

博士<健康科学>論文

食道癌細胞株 TE-1 に対する
EPA(Eicosapentaenoic acid)と CDDP(Cisplatin)の
併用における
抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に関する研究

2019年3月

小郷 絢子

川崎医療福祉大学大学院
医療技術学研究科
健康科学専攻

目次

食道癌細胞株 TE-1 に対する EPA(Eicosapentaenoic acid)と CDDP(Cisplatin)の併用における抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に 関する研究	3
第 1 章 序章	3
第 1 節 研究の背景	3
第 2 節 研究の目的	5
第 3 節 研究の構成	5
第 2 章 食道癌細胞株 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用における 抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に関する研究	7
第 1 節 TE-1 に対する EPA と各種抗癌剤の併用による細胞増殖能 への影響(実験 1).....	7
I. 緒言	7
II. 方法	7
III. 結果	9
IV. 考察	17
V. 著作権について	17
第 2 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす NF- κ B 活 性化(核内移行)への影響(実験 2)	18
I. 緒言	18
II. 方法	18
III. 結果	20
IV. 考察	22
第 3 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす IL-6 産生 能への影響(実験 3)	23
I. 緒言	23
II. 方法	23
III. 結果	25

IV. 考察	29
第4節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用をもたらす apoptosis への影響(実験4).....	30
I. 緒言	30
II. 方法	30
III. 結果	32
IV. 考察	35
第5節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用をもたらす細胞周期へ の影響(実験5).....	36
I. 緒言	36
II. 方法	36
III. 結果	38
IV. 考察	42
第3章 総合討論	43
第1節 総合討論	43
第2節 今後の展望	46
第4章 結語	46
謝辞	46
利益相反の開示	47
参考・引用文献	48
投稿論文	52
学会発表	52

食道癌細胞株 TE-1 に対する EPA(Eicosapentaenoic acid)と CDDP(Cisplatin) の併用における抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に関する研究

第 1 章 序章

第 1 節 研究の背景

食道癌手術の予後は、他消化管癌に対して再発率も高く不良である。5年相対生存率は全癌 79.1%、胃癌 78.9%、結腸癌 77.2%、直腸癌 76.8%に対して食道癌は 54.7%である¹⁾。

その一因として手術侵襲が大きなことが挙げられる。手術侵襲は副腎皮質ホルモンの上昇、凝固能の亢進、免疫能の低下、活性酸素の産生を惹起し、癌細胞の転移や増殖を促進することが考えられる(Surgical Oncotaxis)²⁾。手術侵襲により体内に大量のサイトカインが放出されることをサイトカインストームと呼ぶが、このサイトカインストームにより更なる炎症が引き起こされ、癌細胞の増殖や転移を促進し、apoptosisの阻害を起こすと示唆されている。

Surgical Oncotaxisを抑制するためには、術後サイトカインストームを制御する必要があるが、サイトカイン産生のkey proteinはNF- κ B(nuclear factor-kappa B)である。NF- κ Bは動物細胞のほぼすべてに発現している転写因子で、急性および慢性炎症反応や細胞増殖、apoptosisなどの数多くの生理現象に関与している。NF- κ B/Rel 複合体はI κ Bタンパクと結合することで転写活性が抑制されており、細胞質に存在している。サイトカイン等の刺激がIKK複合体を活性化し、それがI κ Bタンパクをリン酸化する。I κ Bのリン酸化はI κ Bのユビキチン化とプロテアソーム分解を引き起こし、一方でNF- κ B/Rel複合体を自由にする。活性化されたNF- κ B/Rel複合体はリン酸化によりさらに活性化され、核へと移行し、標的遺伝子の発現を引き起こす。よって、NF- κ B/Rel複合体の核内移行(以下、NF- κ B活性化(核内移行))を制御することがサイトカインストームを制御する手段となる。

NF- κ B活性化(核内移行)を制御する物質としてEPA(Eicosapentaenoic acid)が注目されている。EPAはn-3系脂肪酸の多価不飽和脂肪酸の一つであ

る。魚油に豊富に含まれており、血小板凝集抑制作用があることが知られている。脂質代謝、血液凝固、糖代謝異常の改善にも効果があることが報告されている。一方で NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制し、腫瘍増殖抑制、apoptosis 誘導をすることが明らかになっている³⁾。食道癌細胞株 TE-1 に対して NF- κ B 活性化(核内移行)を刺激する LPS(Lipopolysaccharide)を添加した実験では、LPS と EPA を同時添加した群が、LPS 単独添加群と比較して産生される IL-6 量が減少したと報告されている。また、EPA を添加して培養した TE-1 の NF- κ B 活性化(核内移行)を免疫組織化学染色で観察した実験でも、LPS 単独添加群に比べて LPS と EPA を同時添加した群が NF- κ B 活性化(核内移行)率は減少していた。さらに EPA は TE-1 に対して抗腫瘍効果を示し、50%阻止濃度 (IC₅₀)は 260 μ M であった。すなわち EPA は腫瘍のサイトカイン産生抑制効果のみならず抗腫瘍効果も有していることが判明した³⁾。

EPA を用いた消化器癌治療の研究について、胃癌・膵臓癌・大腸癌の外科手術を受けた患者にサプリメントなどで 1 日 1~2g の EPA を投与したところ、入院日数・感染症発生件数・血中炎症性サイトカイン IL-6 濃度は低下し、栄養状態や免疫力は向上するという報告⁴⁾がある。

Cisplatin(CDDP)は多くの癌に有効性が認められているプラチナ製剤である。現在、食道癌においては、術前 5-FU と CDDP の併用療法が標準とされている⁵⁾。CDDP は腫瘍縮小作用が大きい反面、有害事象も強く、代表的なものには腎毒性、悪心、嘔吐、食欲不振、聴器毒性がある。腫瘍縮小作用の相乗効果を期待した抗癌剤 2 剤、あるいは 3 剤併用治療は以前から行われているが、当然有害事象は増強し、完遂率は低下する。術前投与においては合併症が増加することが懸念される。

EPA は有害事象が極めて低く、なおかつ抗腫瘍効果を持つことが判明した。そこで EPA と CDDP を併用することにより、腫瘍縮小作用の相乗効果が得られ、さらにサイトカイン産生抑制効果が得られれば、食道癌手術の術前治療法としても極めて有用であり、また CDDP を用いた食道癌治療を受ける患者の健康科学に寄与できるものと考えられる。

第 2 節 研究の目的

食道癌細胞株 TE-1 に EPA と CDDP を併用して腫瘍縮小作用の相乗効果があるか否かを検証する。EPA 単独、CDDP 単独で細胞増殖率の減少、腫瘍縮小作用があることが判明しているが、併用した場合に相加効果以上の効果があるかを検討する。また、癌細胞の増殖やサイトカイン産生、apoptosis に NF- κ B 活性化(核内移行)が大きく関与していることから、EPA と CDDP を併用した場合の NF- κ B 活性化(核内移行)の変化、それに伴う細胞増殖率、サイトカイン産生量、apoptosis に向かう細胞数等の変化、細胞周期の変化を観察し、その機序を明らかにする。

第 3 節 研究の構成

本研究は以下のように構成されている。

第 1 章 序章

第 1 節 研究の背景

第 2 節 研究の目的

第 3 節 研究の構成

第 2 章 食道癌細胞株 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用における抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に関する研究

第 1 節 TE-1 に対する EPA と各種抗癌剤の併用による細胞増殖能への影響(実験 1)

第 2 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす NF- κ B 活性化(核内移行)への影響(実験 2)

第 3 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす IL-6 産生能への影響(実験 3)

第 4 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす apoptosis への影響(実験 4)

第 5 節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす細胞周期への影響(実験 5)

第 3 章 総合討論

第 1 節 本研究で得られた成果

第 2 節 今後の展望

第 4 章 結語

謝辞

利益相反の開示

参考・引用文献

第2章 食道癌細胞株 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用における抗腫瘍および抗炎症効果増強作用に関する研究

第1節 TE-1 に対する EPA と各種抗癌剤の併用による細胞増殖能への影響(実験1)

I. 緒言

EPA 単独で TE-1 細胞増殖能を低下させることが判明している³⁾。また、セルラインでは膵臓癌、乳癌、結腸癌、肝細胞癌でも明らかになっている⁶⁾。食道癌細胞株 TE-1 を用いて、ドセタキセル・パクリタキセル・5-FU、CDDP と EPA の併用が細胞増殖能に対してどのような影響を及ぼすかを検討した。細胞増殖能は、生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (WST-1) のホルマザン色素への変換を利用して、このホルマザン色素濃度を吸光度で測定することにより測定する方法を用いた。

II. 方法

培養細胞株と培養方法

理化学研究所(埼玉)から購入したヒト食道癌由来細胞株 TE-1 を用いた。10% FBS、100units/ml ペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含む RPMI-1640 培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用い、37度、5% CO₂ 環境下にて培養した。cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid sodium salt は MERCK(St. Louis, MO)から購入し、PBS に溶解して保存した。

抗癌剤

使用した抗癌剤は、パクリタキセル注(Nippon Kayaku, Tokyo, Japan)、ドセタキセル点滴静注(Towa Pharmaceutical, Osaka, Japan)、5-FU 注(Kyowa Hakko Kirin, Tokyo, Japan)、シスプラチン注(CDDP ; Nichi-Iko Pharmaceutical, Toyama, Japan)である。

抗癌剤の濃度決定

パクリタキセル・ドセタキセルについては、予備実験として、0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml のパクリタキセルもしくはドセタキセルを TE-1 に 24 時間作用させ、細胞増殖率を観察した。その結果、パクリタキセルは 30 μ g/ml で 32% まで、ドセタキセルは 30 μ g/ml で 66%、40 μ g/ml で 24% に細胞増殖率が抑制されていた。この結果をもとに EPA との併用効果を観察するパクリタキセル・ドセタキセルの濃度は、0, 10, 20, 30 μ g/ml と決定した。

5-FU については、予備実験として、0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ g/ml の 5-FU を TE-1 に 24 時間作用させ、細胞増殖率を観察した。その結果、60 μ g/ml でも 77% 程度にしか細胞増殖率を抑制していなかった。5-FU 投与時の血中濃度について癌患者 5 名に 5-FU 500mg/body を one shot 静注後の平均血中濃度は、15 分で 15.3、30 分で 3.9、60 分で 0.35 μ g/ml と推移し、投与後 90 分には検出限界以下になった⁶⁾、5-FU 持続静注時の血中濃度については 5-FU 60mg/kg を 1500ml の電解質輸液で希釈し、48 時間かけて末梢静脈より持続点滴静注した場合、点滴投与中の 5-FU 血中濃度は約 6 時間で定常状態 (約 0.6 μ g/ml) に達し、その後持続的に推移したという報告がある⁷⁾。これより EPA との併用効果を観察する 5-FU の濃度は 0, 1, 2, 5, 10 μ g/ml と決定した。

CDDP については、予備実験として、0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 μ g/ml の CDDP を TE-1 に 24 時間作用させ、細胞増殖率を観察した。その結果、細胞増殖率は CDDP 10 μ g/ml で 74% に抑制されていたが、150 μ g/ml でも 48% までの抑制しか見られなかった。CDDP を投与した際の血中濃度は 2~5 μ g/ml という報告があり⁸⁾、EPA との併用効果を観察する CDDP の濃度は、0, 1, 2, 5, 10 μ g/ml と決定した。

WST-1 による細胞増殖能測定

96well plate に 2×10^4 cells/ml、100 μ l/well、 2×10^3 cells/well となるよう TE-1 を播種した。24 時間培養し、所定の EPA、パクリタキセル、ドセタキセル、5-FU、CDDP を含む培地に交換した。培地交換後、24、48、72 時間

後に WST-1(Takara, Tokyo, Japan)10ul を加え、37 度で保温し、4 時間後に 450nm, 550nm 波長の吸光度をマイクロプレートリーダーVarioskan Flash(Thermo Fisher Scientific, MA)にて測定した。各条件 8 点測定した。

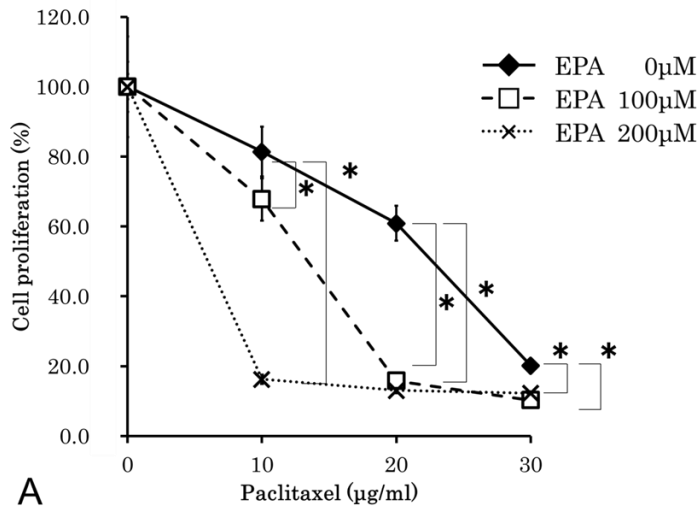
統計処理

各実験は 8 点ずつを 1 回として計測し、3 回行った。平均値±標準偏差を取った。まず全体について二元配置分散分析を行い、有意差が認められたものについて各群において t 検定を行った。有意水準は $p<0.01$ とした。

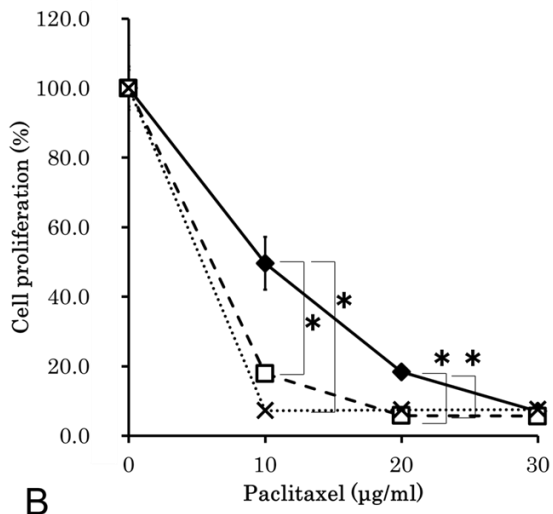
Ⅲ. 結果

EPA とパクリタキセルの併用の場合、EPA のみでは細胞増殖率が 98.2～106.6%とほぼ変化がなかった(結果図表は省略)が、パクリタキセルを併用すると EPA の濃度依存的に細胞増殖が抑えられた。パクリタキセル 10 μ g/ml・添加時間 24 時間の場合、EPA0 μ M を 100%とすると、EPA100 μ M では 83.3%、EPA200 μ M では 20.0%に細胞増殖が抑えられた。($p<0.01$, Figure 1A)

添加時間が 48 時間になると EPA100 μ M 単独では 117.5%、EPA200 μ M 単独では 84.8%の細胞増殖率を示した(結果図表は省略)が、EPA の濃度依存的な変化ではない。パクリタキセルと併用すると、パクリタキセル 10 μ g/ml の場合、EPA0 μ M 時を 100%とすると、EPA100 μ M では 36.1%、EPA200 μ M では 14.5%と EPA の濃度依存的に細胞増殖は抑えられていた。($p<0.01$, Figure 1B)



A



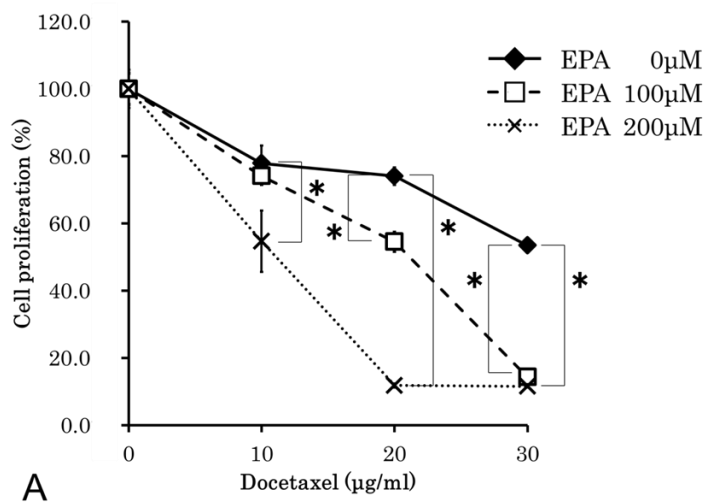
B

Figure 1 EPA・パクリタキセル併用時の TE-1 細胞増殖率。

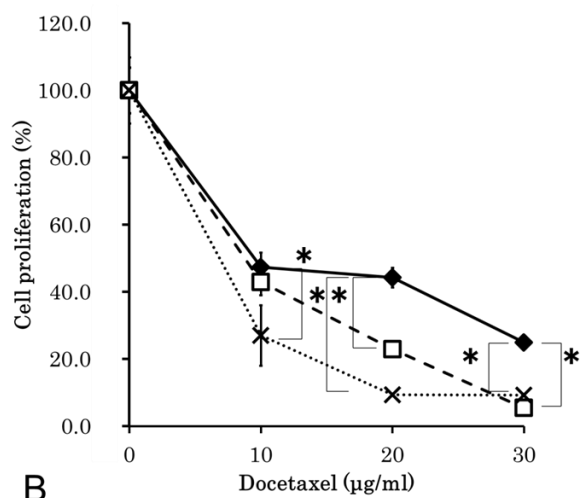
(A)24 時間培養後、(B)48 時間培養後 WST-1 アッセイにて細胞増殖率を測定。

(* : $p < 0.01$)

EPA とドセタキセルの併用の場合もパクリタキセルと同様であった。24 時間添加の場合、EPA のみでは 100~108.5% の細胞増殖であった(結果図表は省略)。ドセタキセル 20 μ g/ml 時には EPA0 μ M を 100% とすると EPA100 μ M では 73.6%、EPA200 μ M では 15.9% の細胞増殖率となり、EPA の濃度依存的に細胞増殖率が抑えられていた ($p < 0.01$, Figure 2A)。48 時間添加の場合、EPA0 μ M 100%、EPA100 μ M 123.2%、EPA200 μ M 83.8% の細胞増殖率であったが、EPA の濃度依存的ではなかった(結果図表は省略)。ドセタキセル 20 μ g/ml を併用すると、EPA0 μ M を 100% とした場合、EPA100 μ M では 51.8%、EPA200 μ M では 21.3% と、EPA の濃度依存的に細胞増殖を抑制していた。 ($p < 0.01$, Figure 2B)



A



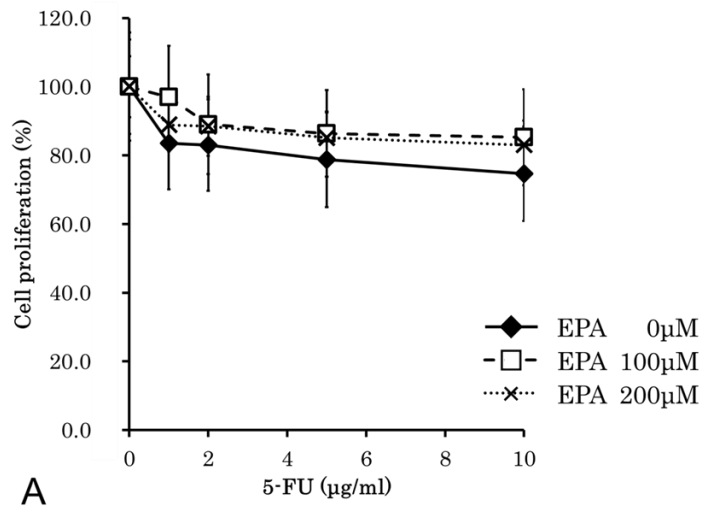
B

Figure 2 EPA・ドセタキセル併用時の TE-1 細胞増殖率。

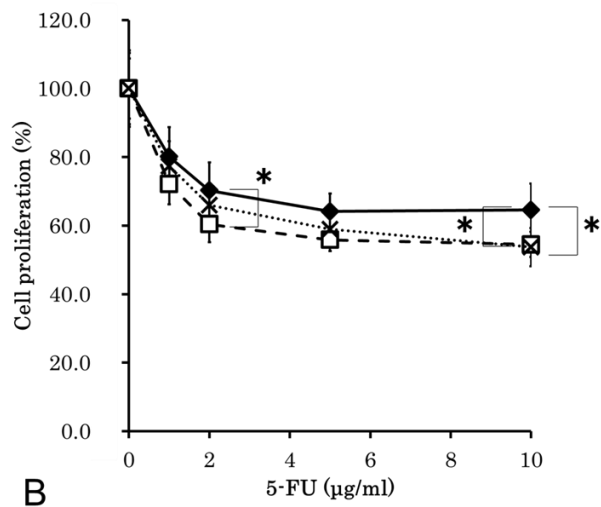
(A)24 時間培養後、(B)48 時間培養後 WST-1 アッセイにて細胞増殖率を測定。

(* : $p < 0.01$)

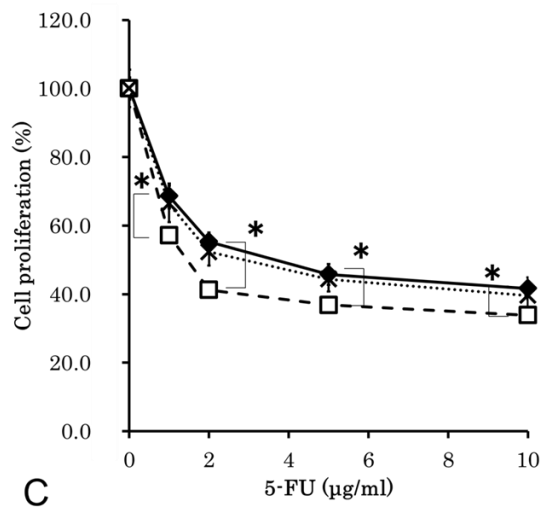
EPA と 5-FU の併用では、EPA による細胞増殖抑制効果は見られなかった。添加時間が長くなるにしたがって、低濃度 5-FU でも細胞増殖が抑えられているが、EPA の濃度には関連がなく、EPA 濃度間では有意差が見られなかった。5-FU が細胞増殖を濃度依存的に抑えているということに関しては有意差が見られた。(p<0.01, Figure 3A-C)



A



B

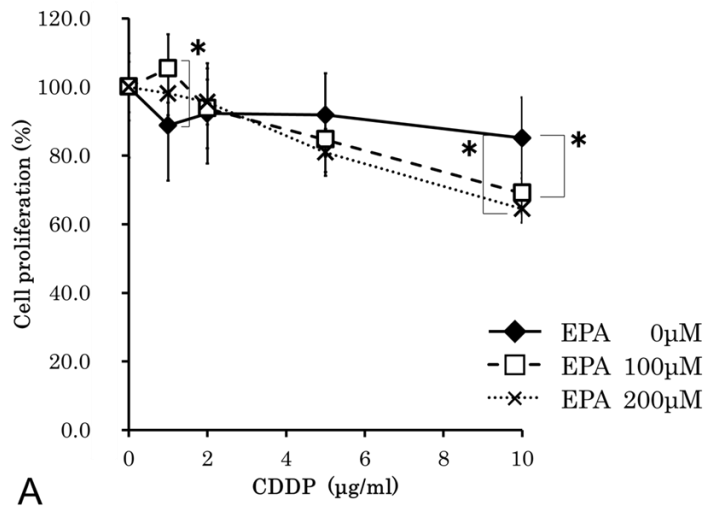


C

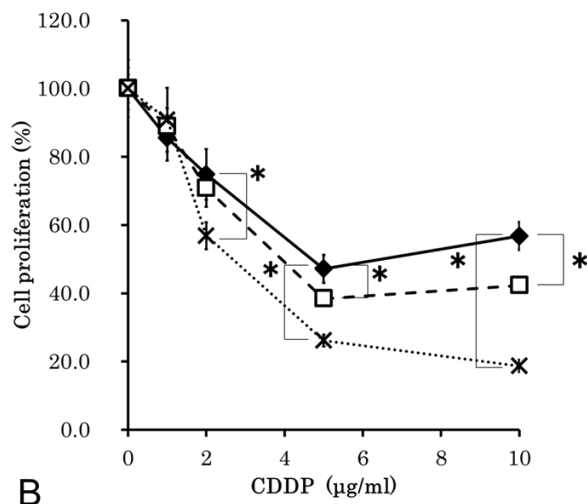
Figure 3 EPA・5-FU 併用時の TE-1 細胞増殖率。

(A)24 時間培養後、(B)48 時間培養後、(C)72 時間培養後 WST-1 アッセイにて細胞増殖率を測定。(*:p<0.01)

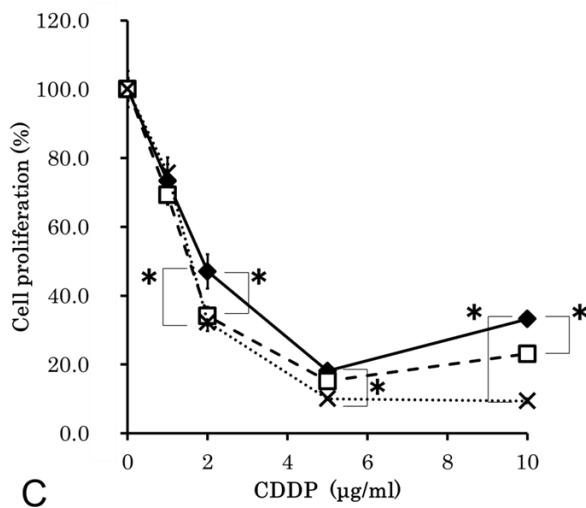
EPA と CDDP の併用では、24 時間添加の場合 EPA の濃度依存的に細胞増殖抑制傾向が見られたが有意差はなかった (Figure 4A)。48 時間添加の場合、EPA のみでは 94.6~100% の細胞増殖率であった (結果図表は省略) が、CDDP5 μ g/ml を併用した場合、EPA0 μ M 時を 100% として、EPA100 μ M 時 81.3%、EPA200 μ M 時 55.5% と EPA の濃度依存的に細胞増殖を抑制していた ($p<0.01$, Figure 4B)。72 時間添加の場合、EPA のみでは 92.6~100% の細胞増殖率であった (結果図表は省略) が、CDDP5 μ g/ml 併用時には EPA0 μ M 時を 100% として、EPA200 μ M 時は 55.8% に細胞増殖を抑制していた ($p<0.01$, Figure 4C)。



A



B



C

Figure 4 EPA・CDDP 併用時の TE-1 細胞増殖率。

(A)24 時間培養後、(B)48 時間培養後、(C)72 時間培養後 WST-1 アッセイにて細胞増殖率を測定。(*:p<0.01)

IV. 考察

実験 1 では TE-1 に対し、EPA と抗癌剤(パクリタキセル、ドセタキセル、5-FU、CDDP)を併用した場合の細胞増殖率を観察した。抗癌剤は単独投与である。EPA 単独では細胞増殖抑制効果は見られない濃度を添加している。これは抗癌剤との併用効果を分かりやすく観察するためである。TE-1 の EPA に対する IC₅₀ が 260 μM であることから EPA 濃度を 200 μM 以下と決定した。

EPA と 5-FU の併用では、細胞増殖率に対する併用効果は見られなかった。EPA とパクリタキセル、ドセタキセル、CDDP のそれぞれとの併用では、抗癌剤単独での細胞増殖抑制効果に加え、EPA の濃度依存的に細胞増殖を抑制しており、併用効果が見られた。

EPA 単独で細胞増殖抑制効果を表さない濃度でも、抗癌剤を併用した場合、抗癌剤の細胞増殖抑制効果を相乗的に高めることが示唆された。

EPA は多価不飽和脂肪酸(PUFA)に属する n-3 系脂肪酸の一つである。他の PUFAs と抗癌剤を組み合わせた治療報告によれば、抗癌剤 15 種類の効果を増強したことが報告されている⁹⁾。また、細胞株においては強転移性乳癌細胞株 MDA-MB-321 に対してパクリタキセルもしくはドセタキセルと DHA(Docosahexaenoic acid)を併用すると細胞生存率に対して高い相乗効果を示したという報告がある¹⁰⁾。

実験 1 では、PUFAs の 1 つである EPA が抗癌剤の効果を増強することが食道癌細胞株とパクリタキセル・ドセタキセル・CDDP においても明らかになった。

V. 著作権について

なお、この章は Annals of Nutrition and Metabolism に論文として掲載されている。(リンク先：<https://www.karger.com/Article/Pdf/484618>)

第2節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす NF- κ B 活性化(核内移行)への影響(実験2)

I. 緒言

癌抑制遺伝子 p53 は NF- κ B 活性化(核内移行)を阻害することが報告されている¹⁾。しかし半数以上の悪性腫瘍において p53 の変異が認められており、その結果 NF- κ B 活性化(核内移行)を制御できない状態にある。これにより、癌細胞における NF- κ B の恒常的活性化が維持されることとなり、apoptosis の阻害・細胞増殖の亢進・癌転移が引き起こされる。TE-1 においては EPA が NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制することが報告されている³⁾。EPA と CDDP の併用により NF- κ B 活性化(核内移行)に対する相加的相乗的効果の有無を検証した。

II. 方法

培養細胞株と培養方法

理化学研究所(埼玉)から購入したヒト食道癌由来細胞株 TE-1 を用いた。10% FBS、100units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含む RPMI-1640 培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用い、37 度、5% CO₂ 環境下にて培養した。cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid sodium salt は MERCK(St. Louis, MO)から購入し、PBS に溶解して保存し、CDDP はシスプラチン注(Nichi-Iko Pharmaceutical, Toyama, Japan)を用いた。

免疫組織化学染色(Immunohistochemistry; IHC)

LAB-TEK 8well(Thermo Fisher Scientific, MA)に 1×10^5 cells/ml、400 μ l/well、 4×10^4 cells/well となるよう TE-1 を播種した。24 時間培養し、所定の EPA、CDDP を含む培地に交換した。培地交換後、24 時間後に PBS にて洗浄し、免疫組織化学染色にて NF- κ B p65 を染色した。一次抗体として

NF- κ B p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb(Cell Signaling Technology, MA)を用い、発色剤として Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse(Agilent, CA)を用いた³⁾。核染色にはヘマトキシリン(Muto Kagaku, Tokyo, Japan)を用いた。写真撮影には倒立型リサーチ顕微鏡 IX83(Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。

統計処理

各実験において3回行った。平均的な視野を選び、500cellsのうちNF- κ B核内移行をしている細胞数をカウントし、その平均値±標準偏差を取った。二元配置分散分析を行い、EPAの効果を確認するために同一EPA濃度において異なるCDDP濃度群に対してt検定を行った。有意水準は $p<0.05$ とした。

Ⅲ. 結果

NF- κ B 活性化(核内移行)をしている細胞の典型的な像を Figure 5A に示す。NF- κ B 活性化(核内移行)率は CDDP 単独では 0, 2, 5 μ g/ml で 8.2~9.5%であった。

EPA 単独では 0, 100, 200 μ M 添加時に 8.2, 7.5, 1.3%に抑制されており、EPA と CDDP を併用した場合、EPA の濃度依存的に増殖を抑制していた。(EPA100 μ M/ CDDP 2 μ g/ml \cdot 5.3%、EPA100 μ M/ CDDP 5 μ g/ml \cdot 3.0%)

NF- κ B 活性化(核内移行)率は、コントロールで 8.2%、EPA100 μ M 単独で 7.5%、CDDP5 μ g/ml 単独で 8.4%であったことから、EPA100 μ M を添加することにより NF- κ B 活性化(核内移行)を 0.7%減少させ、CDDP5 μ g/ml を添加することにより 0.2%上昇させていた(ただし有意差は見られなかった)。一方、EPA100 μ M/CDDP 5 μ g/ml の併用では NF- κ B 活性化(核内移行)を 3.0%に抑えており、相加効果である 0.5%を引いた 7.7%よりも 4.3%抑制していることが明らかになった。

EPA200 μ M においては、EPA 単独で NF- κ B 活性化(核内移行)を強く抑制しており、CDDP との併用効果を観察することができなかった(Figure 5B)。

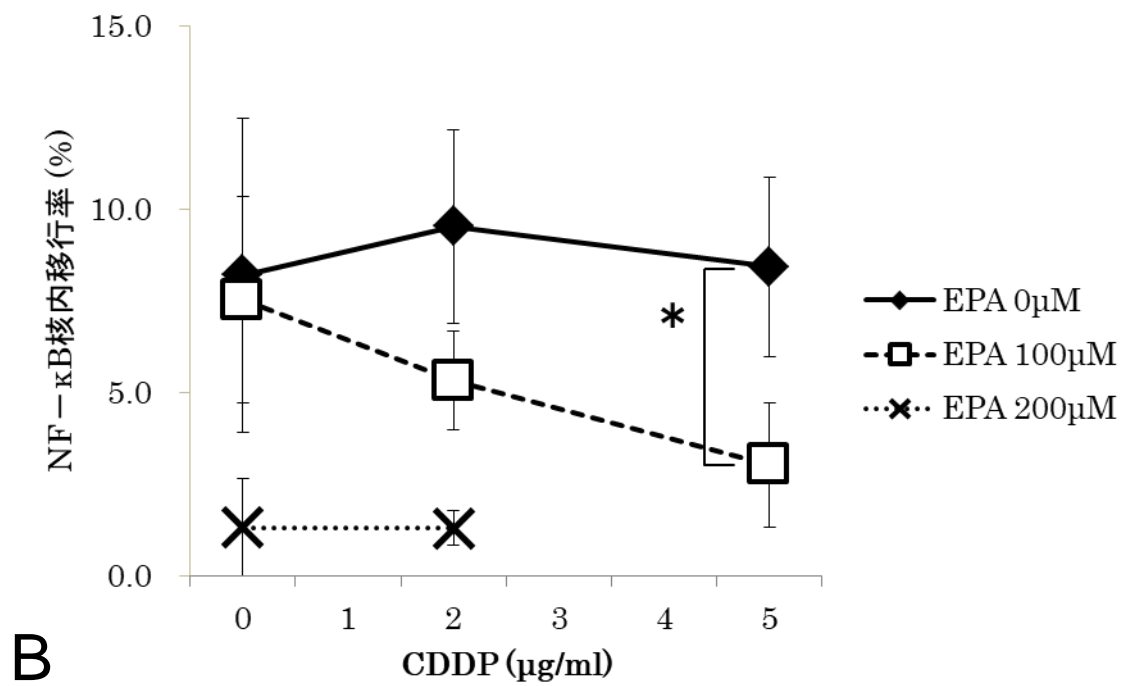
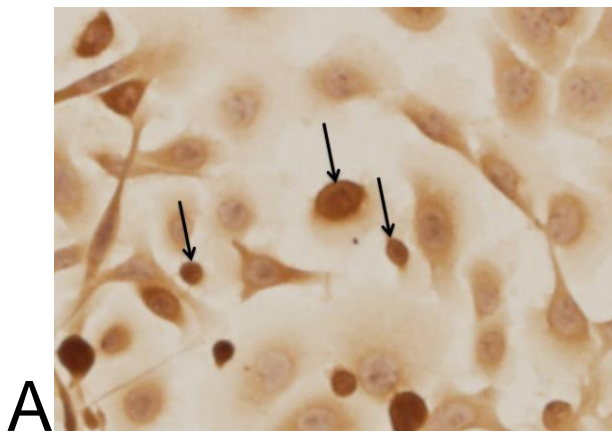


Figure 5 TE-1 の NF-κ B 活性化(核内移行)。

(A)TE-1 の NF-κ B 核内移行。黒矢印が示す細胞が細胞質に存在していた NF-κ B p65 が核内に移行している細胞である。(B)EPA・CDDP 併用時の TE-1 における NF-κ B 活性化(核内移行)率。免疫組織化学染色にて NF-κ B p65 を検出。(*: $p < 0.05$)

IV. 考察

EPA の癌細胞に対する作用の順序としては、NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制し、その結果癌細胞増殖や転移、炎症性サイトカイン産生の抑制、apoptosis の阻害などの減少がおこると考えられている。今回の実験 2 では CDDP 単独だと添加 24 時間では NF- κ B 活性化(核内移行)を引き起こさないこと、EPA を添加すると EPA100 μ M で有意に NF- κ B 活性化(核内移行)が抑制されていることが明らかになった。また、EPA 単独時、CDDP 単独時の相加効果値よりも併用により NF- κ B 活性化(核内移行)をさらに抑制していることから、EPA と CDDP の併用は相乗的に NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制することが示唆された。

EPA と同様に PUFAs である DHA においても、細胞膜に作用して抗癌剤の効果を増強することが報告されているが¹²⁾、その機構は明らかになっていない。

第3節 TE-1に対するEPAとCDDPの併用がもたらすIL-6産生能への影響(実験3)

I. 緒言

NF- κ B活性化(核内移行)は炎症性サイトカイン産生にも関与していることが報告されている¹³⁾。炎症性サイトカインの恒常的な産生は癌転移を亢進させる報告もある。食道癌¹⁴⁾、腎細胞癌^{15,16)}、卵巣癌患者¹⁷⁾では血中IL-6濃度が高い患者は低い患者よりも転移及び周囲への浸潤が強いことが報告されている。動物実験においても、乳癌細胞、肺癌細胞、肝細胞癌細胞を移植した場合、高濃度IL-6産生腫瘍細胞は低濃度IL-6産生腫瘍細胞よりも遠隔転移を多く生じたという報告もなされている^{18,19)}。

EPAはこのNF- κ B核内移行が引き起こすIL-6産生を抑制するという報告がある³⁾。

第2節でEPA・CDDPの併用によりNF- κ B核内移行が抑制されていることを検証したが、炎症性サイトカインの代表であるIL-6産生に関してEPA・CDDPの相加的、相乗的効果の有無を検証する。

II. 方法

培養細胞株と培養方法

理化学研究所(埼玉)から購入したヒト食道癌由来細胞株TE-1を用いた。10% FBS、100units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含むRPMI-1640培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用い、37度、5% CO₂環境下にて培養した。
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid sodium saltはMERCK(St. Louis, MO)から購入し、PBSに溶解して保存し、CDDPはシスプラチン注(Nichi-Iko Pharmaceutical, Toyama, Japan)を用いた。

培養上清中 IL-6 産生量測定

TE-1 を 24well plate に 1×10^5 cells/ml、 $500 \mu\text{l/well}$ 、 5×10^4 cells/well となるように播種、24 時間培養し、所定の EPA、CDDP を含む培地に交換した。24, 48, 72 時間後に培養上清を回収し、含まれている IL-6 量を IL-6 Human ELISA Kit(Thermo Fisher Scientific, MA)にて測定した。

統計処理

各実験を 3 回行い、培養上清中 IL-6 量の平均値±標準偏差を取った。二元配置分散分析を行い、添加時間、各薬剤濃度の効果を比較するために有意差のあった 2 群に対して t 検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

Ⅲ. 結果

CDDP 単独添加の場合、添加 24 時間後では IL-6 産生量に有意差は見られなかったが、48、72 時間後では 1.3~2.6 倍に増加していた。(Figure 6)。

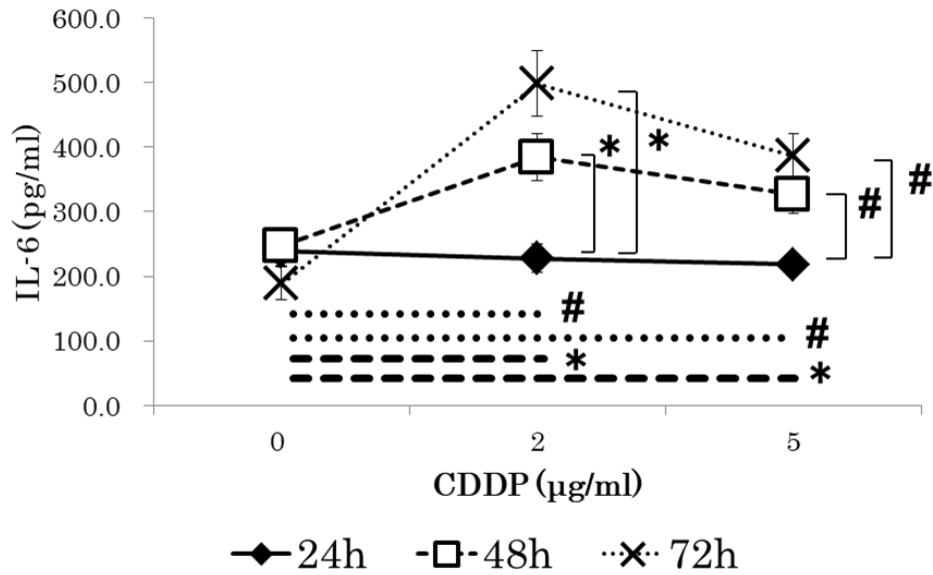


Figure 6 CDDP 単独添加時の TE-1 培養上清中 IL-6 産生量。

CDDP を添加して 24, 48, 72 時間培養後、培養上清を回収し ELISA にて IL-6 産生量を測定。(*: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$)

EPA 単独添加の場合、全ての添加時間において、培養上清 IL-6 量が 51.2～58.5%へ減少した。EPA100 μ M と EPA200 μ M 間には有意差は見られなかった(Figure 7)。

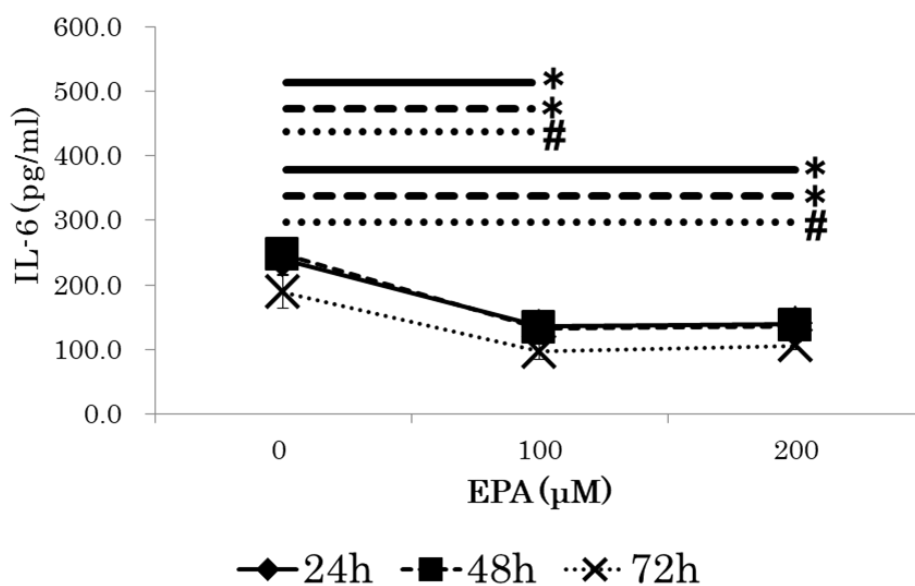
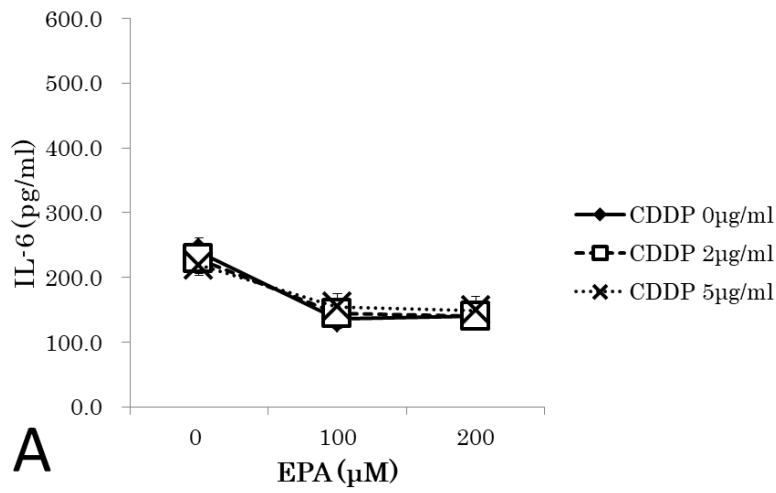
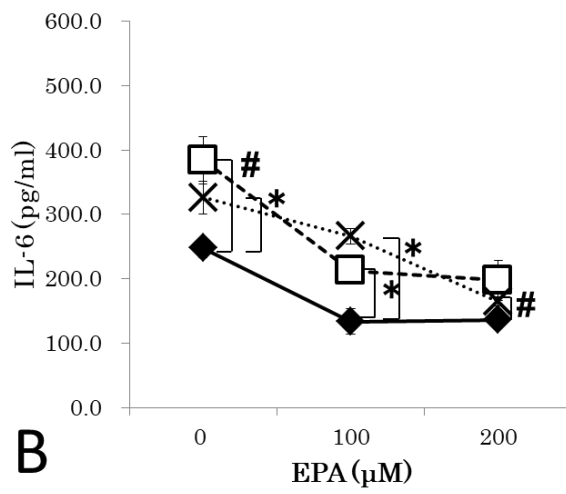


Figure 7 EPA 単独添加時の TE-1 培養上清中 IL-6 産生量。
EPA を添加して 24, 48, 72 時間培養後、培養上清を回収し ELISA にて IL-6 産生量を測定。(*: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$)

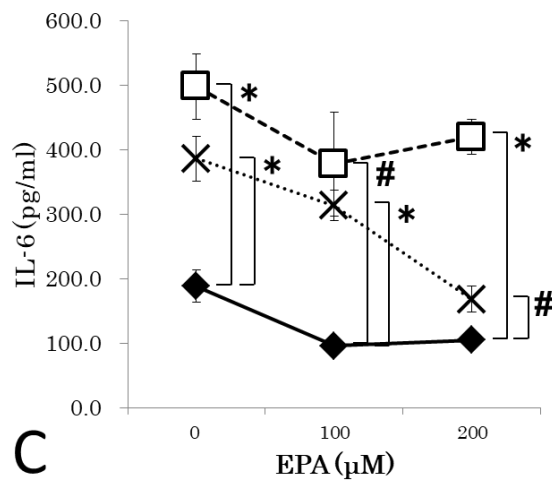
EPA と CDDP の併用の場合、添加 24 時間後では、CDDP の濃度間では有意差が見られなかった。EPA を添加することで IL-6 産生量は約 60% (56.9～64.8%) に減少していた (Figure 8A)。添加 48 時間後では、EPA を添加することで培養上清中 IL-6 量が減少し、EPA200 μ M では EPA0 μ M に比較して培養上清中 IL-6 量は約 50% (50.0～55.0%) に減少していた (Figure 8B)。添加 72 時間後では、CDDP 添加によって増加した IL-6 産生量が EPA を添加することで減少していた (CDDP5 μ g/ml) (Figure 8C)。



A



B



C

Figure 8 EPA・CDDP 併用時の TE-1 培養上清中 IL-6 産生量。

(A)24 時間後、(B)48 時間後、(C)72 時間培養後、培養上清を回収し ELISA にて IL-6 産生量を測定。(*: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$)

IV. 考察

EPA 単独添加の場合、添加時間によって IL-6 産生量に変化はなかったが、CDDP は添加 48 時間後、72 時間後で IL-6 産生量が 1.3~2.6 倍に増加していた。EPA と CDDP を併用すると、添加 48 時間後、72 時間後において EPA 濃度依存的に IL-6 産生量が EPA0 μ M 時と比較して減少していた(添加 72 時間後、CDDP 2 μ g/ml 時は除く)。実験 1 から TE-1 に CDDP を添加すると細胞増殖能は低下する。しかし、IL-6 産生量が増加するのなら患者にとっては有害事象になる可能性がある。この時 EPA を摂取しておくこと、CDDP による IL-6 産生量を抑え、CDDP の有害事象を軽減することができる可能性がある。一方、IL-6 を高濃度に発現し続ける患者は予後が悪く、CDDP 耐性を獲得することが報告されている²⁰⁾。EPA を摂取することで CDDP を投与していても IL-6 産生量を抑え、CDDP 耐性獲得を避けることができる可能性も示唆された。

第4節 TE-1に対するEPAとCDDPの併用がもたらすapoptosisへの影響(実験4)

I. 緒言

皮膚扁平上皮癌、繊維肉腫細胞、膵臓癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、肝細胞癌において、NF- κ B活性化を抑えるとapoptosisが促進することが報告されている²¹⁻²⁴)。EPAがapoptosis関連タンパクの活性化を引き起こすためと考えられる²³)。実験2において、EPAとCDDPを併用することにより、NF- κ B活性化(核内移行)が相加的、相乗的に抑制されていた。よってEPA・CDDPを併用することにより、apoptosis誘導にはどのような影響があるかを検討した。apoptosis検出には初期apoptosisに起こる細胞膜の脂質二重膜Phosphatidylserine表出を検出するAnnexinVを用いた。

II. 方法

培養細胞株と培養方法

理化学研究所(埼玉)から購入したヒト食道癌由来細胞株TE-1を用いた。10% FBS、100units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含むRPMI-1640培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用い、37度、5% CO₂環境下にて培養した。cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid sodium saltはMERCK(St. Louis, MO)から購入し、PBSに溶解して保存し、CDDPはシスプラチン注(Nichi-Iko Pharmaceutical, Toyama, Japan)を用いた。

フローサイトメトリーを用いたPhosphatidylserine表出検出によるapoptosis観察

TE-1を6well plateに 1×10^6 cells/ml、2 ml/well、 2×10^6 cells/wellにて播種、24時間培養し、所定のEPA、CDDPを含む培地に交換した。24時間後にTE-1を回収し、生死判定用試薬Zombie Green™ Fixable Viability

Kit(BioLegend, CA)、apoptosis 判定試薬 Annexin V, Alexa Fluor™ 647 conjugate(Thermo Fisher Scientific, MA)を用いて添付のプロトコールに従い染色した。FACSAriaIIIセルソーター(Becton, Dickinson and Company, NJ)にて測定した。

統計処理

各実験を3回行い、生細胞・初期 apoptosis 状態の細胞・後期 apoptosis 状態の細胞の割合についての平均値±標準偏差を取った。二元配置分散分析を行い、添加時間、各薬剤濃度の効果を比較するために有意差のあった2群に対してt検定を行った。有意水準は $p<0.05$ とした。

Ⅲ. 結果

apoptosis 率は、EPA 0 μ M/CDDP 0 μ g/ml : 6.7%(Figure 9A)、EPA 100 μ M/CDDP 0 μ g/ml : 10.1%(Figure 9B)、EPA 150 μ M/CDDP 0 μ g/ml : 11.1%(Figure 9C)、EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml : 12.3%(Figure 9D)、EPA 100 μ M/CDDP 2 μ g/ml : 19.9%(Figure 9E)、EPA 150 μ M/CDDP 2 μ g/ml : 22.8%(Figure 9F)であった。

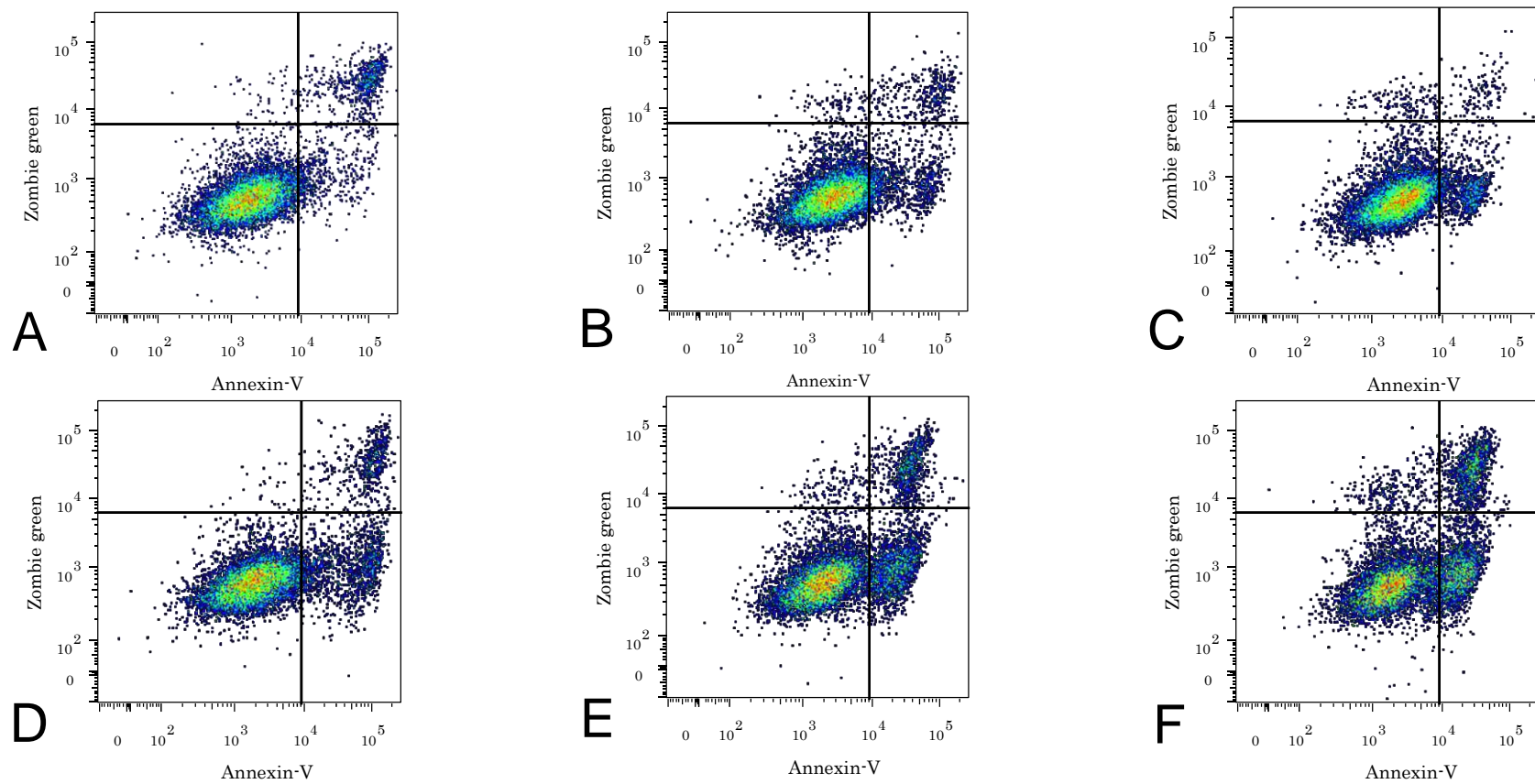


Figure 9 EPA・CDDP 併用時の TE-1 における apoptosis dot plot。

(A)EPA 0 μ M/CDDP 0 μ g/ml、(B)EPA 100 μ M/CDDP 0 μ g/ml、(C)EPA 150 μ M/CDDP 0 μ g/ml、
(D)EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml、(E)EPA 100 μ M/CDDP 2 μ g/ml、(F)EPA 150 μ M/CDDP 2 μ g/ml。

このうち、有意差が見られたのは EPA 0 μ M/CDDP 0 μ g/ml と EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml、EPA 100 μ M/CDDP 0 μ g/ml と EPA 100 μ M/CDDP 2 μ g/ml、EPA 150 μ M/CDDP 0 μ g/ml と EPA 150 μ M/CDDP 2 μ g/ml であり、いずれの場合も CDDP を添加すると有意に apoptosis 率が上昇した。また、EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml と EPA 100 μ M/CDDP 2 μ g/ml、EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml と EPA 150 μ M/CDDP 2 μ g/ml の場合も EPA を添加すると有意に apoptosis 率が上昇することが確認された。EPA 単独添加の場合は、EPA 濃度依存的に apoptosis 率は上昇傾向にあるものの有意差は見られなかった (Figure 10)。

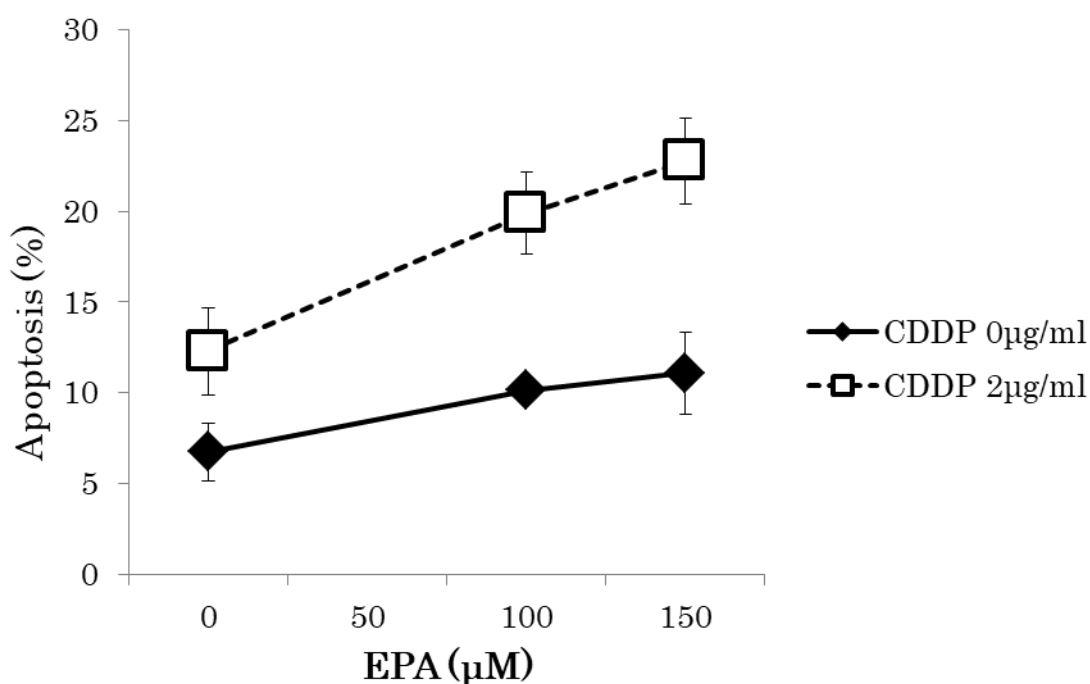


Figure 10 EPA・CDDP 併用時の TE-1 における apoptosis 誘導率。

IV. 考察

EPA 単独では apoptosis 率を $100 \mu\text{M}$ で 3.4%、 $150 \mu\text{M}$ で 4.4% 上昇させた。しかし有意差は見られなかった。CDDP 単独では $2 \mu\text{g/ml}$ で apoptosis 率を 5.6% 上昇させ有意差が見られた。以上を踏まえ、併用効果の apoptosis 率を考察すると、EPA が $100 \mu\text{M}$ のとき相加効果なら計算上 9.0% の apoptosis 率となるが実際は 9.8% であった。 $150 \mu\text{M}$ のとき相加効果なら計算上 10.0% の apoptosis 率となるが実際は 11.7% であった。 $100 \mu\text{M}$ のとき相乗効果と考えられる apoptosis 率の上昇は 8.0%、 $150 \mu\text{M}$ のときは 17% となった。よって、TE-1 の apoptosis 率に対しては EPA と CDDP を併用した場合に 8~17% の相乗効果が見られると考えた。

肺癌細胞株 A549 において、EPA もしくは DHA と CDDP を併用した場合、EPA もしくは DHA が autophagy または apoptosis を引き起こすことにより CDDP の細胞増殖抑制作用を強めたとの報告がある²⁵⁾。EPA もしくは DHA を A549 に作用させることにより、A549 の CDDP 感受性が高まる。それは、細胞質内のプラチナ濃度が上昇するからであるという報告がある。CDDP 耐性を持った細胞は EPA もしくは DHA に対しても感受性が低く、CDDP を添加しても相乗効果は見られない。

本実験においても、この機序が働いている可能性があると考えた。

第5節 TE-1 に対する EPA と CDDP の併用がもたらす細胞周期への影響(実験5)

I. 緒言

胃癌細胞、Hela 細胞、多発性骨髄腫細胞において、NF- κ B 活性化(核内移行)を阻害すると細胞周期が停止し細胞増殖ができなくなることが示唆されている^{21,22,24})。そもそも CDDP は細胞の DNA に結合して DNA 合成を阻害し、細胞分裂を停止させる働きがある。EPA と併用することにより、TE-1 において細胞周期へのどのような影響があるかを検討した。

II. 方法

培養細胞株と培養方法

理化学研究所(埼玉)から購入したヒト食道癌由来細胞株 TE-1 を用いた。10% FBS、100units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を含む RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用い、37 度、5% CO₂ 環境下にて培養した。

cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid sodium salt は MERCK(St. Louis, MO)から購入し、PBS に溶解して保存し、CDDP はシスプラチン注(Nichi-Iko Pharmaceutical, Toyama, Japan)を用いた。

フローサイトメトリーを用いた細胞周期観察

TE-1 を 6well plate に 1×10^6 cells/ml、2 ml/well、 2×10^6 cells/well にて播種、24 時間培養し、所定の EPA、CDDP を含む培地に交換した。24 時間後に TE-1 を回収し、細胞周期試薬 Vybrant® DyeCycle™ Violet Stain(Thermo Fisher Scientific, MA)を用いて添付のプロトコールに従い染色した。FACSAriaIIIセルソーター(Becton, Dickinson and Company, NJ)にて測定した。

統計処理

各実験を 3 回行い、G0/G1 期・S 期・G2/M 期の各細胞の割合についての平均値±標準偏差を取った。二元配置分散分析を行い、添加時間、各薬剤濃度の効果を比較するために有意差のあった 2 群に対して t 検定を行った。有意水準は $p<0.05$ とした。

Ⅲ. 結果

EPA 単独添加の場合、EPA0 μ M では G0/G1 期が 28.9%、G2/M 期が 55.8%、S 期が 14.9% であり、EPA150 μ M では G0/G1 期が 44.1% となり 15.2% の増加、G2/M 期が 43.1% となり 12.7% の減少、S 期が 10.7% となり 4.2% の減少となったが、いずれも有意差はみられなかった (Figure 11A)。EPA と CDDP 併用の場合、EPA0 μ M では G0/G1 期が 26.4%、G2/M 期が 61.4%、S 期が 11.1% であった。EPA150 μ M では G0/G1 期が 36.2% となり 10.2% の増加、G2/M 期が 48.3% となり 13.1% の減少、S 期が 12.8% となり 1.7% の増加となったが、いずれも有意差はみられなかった (Figure 11B)。EPA と CDDP を併用した場合の G0/G1 期に存在する細胞割合を比較すると、CDDP0 μ g/ml と CDDP2 μ g/ml 間では有意な差は見られなかった (Figure 11C)。EPA と CDDP を併用した場合の G2/M 期に存在する細胞割合を比較すると、CDDP0 μ g/ml と CDDP2 μ g/ml 間では有意な差は見られなかった (Figure 11D)。EPA と CDDP を併用した場合の S 期に存在する細胞割合を比較すると、EPA100 μ M 存在下で CDDP0 μ g/ml は 77.4% まで減少し、一方 CDDP2 μ g/ml では 117% まで増加し、有意差が見られた (Figure 11E)。

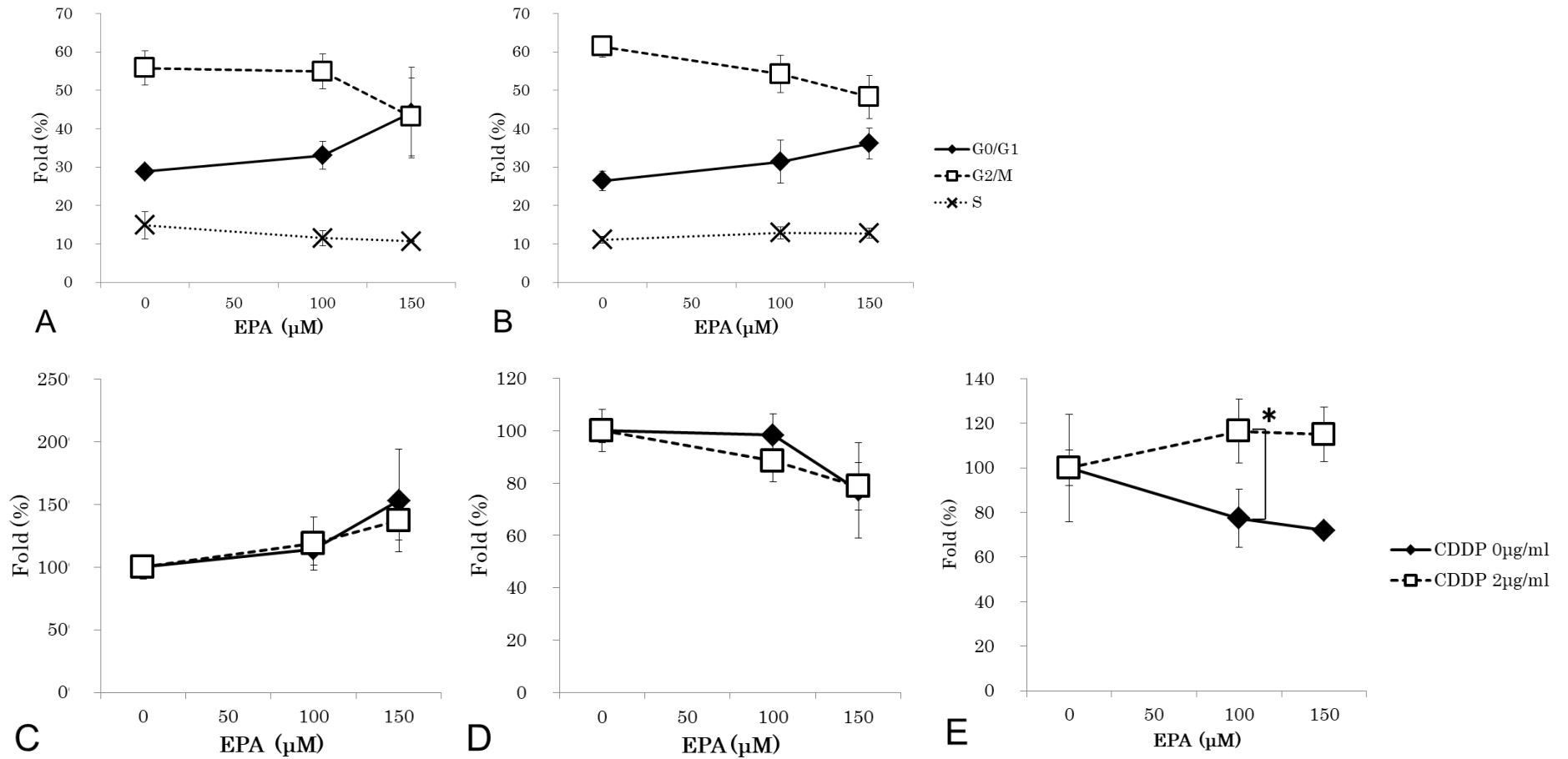


Figure 11 EPA・CDDP 併用時の TE-1 における各細胞周期に存在する細胞割合。

(A)CDDP 0 $\mu\text{g/ml}$ 、(B) CDDP 2 $\mu\text{g/ml}$ 。また(C) G0/G1 期、(D) G2/M 期、(E) S 期に存在する細胞割合。(* : $p < 0.05$)

細胞周期を示すヒストグラム(Figure 12A-F)からは、EPA 濃度が $150 \mu\text{M}$ となると G2/M 期に存在する細胞が減少することが観察できた(Figure 12C)。

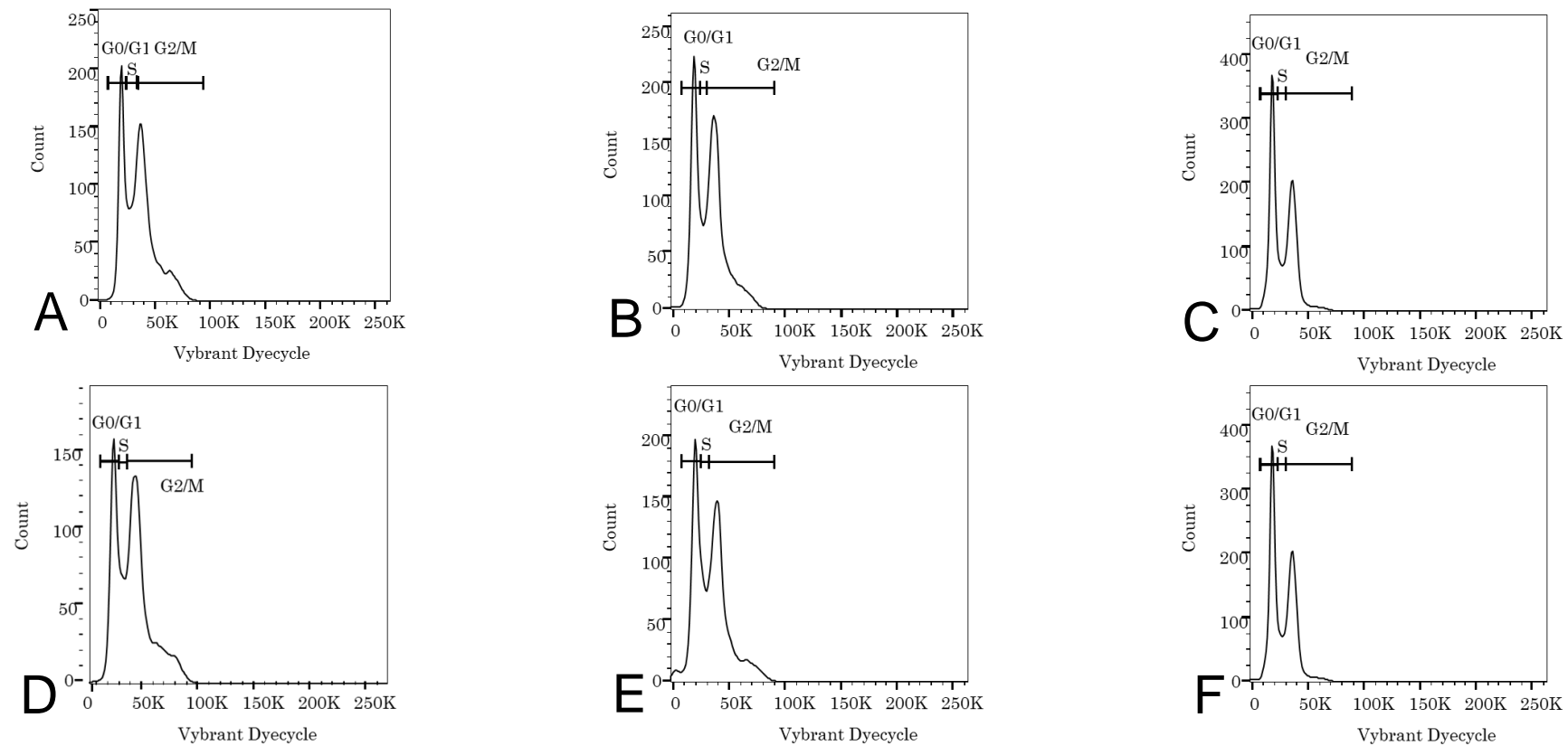


Figure 12 EPA・CDDP併用時のTE-1における細胞周期を示したヒストグラム。

(A) EPA 0 μ M/CDDP 0 μ g/ml、(B) EPA 100 μ M/CDDP 0 μ g/ml、(C) EPA 150 μ M/CDDP 0 μ g/ml、

(D) EPA 0 μ M/CDDP 2 μ g/ml、(E) EPA 100 μ M/CDDP 2 μ g/ml、(F) EPA 150 μ M/CDDP 2 μ g/ml。

IV. 考察

EPA 単独添加の場合、EPA0 μ M に比較して 150 μ M では、G0/G1 期の細胞は 28.9% から 44.2% へ 15.3% の増加を、G2/M 期の細胞は 55.8% から 43.1 へ 12.7% の減少を、S 期の細胞は 14.9% から 10.71% へ 4.2% の減少が見られたが、有意差は見られなかった。EPA は G0/G1 期で TE-1 の細胞周期を停止させ、S 期及び G2/M 期の細胞を減少させる傾向はあると思われた。

一方、CDDP 単独添加の場合、CDDP0 μ g/ml に比較して 2 μ g/ml では、G0/G1 期の細胞は 28.9% から 26.4% へ、2.5% の増加を、G2/M 期の細胞は 55.8% から 61.4% へ、5.6% の増加を、S 期の細胞は 14.9% から 11.1% へ、3.8% の減少が見られた。有意差がなく、増減率も低いことから意味のある差ではないと思われた。

EPA と CDDP の併用では、EPA0 μ M に比較して 150 μ M では、G0/G1 期の細胞は 26.4% から 36.2% へ 9.8% の増加を、G2/M 期の細胞は 61.4% から 48.3 へ 13.1% の減少を、S 期の細胞は 11.1% から 12.8% へ 1.7% の減少が見られた。しかし EPA と CDDP の併用による細胞周期への効果は相加効果以下と思われた。

一方で胃癌細胞株 AGS に対して EPA と同じ PUFAs である DHA と抗癌剤 5-FU を併用した場合、S 期から G0/G1 期に移行できる細胞の割合が相乗的に減少することが報告されている²⁶⁾。本研究の結果とは阻害する細胞周期が異なることや、TE-1 は 5-FU によって細胞増殖があまり抑制されないことなど作用機序が異なる可能性がある。また、本実験では EPA と CDDP の添加時間は 24 時間のみを検討であったが、この報告では 24、48 時間で行われていた。TE-1 の分裂速度を考慮すれば 48 時間、72 時間を検討する必要があると思われた。

第3章 総合討論

第1節 総合討論

食道癌治療においては、手術療法、放射線化学療法などの改良がなされてきたにもかかわらず、患者の予後はあまり芳しくない現実がある²⁷⁾。また、高齢化が進む中、食道癌は60歳以上で発症することが多く、食道癌患者のうち69.8%が60歳以上である²⁸⁾。しかし65歳以上の人口は2017年には27.7%であり、2040年には35.3%になると予想されている²⁹⁾。近い将来に高齢患者が多くを占めるようになることが予想されるが、高齢患者は高血圧・肥満・脂質異常症といった生活習慣病に罹患していることも多く、外科的治療にリスクを伴うことも多い。この場合、放射線化学療法が選択されることになるが、それによる有害事象が少なくないことは周知の事実である。

EPAはPUFAsの仲間であるn-3系多価不飽和脂肪酸の一つで、様々な生物活性を最低限の有害事象で発揮することができる脂肪酸である。これまでに我々はTE-1においてEPAがNF- κ B活性化(核内移行)を抑制し、apoptosisを誘導することを報告した³⁾。その機序としては胃癌細胞、結腸癌細胞に対して、カスパーゼ-3,-7,-9やポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの活性化がapoptosisを引き起こすこと³⁰⁾、アンドロスタンレセプターやプレグナンXレセプターなどの核レセプターの増加によりapoptosisを誘導すること³¹⁾などの報告がある。

PUFAsと抗癌剤を組み合わせた治療に関しても、抗癌剤15種類の効果を増強することが報告されている。また癌種についても、乳癌・前立腺癌・大腸癌、肺癌、子宮頸癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、白血病、リンパ腫などが報告されている⁹⁾。このうち強転移性乳癌細胞株MDA-MB-231にパクリタキセルもしくはドセタキセルとPUFAsの一つであるDHAを併用すると細胞生存率に対して高い相乗効果を示したとの報告がある¹⁰⁾。

しかしながら食道癌・胃癌に対してはPUFAsと抗癌剤の併用効果についての報告は見られない。そこで、今回この研究では食道癌細胞株TE-1に対して4つの抗癌剤(パクリタキセル、ドセタキセル、5-FU、CDDP)とEPAの併用効果について検討した。EPAの濃度は以前我々が報告したIC₅₀=260 μ Mを元に

決定した³⁾。EPA200 μ M 以下ならば、EPA 単独では TE-1 の増殖能に影響を与えず、相乗効果が観察しやすくなるのでこの濃度を用いた。

細胞の呼吸に関する酵素によって発色する WST-1 を用いて、各種抗癌剤と EPA が細胞増殖率にどのような効果を与えるのかを検討した。その結果、5-FU 以外は EPA と抗癌剤の濃度依存的に細胞増殖率は抑制されていた。また、EPA と抗癌剤を併用することで抗腫瘍効果を相乗的に増強させられることが明らかになった。5-FU のみ相乗効果が見られなかったが、その理由は明らかではない。

EPA と各種抗癌剤を併用すると、細胞増殖率が相乗的に抑制されることが判明し、その機序を明らかにするために注目したのが NF- κ B である。NF- κ B は不活性化した状態で細胞質内に存在しているが、TNF- α などの細胞毒性物質などの刺激を受けた際には、活性化し核内に移行する。そして転写因子として働き、細胞増殖活性化、apoptosis 抑制、転移促進、炎症性サイトカイン産生促進などの働きを誘導する。私たちは EPA が TE-1 の NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制することを報告している³⁾。また、CDDP も NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制することが報告されている³²⁾。EPA と食道癌の標準治療でも用いられている CDDP を併用することで、癌の細胞増殖に深くかかわっている NF- κ B 活性化(核内移行)が相加、相乗的に抑制できるかを検討した。CDDP 単独では NF- κ B 活性化(核内移行)を抑制できていない CDDP 濃度を用いたが、EPA と併用することで CDDP 濃度依存的に NF- κ B 活性化(核内移行)を相乗的に抑制していた。

EPA と CDDP を併用すると NF- κ B 活性化(核内移行)を相乗的に抑制していることが明らかになったので、さらに TE-1 に対する抗炎症作用があるかどうかを検証した。腫瘍のサイトカイン産生は、腫瘍の増殖・転移を促進することが知られておりその抑制の意義は大きい。炎症性サイトカインの代表格である IL-6 について、培養上清に放出された IL-6 を測定した。EPA 単独添加では IL-6 産生量を抑制した。一方 CDDP 単独添加では添加 24 時間後では IL-6 産生量に変化はなかったが、添加 48 時間後、72 時間後ではむしろ IL-6 産生量の増加が見られた。EPA と CDDP を併用した場合、CDDP によって増加した IL-6

産生量は EPA の濃度依存的に抑制されていた。IL-6 を高濃度にて発現し続ける患者は予後が悪く、CDDP 耐性を獲得することが報告されている³¹⁾。EPA を摂取することで CDDP を投与していても IL-6 産生量を抑え、CDDP 耐性獲得を避けることができる可能性が示唆された。

NF- κ B 活性化(核内移行)は apoptosis にも関連している。我々は以前 TE-1 において EPA が apoptosis を促進することを報告した³⁾。EPA と CDDP を併用すると NF- κ B 活性化(核内移行)を相乗的に抑制したことから、apoptosis が相加相乗的に抑制されるのかを検証した。結果は 8~17%までの相乗効果が認められた。

細胞増殖、apoptosis と深い関わりがあるのが細胞周期である。NF- κ B 活性化(核内移行)を阻害することで細胞周期が停止するという報告がある³³⁻³⁵⁾。また、CDDP は細胞の DNA に結合して DNA 合成を停止させるので細胞周期を停止させる抗癌剤である。EPA と CDDP の併用により、TE-1 の細胞周期にどのような影響があるのか検証した。EPA 単独添加の場合、EPA が G0/G1 期で TE-1 の細胞周期を停止させたことにより G0/G1 期の細胞割合が増加し、S 期及び G2/M 期の細胞が減少した。CDDP 単独添加の場合、細胞周期ごとの割合の変動も少なく、また有意差もなかったことから TE-1 においては本実験濃度の CDDP は大幅な細胞周期への影響はないと思われた。EPA と CDDP の併用において、G0/G1 期の細胞割合が増加し、G2/M 期・S 期の細胞割合が減少したという傾向は EPA 単独添加時と同様であったが、EPA と CDDP の併用効果は見られなかった。

EPA と CDDP の併用効果について、相乗効果が見られたのは、1)細胞増殖抑制作用、2)NF- κ B 活性化(核内移行)抑制作用、3)炎症性サイトカイン IL-6 産生抑制作用、4)apoptosis 促進作用の 4 項目であった。

第2節 今後の展望

細胞増殖抑制作用、NF- κ B 活性化(核内移行)抑制作用、炎症性サイトカイン IL-6 産生抑制作用、apoptosis 促進作用について、EPA と CDDP を併用することによる相乗効果があることが明らかになったが、その詳細な機序はまだ不明である。例えば同じ PUFAs である DHA と抗癌剤の相乗効果については、ミトコンドリア電子伝達系関連複合体の発現を下方制御する³³⁾、シクロオキシゲナーゼ-2、NF- κ B、ペルオキシソーム増殖活性化受容体 γ (PPAR γ)、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) が重要な役割を果たしている³⁴⁾、などの報告がある。今後は EPA と CDDP の相乗効果の詳細な機序の解明と同時に、*in vivo* および食道癌患者における EPA と CDDP の相乗効果を検討する必要がある。

第4章 結語

食道癌細胞 TE-1 において、EPA と CDDP を併用すると細胞増殖抑制作用・NF- κ B 活性化(核内移行)抑制作用・炎症性サイトカイン IL-6 産生抑制作用・apoptosis 促進作用において相乗効果を示した。細胞周期への影響については相加相乗効果を示さなかった。

この結果により、EPA と CDDP を併用することが臨床的にも有害事象を最低限に抑えつつ CDDP の効果をより増強し、食道癌患者の予後向上に寄与する可能性が示された。

謝辞

本論文は筆者が川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科健康科学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻特任教授 平井敏弘 先生には指導教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。同専攻教授 矢野博己先生、寺本房子先生には副指導教員としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。川崎医科大学消化器

外科学教授 上野富雄先生、藤原由規先生にはご理解とご協力を頂き、講師 窪田寿子先生には本研究に対して臨床的立場から有益なご助言を戴いた。ここに深謝の意を表す。川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科助手 三宅沙知先生には本研究に対して臨床栄養学の立場から有益なご助言を戴き、また同じ博士後期課程の大学院生として互いに切磋琢磨できる関係であったこと、ここに深謝の意を表す。また筆者の夫には、大学院進学を応援してくれたこと、最終学年時 6 歳と 2 歳の息子の世話を引き受けてくれたこと等、感謝してもしきれない。最終学年であった 2018 年、平成 30 年 7 月豪雨に見舞われ家屋等の被災は幸いにも免れたが生活の大幅な変更を強いられた。しかし学位論文提出にこぎつけたのは指導教官をはじめとした皆様のお陰であることを痛感している。ここに深謝の意を表す。

利益相反の開示

本研究に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

参考・引用文献

参考文献

- 1) 公益財団法人 癌研究振興財団: がんの統計'13
- 2) Hirai T, Matsumoto H, Kubota H, et,al : Regulating surgical oncotaxis to improve the outcomes in cancer patients. *Surg Today*. 44(5):804-11, 2014.
- 3) Kubota H, Matsumoto H, Higashida M, et,al. : Eicosapentaenoic acid modifies cytokine activity and inhibits cell proliferation in an oesophageal cancer cell line. *Anticancer Res*. 33(10):4319-24, 2013.
- 4) Jho DH, Cole SM, Lee EM, et,al : Role of omega-3 fatty acid supplementation in inflammation and malignancy. *Integr Cancer Ther*. 3(2):98-111, 2004.
- 5) Sato M, Ando N : Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery as standard treatment for stage II + III thoracic esophageal squamous cell carcinoma in Japan. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 112(2):104-10, 2011.
- 6) 菊地金男, 菅野久義:5-FU の剤型別にみた血中濃度ならびに 5-FU 錠剤の臨床的検討. *癌と化学療法*. 6(3): 559 -565, 1979.
- 7) 小池明彦, 松本幸三, 鈴木和義, 他:組織学的 Stage IV 胃癌の絶対非治癒切除例に対する 5-Fluorouracil 48 時間持続静注療法の効果. *癌と化学療法*. 17(7): 1309-14, 1990.
- 8) 堀内正敏, 三宅浩郷, 犬山征夫:シスプラチンの体内動態. *耳鼻と咽喉*. 30(2):208-10, 1984.
- 9) Hajjaji N, Bougnoux P : Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: a review. *Cancer Treat Rev*. 39(1):473-88, 2013.
- 10) Menendez JA, Lupu R, Colomer R et,al.: Exogenous supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu

(c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev.* 14(3): 263-70, 2005.

11) 田中信之 : p53 による代謝の調節と癌抑制機構. *生化学.* 6(81):486-93, 2009.

12) Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, et,al.: Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors.* 37(6):399-412, 2011.

Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD.

13) Aggarwal BB, Sung B. : NF- κ B in cancer: a matter of life and death. *Cancer Discov.* 1(6):469-71, 2011.

14) Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, et,al. : Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters, and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 56(12): 2776–80, 1996.

15) Blay JY, Negrier S, Combaret V, et,al. : Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 52(12): 3317–22, 1992.

16) Dosquet C, Schaetz A, Faucher C, et,al. : Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 30A(2): 162–7, 1994.

17) Berek JS, Chung C, Kaldi K, et,al. : Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 164(4): 1038–43, 1991.

18) Takeda K, Fujii N, Nitta Y, et,al. : Murine tumor cells metastasizing selectively in the liver: Ability to produce hepatocyte-activating cytokines interleukin-1 and/or -6. *Jpn J Cancer Res.* 82(11): 1299–308, 1991.

19) Reichner JS, Mulligan JA, Palla ME, et,al. : Interleukin-6 production by rat hepatocellular carcinoma cells is associated with metastatic potential but not with tumorigenicity. *Arch Surg.* 131(4): 360–5, 1996.

- 20) Gao J, Zhao S, Halstensen TS : Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 35(6):3265-74, 2016.
- 21) van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, et,al.: Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 59(14):3299-303, 1999.
- 22) Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, et,al.: Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med.* 5(4):412-7, 1999.
- 23) 溝口公士, 竹山廣光 : がんと EPA. 日本静脈経腸栄養学会雑誌. 4(30):941-6, 2015.
- 24) Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et,al.: To be, or not to be: NF-kappaB is the answer role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 22(56):8961-82, 2003.
- 25) Zajdel A, Wilczok A, Latocha M, et,al.: Polyunsaturated fatty acids potentiate cytotoxicity of cisplatin in A549 cells. *Acta Pol Pharm.* 71(6):1060-5, 2014.
- 26) Gao K, Liang Q, Zhao ZH, et,al.: Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells. *World J Gastroenterol.* 14;22(10):2971-80, 2016.
- 27) Takeuchi H, Kitagawa Y. : Management of esophageal cancer: state of the art. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* 106(6):753-63, 2009.
- 28) Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, et,al.: Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2008: A Study of 25 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol.* 44(4):388-96, 2014.

- 29) Japan Ministry of Internal Affairs and Communications Statistics Bureau. Statistics Topics 2018.
<https://www.stat.go.jp/data/topics/topi1031.html> [accessed 2019.2.4]
- 30) Mizoguchi K, Ishiguro H, Kimura M, et,al.: Induction of apoptosis by eicosapentaenoic acid in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 34(12):7145-9, 2014.
- 31) Kuan CY, Walker TH, Luo PG, et,al: Long-chain polyunsaturated fatty acids promote paclitaxel cytotoxicity via inhibition of the MDR1 gene in the human colon cancer Caco-2 cell line. *J Am Coll Nutr.* 30(4):265-73, 2011.
- 32) Fang Y, Chai Z, Wang D, et,al.: DNA-PKcs deficiency sensitizes the human hepatoma HepG2 cells to cisplatin and 5-fluorouracil through suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Mol Cell Biochem.* 399(1-2):269-78, 2015.
- 33) Jin R, Chen Q, Yao S, et,al.: Synthesis and anti-tumor activity of EF24 analogues as IKK β inhibitors. *Eur J Med Chem.* 144:218-28, 2017.
- 34) Chen HH, Chen SP, Zheng QL, et,al.: Genistein promotes proliferation of human cervical cancer cells through estrogen receptor-mediated PI3K/Akt-NF- κ B pathway. *J Cancer.* 9(2):288-95, 2018.
- 35) Allegra A, Speciale A, Molonia MS, et,al.: Curcumin ameliorates the in vitro efficacy of carfilzomib in human multiple myeloma U266 cells targeting p53 and NF- κ B pathways. *Toxicol In Vitro.* 47:186-194, 2017.
- 36) Gao K, Kiang Q, Zhao ZH, et,al.: Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGE cells. *World J Gastroenterol.* 14(10):2971-80, 2016.
- 37) Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, et,al.: Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors.*37(6):399-412, 2011.

投稿論文

Ogo A, Miyake S, Kubota H, Higashida M, Matsumoto H, Teramoto F, Hirai T: Synergistic effect of eicosapentaenoic acid on antiproliferative action of anticancer drugs in a cancer cell line model. *Ann Nutr Metab.* 71(3-4):247-52, 2017.

学会発表

1) 「エイコサペンタエン酸・シスプラチンの TE-1 における NF- κ B 核内移行の併用効果」

小郷絢子(発表者)、窪田寿子、河合昭昌、上野太輔、遠迫孝昭、東田正陽、岡保夫、松本英男、平井敏弘

第 31 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、福岡県、2016 年 2 月 25 日

2) 「食道癌細胞 TE-1 における EPA・CDDP の併用効果」

小郷絢子(発表者)、窪田寿子、松本英男、平井敏弘

第 32 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、岡山県、2017 年 2 月 24 日

3) 「食道癌細胞 TE-1 における EPA・CDDP の転写因子 NF- κ B 核内移行における併用効果」

小郷絢子(発表者)、窪田寿子、松本英男、寺本房子、平井敏弘

第 33 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、神奈川県、2018 年 2 月 22 日

4) 「食道癌細胞 TE-1 における EPA・CDDP のアポトーシス誘導における併用効果」

小郷絢子(発表者)、窪田寿子、松本英男、寺本房子、平井敏弘

第 34 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、東京都、2019 年 2 月 14 日