, 重篤な合併症はいずれの群においても生じなかった (Kruskal Wallis test & Scheffe test).

ミトコンドリア経路のアポトーシス関連因子である PGC-1 α および TFAM は, Control群に比較して, CO₂投与群で有意に増加したが, CO₂投与群と併用群の間には有意な差はなかった (図4A). また VEGF, MMP2, MMP9 については, Control群に比較して, 他の3群では低下する傾向にあったが有意な差はなかった (図4B).

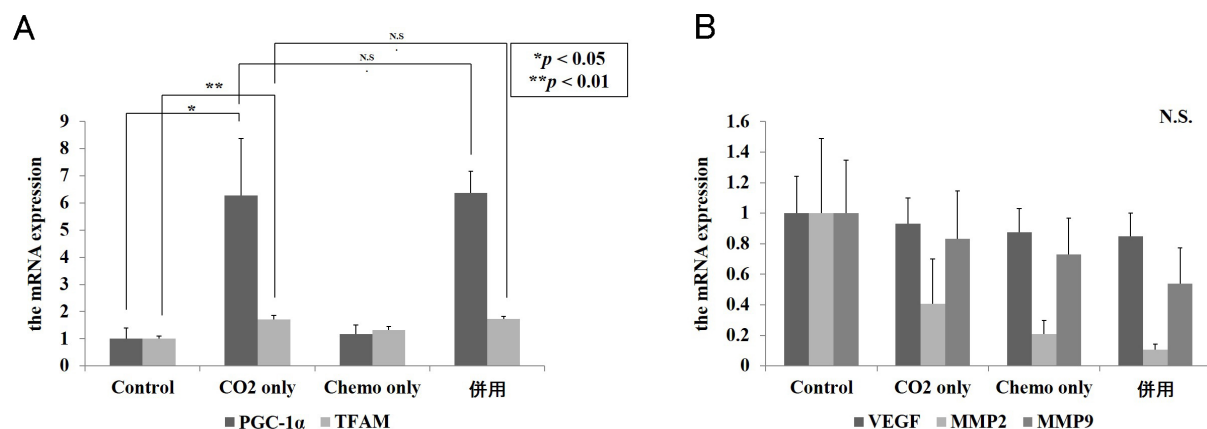


図4. *in vivo*における PGC-1 α , TFAM, VEGF, MMP2, MMP9 の変化.

A) *in vivo*における PGC-1 α および TFAM の変化. Control群に比較して, CO₂投与群で有意に増加したが, CO₂投与群と併用群の間には有意な差はなかった (Kruskal Wallis test & Scheffe test). B) *in vivo*における VEGF, MMP2, MMP9 の変化. Control群に比較して, 他の3群では低下する傾向にあったが有意な差はなかった (Kruskal Wallis test & Scheffe test).

考 察

抗癌剤投与による抗悪性腫瘍効果には, ROS が関与することが示されている¹⁾. しかし, 癌組織では酸素供給が不十分であり, 低酸素状態では腫瘍の悪性化が増し, ROS の発生も不十分であることが知られている. 一方, 近年われわれは, 局所的炭酸ガス投与装置を開発し, 癌組織に応用することで, 癌組織内の低酸素環境を改善し, 細胞内ミトコンドリア量の増加によるミトコンドリア経路のアポトーシスを活性化することにより, 抗腫瘍効果を証明した³⁾. しかし, 扁平上皮癌に対する主要な抗癌剤である CDDP との併用効果や, 炭酸ガス投与による局所の低酸素環境改善と

ROS の関係については不明であった。本研究結果から、明らかな併用効果は確認できなかったものの、局所的炭酸ガス投与が、既存の CDDP に替わる新規治療法となりえる可能性が示唆された。この技術を応用することで、CDDP 投与量の低下につながれば、患者にとって大きな福音をもたらす。また副作用の軽減という腫瘍の治療において、非常に大きなインパクトを与えることが予測される。

局所的炭酸ガス投与はすでにわれわれが報告しているように PGC-1 α , TFAM を介したミトコンドリア経路のアポトーシスの活性化による抗腫瘍効果が主であるのに対して、CDDP は既知のとおり DNA 複製阻害を含めた細胞毒性作用が主である。本研究においては、この 2 つの治療法が抗腫瘍効果を発揮する経路が違うことが、局所的炭酸ガス投与と CDDP の明らかな併用効果が確認できなかった理由として考えられる。しかし、有意な差はなかったものの、*in vivo* の実験での腫瘍体積や VEGF, MMP2, MMP9 は CO₂・CDDP 併用群で減少傾向であり、今後投与方法や投与期間などを再考し、併用効果をさらに検討していきたい。また、CDDP 投与による ROS 産生量の FACS での解析結果はばらつきが大きく、明らかな傾向を確認できなかったが、蛍光免疫染色では ROS 産生量の増加を確認できており、今後、別の測定方法をさらに検討していきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学医学部附属病院歯科口腔外科の武田大介医員である。本研究の指導者は、神戸大学大学院医学研究科外科系講座口腔外科学分野の古森孝英教授である。

文 献

- 1) Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E. & García-Berrocal, J. R. : Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **269** : 2455-2459, 2012.
- 2) Oe, K., Ueha, T., Sakai, Y., Niikura, T., Lee, S. Y., Koh, A., Hasegawa, T., Tanaka, M., Miwa, M. & Kurosaka, M. : The effect of transcutaneous application of carbon dioxide (CO₂) on skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **407** : 148-152, 2011.
- 3) Takeda, D., Hasegawa, T., Ueha, T., Imai, Y., Sakakibara, A., Minoda, M., Kawamoto, T., Minamikawa, T., Shibuya, Y., Akisue, T., Sakai, Y., Kurosaka, M. & Komori, T. : Transcutaneous carbon dioxide induces mitochondrial apoptosis and suppresses metastasis of oral squamous cell carcinoma *in vivo*. *PLoS One*. **9** : e100530, 2014.