

学位論文

2種類のヒト大腸がん細胞株に対する
イリノテカンと 5-アザ-2'-デオキシシチジン
併用における感受性増強の分子メカニズム

岩手医科大学薬学研究科

博多修子

2018

目 次

略語表	1
第 1 章 序論	3
第 2 章 <i>in vitro</i> における DAC と CPT-11 または SN-38 併用での殺細胞効果の変動評価 (コロニー形成試験)	
1. 緒言	8
2. 材料および実験方法	8
3. 結果	11
4. 考察	13
第 3 章 Combination Index を用いた DAC と CPT-11 併用および DAC と SN-38 併用による殺細胞効果の評価	
1. 緒言	15
2. 材料および実験方法	15
3. 結果	19
4. 考察	21
第 4 章 DAC 併用による CPT-11 および SN-38 の殺細胞効果増強に関与するタンパク質, Bcl-2 family および転写調節因子 WT1 の解析	
1. 緒言	23
2. 材料および実験方法	24
3. 結果	26
4. 考察	33
第 5 章 総合考察および結論	35
謝辞	37
引用文献	38

略語表

略語	英語表記	日本語表記
5-FU	5-fluorouracil	5-フルオロウラシル
5mC	5-methylcytosine	5-メチルシトシン
AA	amino acid	アミノ酸
AC	azacytidine	アザシチジン
ACTB	beta-actin	ベータアクチン
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ATCC	American type culture collection	アメリカンタイプカルチャー コレクション
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B細胞リンパ腫2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large	Bcl-xL
BAX	Bcl-associated X	BAX
BAK 1	Bcl-2 homologous antagonist/killer 1	BAK 1
CPT	camptothecine	カンプトテシン
CES	carboxylesterase	カルボキシルエステラーゼ
CI	combination index	併用係数
CPT-11	irinotecan, camptothecin 11	イリノテカン
DAC	5-aza-2'-deoxycytidine	デシタビン
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNMT	DNA methyltransferase	DNAメチル基転移酵素
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清

FDA	Food and Drug Administration	アメリカ食品医薬品局
HDAC	histone deacetylase	ヒストン脱アセチル化酵素
IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関
K	lysine	リシン (リジン)
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都遺伝子ゲノム百科事典
MQW	milli Q water	超純水
L-OHP	oxaliplatin	オキサリプラチン
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
RNAi	RNA interference	RNA (リボ核酸) 干渉
S	serine	セリン
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid	スベロイルアニリドヒドロキ サム酸, ボリノスタット
SD	standard deviation	標準偏差
shRNA	short hairpin RNA	短ヘアピン RNA
siRNA	small interfering RNA	干渉 RNA
SN-38	7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin	SN-38
T	threonine	スレオニン (トレオニン)
TBS-T	tris buffered saline with Tween 20	Tween-20 を含むトリス緩衝生 理食塩水
TSA	trichostatin A	トリコスタチン A
VPA	valproic acid	バルプロ酸
WHO	World Health Organization	世界保健機関
WT1	Wilms' tumor gene 1	ウィルムス腫瘍遺伝子
Zeb	zebularine	ゼブラリン

第1章 序論

国際がん研究機関 (IARC) は、2014 年、世界における推定大腸がん患者数について男女の合計が約 136 万人であると報告している¹⁾。また、WHO も、がんは死因の主たる要因のひとつであり、2015 年における世界のがんによる死亡者数は約 880 万人であったことを報告している。そのうち、約 77 万人の死亡が大腸がん起因していた²⁾。手術不能または再発性の大腸がん治療において化学療法は重要な治療戦略であり、I 型トポイソメラーゼ阻害剤であるイリノテカン (CPT-11) は標準治療薬の一端を担う抗悪性腫瘍薬である。CPT-11 はそれ自体にも殺細胞効果が認められるが、生体内で肝臓のカルボキシルエステラーゼ (CES) によって加水分解を受けて活性代謝物である SN-38 へと変換される^{3,4)}。通常、I 型トポイソメラーゼは DNA に結合した後、二本鎖 DNA の一方の鎖の切断および再結合を介して DNA のひずみを解消する。しかし、SN-38 存在下では、単鎖 DNA を切断した後、安定な I 型トポイソメラーゼ - DNA - SN-38 複合体を形成して DNA の再結合を阻害する⁵⁻⁸⁾。その結果、細胞周期の S 期特異的な DNA 合成が阻害されることで DNA はダメージを受け、細胞周期の停止やアポトーシスによる細胞死が誘導されると考えられている^{9,10)}。しかし、がん細胞が SN-38 に対してもともと低感受性である場合や、薬剤耐性の獲得によってもたらされる悪性腫瘍の進展が臨床上での問題点となっている。

がんの発生や進展、ならびに薬剤耐性の獲得には、DNA の異常な高メチル化 (DNA hypermethylation) が原因のひとつとして挙げられる¹¹⁾。この DNA メチル化は、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) がゲノム DNA 上のシトシン塩基にメチル基を供与することに起因し (図 1)、メチル化を受けた状態の遺伝子は mRNA への転写が起り難くなる。

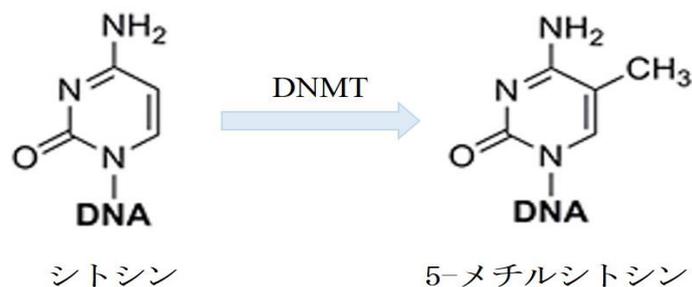


図 1. シトシン塩基に対する DNMT の作用と 5-メチルシトシン (5mC) の生成経路.

がん細胞においても DNA のメチル化は、塩基配列に依存せずに遺伝子の発現を調節するエピジェネティックな変化をもたらしており、特に、がん抑制遺伝子の転写抑制は広く知られている^{12,13}。近年、本邦においてもエピジェネティクス修飾薬が血液系のがんに対して臨床応用され始めている。DNMT 阻害剤であるアザシチジン（ビダーザ®）が骨髄異形成症候群に、HDAC 阻害剤であるボリノスタット（ゾリンザ®）とロミデプシン（イストダックス®）が、皮膚 T 細胞性リンパ腫と再発または難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫に各々、適応を有している。また、アザシチジンの類縁物質であるデシタビン (5-aza-2'-deoxycytidine, DAC) は、DNA メチル化阻害剤および細胞周期阻害剤としての作用が報告されており¹⁴⁻¹⁷、米国では既に Dacogen® として承認を受け、骨髄異形成症候群に使用されている現状にある (図 2)。

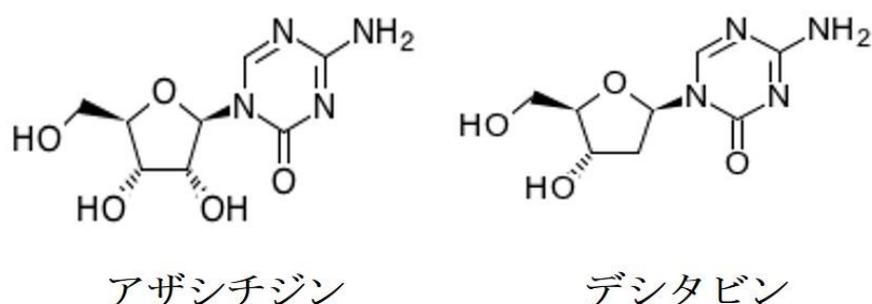


図 2. アザシチジンとデシタビンの構造 (構造式は KEGG DRUG より引用).

一方で、固形がんに対するエピジェネティクス修飾薬と既存抗がん剤との併用に関する基礎研究も盛んに行われており、固形がんに対する相乗効果が期待されている。Ishiguroらは、ヒト大腸がん由来細胞株 HCT-15 細胞に対する CPT-11 と DAC の併用効果を *in vitro* および *in vivo* において評価しており、0.5 μ M 以上の DAC 処理（72 時間）で、*p14^{ARF}*, *p16^{INK4 α}* , *BNIP3* (*Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3*) といった 3 つの遺伝子のプロモーター領域の脱メチル化と、脱メチル化にともなう mRNA レベルでの遺伝子発現回復を示している。また、HCT-15 細胞を移植した xenograft により、CPT-11 単剤投与群および DAC 単剤投与群よりも、CPT-11 と DAC との併用投与群で有意に腫瘍体積が小さくなることを報告している¹²⁾。Ikehata らは、4 種類のヒト大腸がん由来細胞株（SW480 細胞、HT29 細胞、SW48 細胞および HCT116 細胞）に対して、DNMT 阻害剤である AC, Zeb, DAC または HDAC 阻害剤である TSA, SAHA, VPA と、既存抗がん剤である 5-FU, L-OHP, CPT-11 を、それぞれ IC₅₀ 値で併用させた際の薬剤併用効果を Combination Index を求めることで評価しており、各種抗がん剤が HDAC 阻害剤との併用では拮抗的に作用する一方で、DNMT 阻害剤との併用では相加・相乗的な併用効果が得られること示し、特に、L-OHP と DAC との併用が強い相乗効果をもたらすことを報告している¹⁸⁾。Lou らは、分子標的薬であるゲフィチニブ（イレッサ®）と DAC との併用効果について、ヒト大腸がん由来細胞株 SW1116 細胞および LoVo 細胞を用いて検討し、相乗作用が得られることを示している。この薬剤併用で得られる相乗作用については、AKT/mTOR/S6 kinase pathway が阻害されることに加え、主にアポトーシスを誘導する *XAF1* (*XIAP-associated factor 1*) の脱メチル化と *XAF1* のタンパクレベルでの発現上昇が関与するものと報告している。また、薬剤併用時に *BAX* の発現増加と *Bcl-2* の発現抑制、ならびに *caspase 3* と *PARP* (Poly (ADP-ribose) polymerase) の開裂による活性化が起き、これらに付随してアポトーシスが誘導されていることを示している¹⁹⁾。本研究では、2 種類の異なるヒト大腸がん由来細胞株である HCT116 細胞および HT29 細胞を用い CPT-11 または SN-38 と低濃度 DAC との薬剤併用実

験を行った。HCT116 細胞は SN-38 の解毒的代謝酵素である *UGT1A1* のプロモーター領域のメチル化が報告されているが、HT29 細胞ではメチル化されていない事が報告されている²⁰⁾。また、HT29 細胞については、CPT-11 耐性株であることが知られている^{21,22)}。薬剤併用実験の結果、HT29 細胞については 2 剤併用の効果を認めなかったが、HCT116 細胞については DAC による CPT-11 および SN-38 の殺細胞効果の増強を認めた。この DAC による殺細胞効果増強について、*Bcl-2* タンパクの発現減少が関与していることが示唆された。*Bcl-2* ファミリータンパク質は、ミトコンドリアの膜電位を調節することでアポトーシスの制御を行っており²³⁾、抗アポトーシスタンパク（例：*Bcl-2*, *Bcl-xL*）とアポトーシス促進タンパク（例：*BAK 1*, *BAX*）に大別される。抗アポトーシスタンパクである *Bcl-2* と *Bcl-xL* は、ミトコンドリア外膜に存在し、シトクロム *c* の放出を抑制することで抗アポトーシスタンパク質として機能することが明らかにされている²⁴⁾。また、先行研究では、*Bcl-2* が化学療法剤によって誘導されるアポトーシスを抑制することが報告されている^{25,26)}。

ウィルムス腫瘍遺伝子 (*Wilms' tumor gene 1*, *WT1*) は、小児の腎芽腫であるウィルムス腫瘍の原因遺伝子であり、がん抑制遺伝子として単離された 11p13（11 番染色体短腕 13 領域）上に位置する遺伝子である²⁷⁾。*WT1* タンパクは、N 末端側にプロリン・グルタミンに富む領域を持ち、C 末端側に 4 ヶ所のジンクフィンガードメインを持つ転写調節因子でもある²⁸⁾。また、*WT1* は、主に、*WT1-A* [17 AA (-)/ 3 AA (KTS) (-)], *WT1-B* [17 AA (+)/ KTS (-)], *WT1-C* [17 AA (-)/ KTS (+)], [WT1-D [17 AA (+)/ KTS (+)] という 4 つの選択的スプライシングバリエーションを有する（図 3）ことが知られている²⁸⁾。さらに、*WT1* タンパクは、発現するがん細胞の種類やアイソフォーム依存的に *Bcl-2* 遺伝子を正または負に転写調節することが報告されている^{29,30)}。加えて、白血病および種々の固形がんにおける *WT1* 遺伝子の高発現が報告され³¹⁻³⁶⁾、*WT1* mRNA の過剰発現が認められる白血病と乳がんにおいては予後不良であることが示されている^{32,37)}。

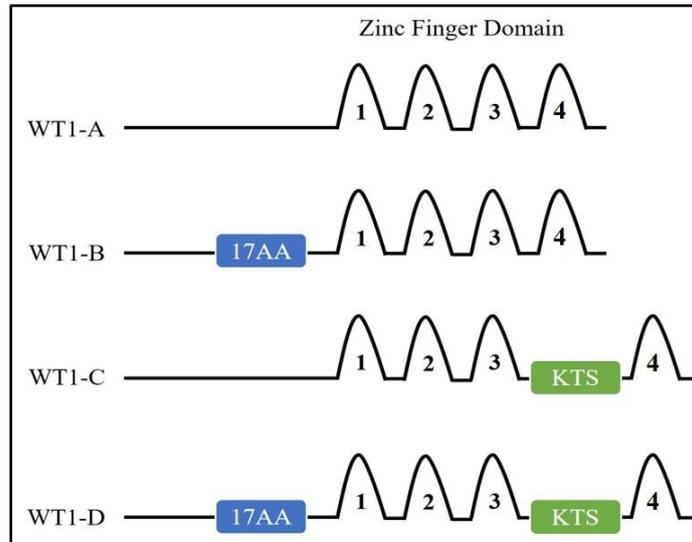


図3. WT1 タンパクの選択的スプライシングバリエント.

Hewitte らは、HeLa 細胞の Bcl-2 プロモーターを用いた CAT assay にて、WT1 が Bcl-2 プロモーター活性を抑制することを報告している²⁹⁾。一方、Mayo らは、ラブドイド細胞に WT1-B を安定発現させた際、内在性 Bcl-2 タンパクの発現量が増大することを明らかにしている³⁰⁾。こうした先行研究が報告されているが、ヒト大腸がん細胞中での WT1 の Bcl-2 に対する機能をはじめ、DAC を介した CPT-11 または SN-38 の殺細胞効果増強における WT1 および Bcl-2 の役割は、未だ何も明らかにされていない。

本研究では、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞と HT29 細胞を用い、殺細胞効果をほぼ示さず、また、DNA の脱メチル化に寄与しない低濃度 DAC がどのような分子メカニズムで CPT-11 または SN-38 の作用を増強するのかを明らかにすることを目的とした。

第2章 *in vitro*におけるDACとCPT-11またはSN-38併用での殺細胞効果の変動評価（コロニー形成試験）

1. 緒言

既存抗がん剤とエピジェネティクス修飾薬の併用療法の確立は、固形がんにおける標準治療の無効例や薬剤耐性化といった問題点に対するアプローチとなり得るため注目されている。本章では、既存抗がん剤であるイリノテカン (CPT-11) または、その活性代謝物であるSN-38とDNAメチル化阻害剤であるデシタビン (5-aza-2'-deoxycytidine, DAC) の併用効果について述べる。CPT-11とDACの併用、SN-38とDACの併用による殺細胞効果の変動は、ヒト大腸がん細胞株HCT116およびHT29を用い、薬剤曝露時のコロニー形成能の阻害率を求めることで評価した。

2. 材料および実験方法

2-1. 細胞培養および試薬

ヒト大腸がん細胞株HCT116 (Cat. No. 08-247; DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan) およびHT29 (Cat. No. EC91072201; ATCC, Manassas, VA, USA) を、10%ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) および1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加したダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。CPT-11はToronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, ON,

Canada) より, SN-38 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入し, DMSO を溶媒とした. DAC は Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Germany) より購入し, MQW を溶媒とした. 使用した他の試薬は, 入手可能な高純度のものを使用した.

2-2. 薬剤曝露およびコロニー形成試験

HCT116 細胞および HT29 細胞を用いたコロニー形成試験は, コントロールとして溶媒 (MQW および DMSO) 添加群, CPT-11 単剤処理群, SN-38 単剤処理群, DAC 単剤処理群, CPT-11 と DAC 併用群および SN-38 と DAC 併用群にて 10 日間培養し, コロニーを形成させることで行った. コロニー形成試験で用いた薬剤の濃度を以下に示す.

HCT116 細胞	
薬剤名	濃度
DAC	0, 31.25 (nM)
CPT-11	0, 62.5, 125, 250, 500 (nM)
SN-38	0, 0.35, 0.5, 0.7, 1.0 (nM)

表 1. HCT116 細胞における使用薬剤と濃度一覧.

HT29 細胞	
薬剤名	濃度
DAC	0, 75, 100 (nM)
CPT-11	0, 0.5, 1.0 (μ M)
SN-38	0, 1.0, 2.5 (nM)

表 2. HT29 細胞における使用薬剤と濃度一覧.

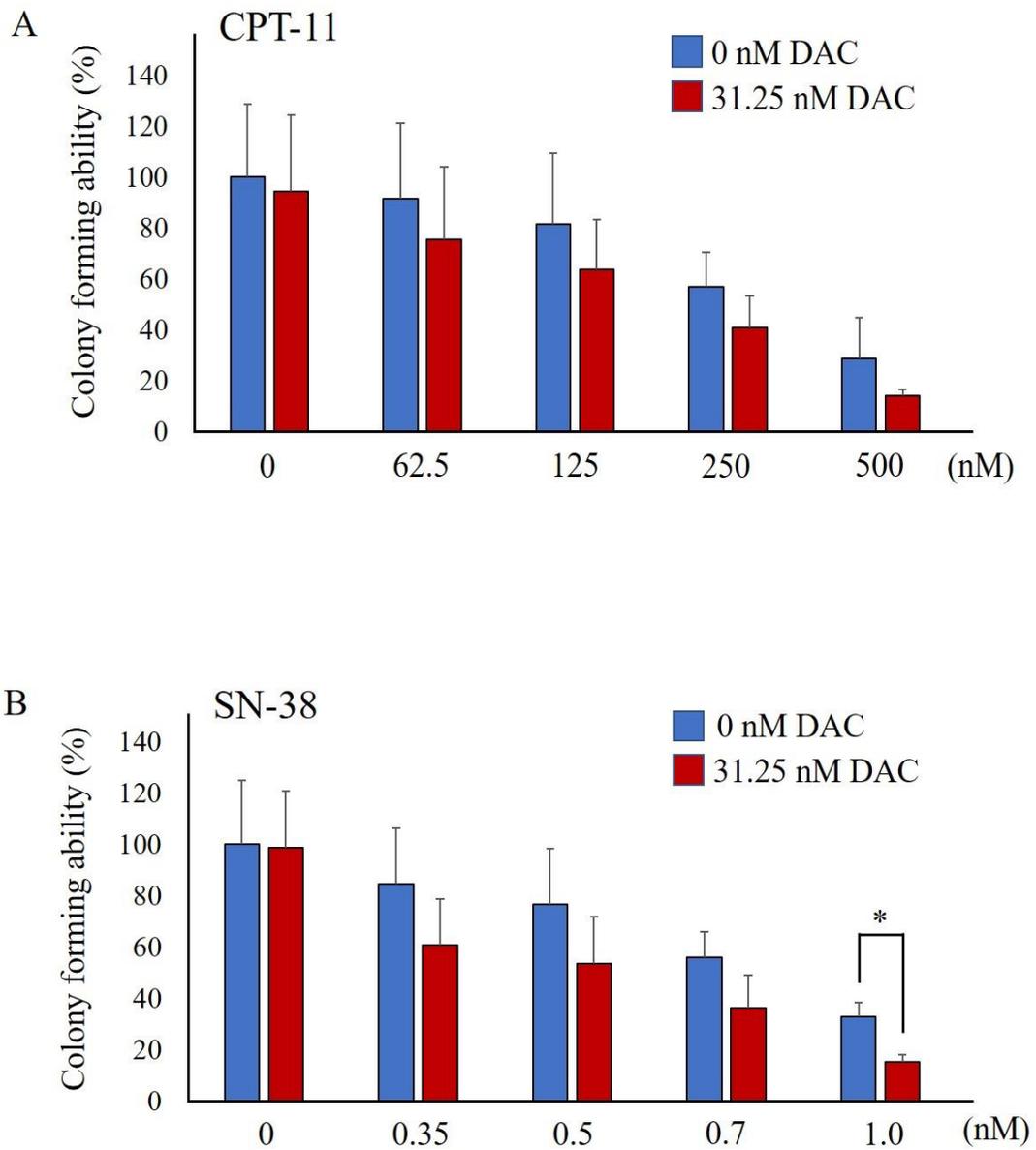
HCT116 細胞における 31.25 nM DAC は、CPT-11 または SN-38 の殺細胞効果の増減を判定するため、ほぼコロニー形成阻害能を示さない（平均して約 3.5% のコロニー形成阻害率を示す）濃度に設定した³⁸⁾。HCT116 細胞は 0.25% トリプシンによる処理後に計数し、20,000 細胞/60-mm ディッシュにて播種した。培養液量は 3 mL とした。HT29 細胞も同様に、5,000 細胞/60-mm ディッシュにて播種した。その後、上記薬剤を順次添加し、インキュベーター内で 10 日間培養した。コロニーは、10%ホルムアルデヒド溶液で固定した後、0.04%クリスタルバイオレット - 50%エタノール溶液で一晩室温にて染色し、HCT116 細胞では 50 細胞以上、HT29 細胞では 30 細胞以上から成るコロニーを陽性コロニーとして計数した。計数に際しては、60-mm ディッシュの裏側底面に二等分線をひいた後、片側（ディッシュの半分）にある陽性コロニー数を数え、2 倍にした数を総コロニー数とした。各コロニー形成試験は独立した実験を 3 回行い、平均値および標準偏差を算出した。

2-3. 統計解析

コロニー形成試験から得られたデータは、コロニー形成率として平均±標準偏差 (SD) として表した。HCT116 細胞については、Student's t-test を用い、コントロール群対 CPT-11 単剤群、SN-38 単剤群、DAC 単剤群、CPT-11+DAC または SN-38+DAC の併用群にて検定を行った。また、HT29 細胞は、1 点の濃度の CPT-11 または SN-38 に対して複数の濃度の DAC を併用させたため、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、事後検定として Tukey's test を用いて統計学的有意差について解析した。P 値 0.05 未満を統計学的に有意な結果であるとした。

3. 結果

HCT116 細胞と HT29 細胞における薬剤感受性の評価



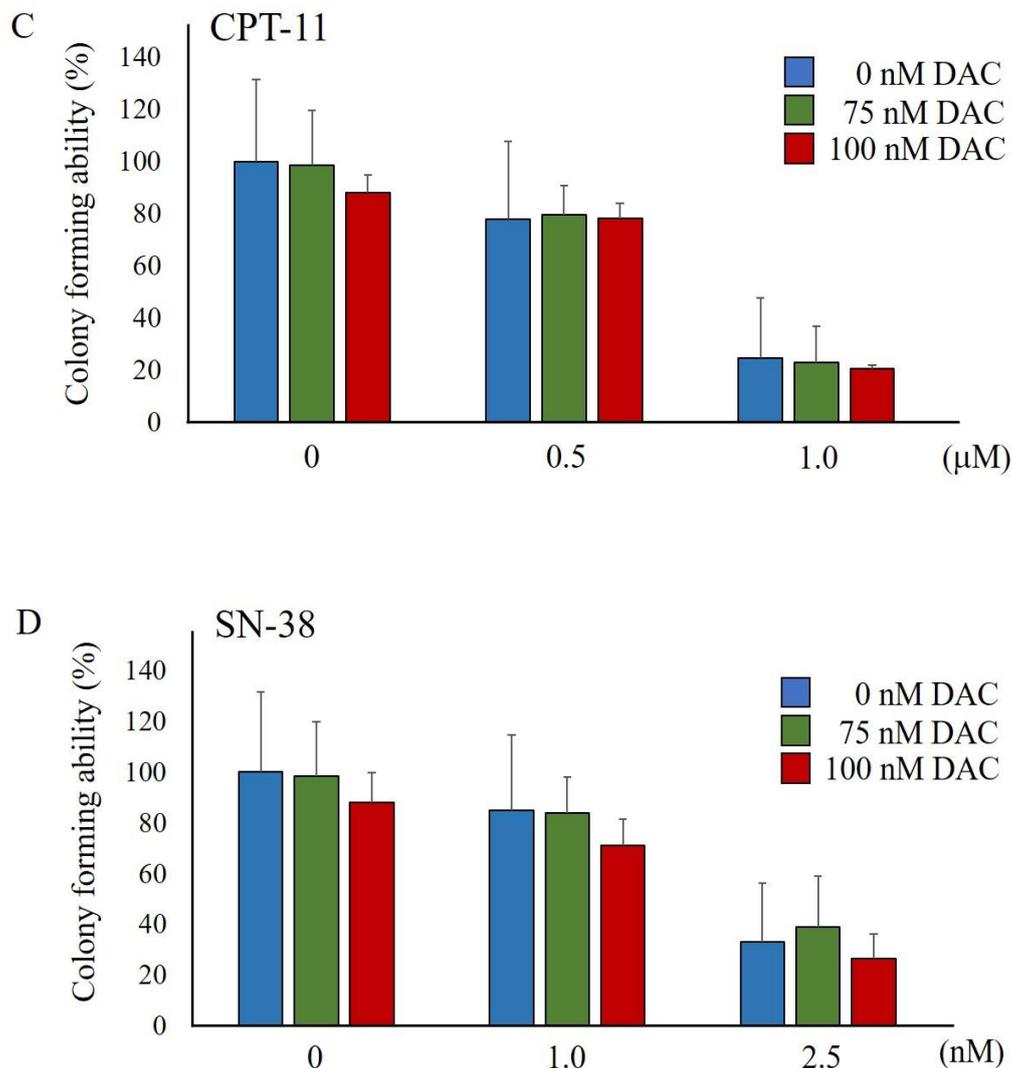


図4. HCT116細胞における (A) CPT-11, (B) SN-38 のコロニー形成能に対する 31.25 nM DAC の影響. X軸は CPT-11 (A) または SN-38 (B) の薬剤濃度を示し, Y軸はコロニー形成率を示す. * $P < 0.05$: 統計学的有意差を示す (Student's t-test). HT29細胞における (C) CPT-11, (D) SN-38 のコロニー形成能に対する 75 nM DAC または 100 nM DAC の影響. X軸は CPT-11 (C) または SN-38 (D) の薬剤濃度を示し, Y軸はコロニー形成率を示す. 統計解析には一元配置分散分析の後, Tukey's test を用いて検定した. 各コロニー形成試験は, 独立した実験を3回行った.

HCT116細胞においては, CPT-11単剤 (62.5-500 nM) および SN-38単剤 (0.35-1.0 nM) ともに用量依存的な殺細胞効果を認めた. 31.25 nM DACを併用させたとき, CPT-11との併用群では統計学的有意差は認められないが, その殺細胞効果は増強される傾向にあっ

た。SN-38 においては、1.0 nM SN-38 と 31.25 nM DAC とを併用させたときに統計学的有意差を認めた (図 4A, 4B)。HT29 細胞においても CPT-11 単剤 (0.5-1.0 μ M) および SN-38 単剤 (1.0-2.5 nM) とともに用量依存的な殺細胞効果を認めた。しかし、HCT116 細胞とは対照的に、HT29 細胞では、DAC 濃度を 31.25 nM より 2.4 倍高い 75 nM または 3.2 倍高い 100 nM と設定したが、CPT-11 および SN-38 とともに殺細胞効果の増強は認められなかった (図 4C, 4D)。薬剤感受性を HCT116 細胞と比較すると、HT29 細胞では CPT-11 (0.5-1.0 μ M) に対して約 2 倍、SN-38 (1.0-2.5 nM) に対して約 3~3.5 倍、薬剤に対する抵抗性が高いことが示される結果となった。CPT-11 単剤処理時のコロニー形成率は、コントロールに対して 0.5 μ M で 78.0%、1.0 μ M で 24.6%であり、SN-38 単剤処理時のコロニー形成率は、1.0 nM で 85.0%、2.5 nM で 33.1%となった。これらに、75 nM DAC または 100 nM DAC を併用させても CPT-11 および SN-38 の殺細胞効果増強は認められなかった (図 4C, 4D)。

4. 考察

コロニー形成試験では、HCT116 細胞と HT29 細胞について、その薬剤感受性の差異が顕著に現れた。HCT116 細胞では、CPT-11 および SN-38 の殺細胞効果が、細胞毒性を示さない低濃度の DAC により増強されることが示唆された。HT29 細胞は、camptothecine (CPT) 並びに CPT-11 抵抗性株であることが報告されている^{21,22)}。本実験結果より、殺細胞効果の増強、すなわち、薬剤感受性の亢進が認められた HCT116 細胞については、DAC が HT29 細胞中では引き起こしていない何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。臨床試験で用いられる DAC の血中濃度は、米国の第 I 相試験で約 360-660 nM (1 hr infusion of 45mg/m²) であり³⁹⁾、日本での第 I/II 相試験では約 120-220 nM (1 hr infusion of 15-20 mg/m²) となることが報告されている⁴⁰⁾。日本人の血中 DAC 濃度と比較すると、31.25 nM

DAC は 120 nM DAC の 3.84 分の 1, 220 nM DAC の約 7 分の 1 に相当する。この低濃度 DAC によってもたらされる CPT-11 または SN-38 の殺細胞効果の増強が、相加的作用または相乗的作用か、あるいは拮抗的作用かを明らかにすることは本研究を遂行するにあたっての基盤的なデータとなると考える。したがって、さらなる解析として **Combination Index** を求める実験を行った。

第3章 Combination Index を用いた DAC と CPT-11 併用および DAC と SN-38 併用による殺細胞効果の評価

1. 緒言

Chou らが考案した Combination Index (CI) は、2 剤以上の薬剤を併用投与した場合に、Median Effect 理論に基づき薬剤の用量とその効果を計算することによって薬剤併用の効果を評価する指標である⁴¹⁾。第2章では HCT116 細胞において、31.25 nM DAC が CPT-11 または SN-38 の殺細胞効果を増強することを示した。本章では、HCT116 細胞を用い、DAC の濃度をさらに細分化した際の CI を求めることにより、CPT-11 または SN-38 と DAC との併用効果について検討を行った。

2. 材料および実験方法

2-1. 細胞培養および試薬

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 (Cat. No. 08-247; DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan) を、10% FBS (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) および 1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加した DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーターにて培養した。CPT-11 は Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, ON, Canada) より、SN-38 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入し、DMSO を溶媒とした。DAC は Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Germany) より購入し、MQW を溶媒とした。

2-2. 薬剤曝露およびコロニー形成試験

HCT116 細胞を用いたコロニー形成試験は、コントロールとして溶媒添加群, CPT-11 単剤処理群, SN-38 単剤処理群, DAC 単剤処理群, CPT-11 と DAC 併用群および SN-38 と DAC 併用群にて 10 日間培養し, コロニーを形成させた.

コロニー形成試験で用いた薬剤併用群における各濃度の組み合わせを以下に示す.

組み合わせ番号	DAC (nM)	CPT-11 (nM)
(1)	3.9	125
(2)	3.9	250
(3)	3.9	500
(4)	7.8	125
(5)	7.8	250
(6)	7.8	500
(7)	15.625	125
(8)	15.625	250
(9)	15.625	500
(10)	31.25	125
(11)	31.25	250
(12)	31.25	500

表 3. コロニー形成試験に用いた DAC と CPT-11 の濃度と組み合わせ一覧.

組み合わせ番号	DAC (nM)	SN-38 (nM)
(1)	3.9	0.35
(2)	3.9	0.5
(3)	3.9	0.7
(4)	3.9	1.0
(5)	7.8	0.35
(6)	7.8	0.5
(7)	7.8	0.7
(8)	7.8	1.0
(9)	15.625	0.35
(10)	15.625	0.5
(11)	15.625	0.7
(12)	15.625	1.0
(13)	31.25	0.35
(14)	31.25	0.5
(15)	31.25	0.7
(16)	31.25	1.0

表 4. コロニー形成試験に用いた DAC と SN-38 の濃度と組み合わせ一覧.

HCT116 細胞は 0.25%トリプシン処理後に計数し、20,000 細胞/60-mm ディッシュにて播種した。その後、上記薬剤を順次添加し、インキュベーター内で 10 日間培養した。形成したコロニーは 10%ホルムアルデヒド溶液で固定した後、0.04%クリスタルバイオレット - 50%エタノール溶液で一晩室温にて染色し、50 細胞以上から成るコロニーを陽性コロニーとして計数した。計数に際して、60-mm ディッシュの裏側底面に二等分線をひき、片側

(ディッシュの半分)にある陽性コロニー数を数え、2倍にした数を総コロニー数とした。各コロニー形成試験は、独立した実験を2回行い、コントロールに対するコロニー形成率の平均値を算出した。

2-3. Combination Index (CI) の算出

コロニー形成試験より得られた各々の濃度における CPT-11 単剤, SN-38 単剤, DAC 単剤, CPT-11+DAC および SN-38+DAC 併用群のデータは、各コントロール群に対するコロニー形成阻害率である f_a (fraction affected) に変換し、CI を求めるために、CompuSyn software version 1.0 (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) を使用した⁴¹⁾。表 3 および表 4 より、本併用実験で使用した薬剤の濃度比は一定でない (non-constant ratio) ため、ソフトウェア上では、はじめに non-constant ratio analysis を選択し、CI および normalized isobologram (正規化イソボログラム) を自動的に算出させた⁴²⁾。なお、CI は (式 1) より理論的に導出される。

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} = \frac{(D)_1}{(Dm)_1 \left[\frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2 \left[\frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m_2}} \quad \dots (式 1)$$

$(Dx)_1$ および $(Dx)_2$ は、それぞれの濃度における DAC および CPT-11 または SN-38 固有のパラメータであり、 $(Dx) = Dm \left[\frac{f_a}{1-f_a} \right]^{1/m}$ より求められる。 $(D)_1$ および $(D)_2$ には DAC または CPT-11, SN-38 の濃度が代入される。 $(Dm)_1$ および m_1 は、3.9-31.25 nM DAC 単剤処理時の濃度とその f_a より算出される定数であり、同様に、 $(Dm)_2$ および m_2 も CPT-11 または SN-38 単剤処理時の様々な濃度 (表 3, 表 4) と f_a から自動的に算出される定数である。本実験では、X 軸が $\frac{(D)_1}{(Dx)_1}$ 、Y 軸が $\frac{(D)_2}{(Dx)_2}$ である normalized isobologram を

CompuSyn software を用いて作成した。また、薬剤併用効果を評価する指標となる CI 値については、以下の3通りに大別される。CI < 0.90 は相乗的、CI = 0.90-1.10 は相加的、CI > 1.10 は拮抗的な併用効果であると評価する^{41,42)}。

3. 結果

3-1. HCT116 細胞における CPT-11 と DAC の併用効果

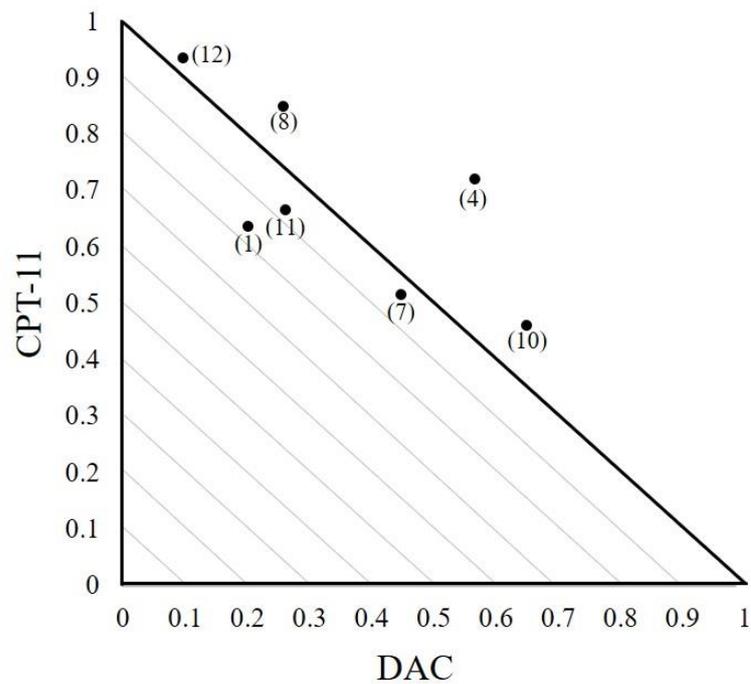


図 5. HCT116 細胞における CPT-11 と DAC 併用による normalized isobologram. プロット付近の (No.) は、表 3 の組み合わせ番号に対応する。独立した 2 回のコロニー形成試験の平均値を用いて CI を算出した。

CompuSyn software より作成したイソボログラムを図 5 に示した。図 5 のプロット付近に

示した (No.) は、表 3 の組み合わせ番号と対応している。normalized isobologram では、 $(Dx)_1$ と $(Dx)_2$ のどちらか一方、または両方の計算値が 1.0 以上になると CI 値にかかわらずプロットされない。CPT-11 と DAC の併用については、CI 値を示すプロットがイソボログラムの斜辺付近 (CI=0.90-1.10) に多く、弱い相加作用または拮抗作用が生じるものと判定した。

3-2. HCT116 細胞における SN-38 と DAC の併用効果

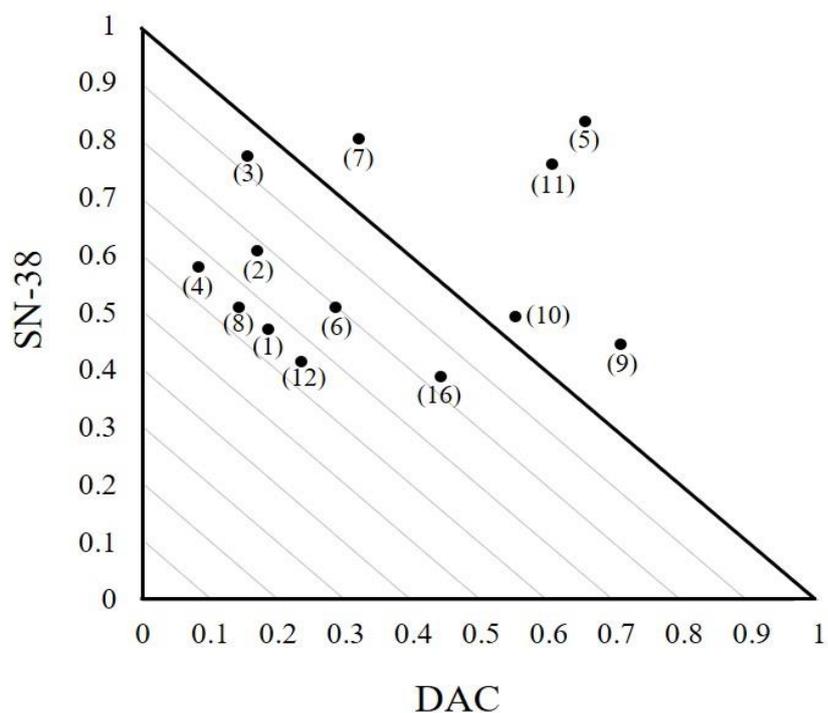


図 6. HCT116 細胞における SN-38 と DAC 併用による normalized isobologram. プロット付近の (No.) は、表 4 の組み合わせ番号に対応する。独立した 2 回のコロニー形成試験の平均値を用いて CI を算出した。

結果 3-1.と同様に、SN-38 と DAC の併用結果を図 6 に示した。CI 値は 0 に近い (値が小さい) ほど薬剤併用による強い相乗効果が得られていることを示す。CPT-11 と DAC の

併用効果と比較すると、 $CI < 0.90$ となるプロットが増加し、SN-38 と DAC の併用は相加的、または、中程度の相乗効果をもたらす傾向にあった。

4. 考察

Combination Index を用いることにより、際立った薬剤併用効果は認められなかったが、CPT-11+DAC では相加的な、SN-38+DAC では相乗的な殺細胞効果が得られることが示唆された。DAC による抗悪性腫瘍薬の効果増強は認められたが、CPT-11 では相加的な、SN-38 では相乗的であるという違いがあった。この結果の相違について、CPT-11 は、カルボキシルエステラーゼ (CES) によって加水分解を受けて SN-38 となるプロドラッグであるが (図 7)、CPT-11 自体にも SN-38 の 1/200 から 1/1,000 の殺細胞効果があるため⁴³⁾、弱い相加作用にとどまるが殺細胞効果を示したものとする。

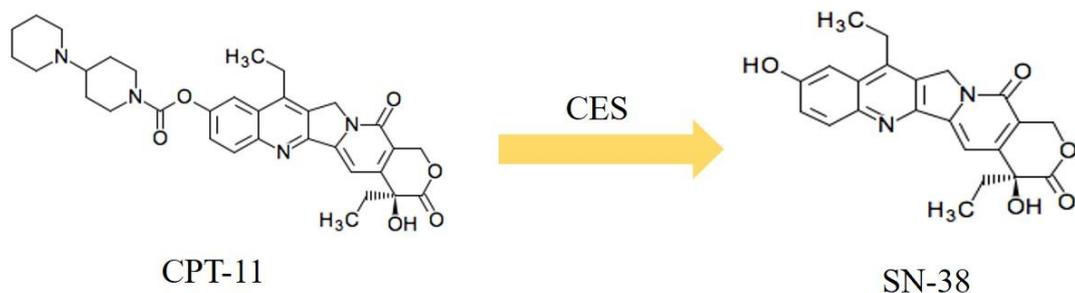


図 7. CPT-11 がカルボキシルエステラーゼにより SN-38 となる経路 (構造式は KEGG GRUG より引用).

また、CPT-11 を添加した場合、HCT116 細胞内の CES によって SN-38 となる CPT-11 と、CPT-11 のまま残る CPT-11 分子の存在が考えられる。この時、前者の SN-38 の殺細胞効果を、後者の CPT-11 分子が阻害するために微弱な相加的併用効果にとどまった可能性もあ

ると考える。活性代謝物である SN-38 を添加した場合には、SN-38 の細胞効果を阻害する分子が存在しないため、DAC との相乗的殺細胞効果が得られたものと推察する。

本実験では、2 回の独立したコロニー形成試験より求めたコロニー数およびコロニー形成阻害率をもとに CI 値を算出したため、今後、さらに実験回数を増やし、精度を高めていく必要があると考える。

第4章 DAC併用によるCPT-11およびSN-38の殺細胞効果増強に關与する事象の検討

1. 緒言

これまでに示してきたDACによるCPT-11, SN-38の殺細胞効果増強には、どのような遺伝子が關与しているのかをスクリーニングするため、候補となる遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCR法にて検討した。その結果、薬剤併用群にて、B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)の発現レベルがコントロール群および単剤処理群と比べて有意に減少していることが分かった⁴⁴⁾。Bcl-2はミトコンドリアでアポトーシスを抑制するタンパクである。このBcl-2遺伝子の発現減少に着目し、Bcl-2の転写調節因子となり得る分子を文献調査した結果、Wilms' tumor gene 1 (WT1)に着目した。序論でも述べたように、WT1タンパクはBcl-2のプロモーター領域に高い親和性を有し、発現する細胞(臓器)の種類やWT1のアイソフォームによってBcl-2を正または負に転写調節することが報告されている^{29,30)}。しかし、WT1タンパクが、大腸がん細胞株の内在性Bcl-2をどちらに転写制御するかは未だ明らかになっていない(図8)。したがって、本章では、大腸がん細胞株でのBcl-2に対するWT1タンパクの機能と、薬剤併用によるBcl-2ファミリータンパクおよびWT1への影響を検討した。

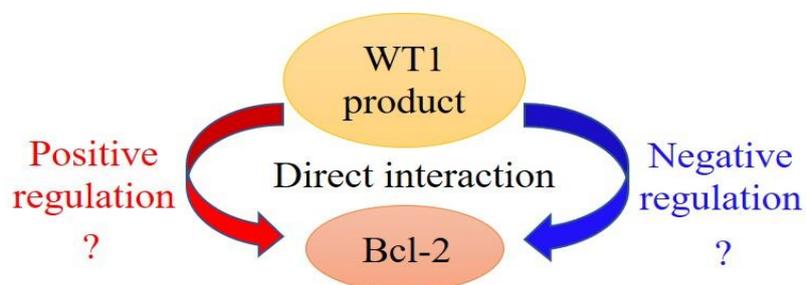


図8. WT1タンパクのBcl-2遺伝子転写調節機構。

2. 材料および実験方法

2-1. 細胞培養および試薬

ウエスタンブロット法では、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 (Cat. No. 08-247; DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan) および HT29 (Cat. No. EC91072201; ATCC, Manassas, VA, USA) を、10% FBS (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) および 1% antibiotic-antimycotic (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加した DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用い、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。RNA 干渉法では、上記 HCT116 細胞を同様の条件下で培養した。CPT-11 は Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, ON, Canada) より、SN-38 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入し、DMSO を溶媒とした。DAC は Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Germany) より購入し、MQW を溶媒とした。

2-2. ウエスタンブロット法

HCT116 細胞は 0.25%トリプシン処理後に計数し、20,000 細胞/60-mm ディッシュにて播種した。溶媒添加群をコントロールとし、500 nM CPT-11 単剤、1.0 nM SN-38 単剤、31.25 nM DAC 単剤、500 nM CPT-11 と 31.25 nM DAC 併用、1.0 nM SN-38 と 31.25 nM DAC 併用の 6 群を、4 日間、6 日間、8 日間とそれぞれタイムコースをとって培養した。HT29 細胞も 0.25%トリプシン処理後に計数し、5,000 細胞/60-mm ディッシュにて播種した。溶媒添加群をコントロールとし、500 nM CPT-11 単剤、1.0 nM SN-38 単剤、75 nM DAC 単剤、500 nM CPT-11 と 75 nM DAC 併用、1.0 nM SN-38 と 75 nM DAC 併用の 6 群を 6 日間培養した。培養後は、RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40 および

0.1% SDS)で可溶化した。タンパク濃度はブラッドフォード法を用いて定量し、1穴あたり20 µgの総タンパク試料を10% SDS-PAGEにて分離し、PVDFメンブレンに転写した。その後、Blocking One (Nacalai, Kyoto, Japan) を使用して90分間、室温で振盪させながらブロッキングを行い、TBS-T (0.1% Tween-20を含むトリス緩衝生理食塩水) で洗浄した。1次抗体は、Can Get Signal Solution 1 (Toyobo Life Science, Osaka, Japan) でそれぞれ希釈し、4°Cで一晩反応させた。抗 Bcl-2 抗体 (500倍希釈)、抗 Bcl-xL 抗体 (1,000倍希釈)、抗 BAK1 抗体 (1,000倍希釈)、抗 BAX 抗体 (1,000倍希釈) は、前沢千早教授 (岩手医科大学腫瘍生物学研究部門) より提供していただいた。抗 WT1 抗体 (cat. no. M3561, Clone 6F-H2; Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) は200倍希釈、抗ベータアクチン抗体 (cat. no. A1978, Sigma-Aldrich; Merck KGaA) は1,000倍希釈にて用いた。一次抗体反応後、2次抗体として horseradish peroxidase-conjugated mouse-IgG (cat. no. 616529; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) または、 horseradish peroxidase-conjugated rabbit-IgG (cat. no.3053-1; Epitomics, Inc., CA, USA) を Can Get Signal Solution 2 (Toyobo Life Science, Osaka, Japan) で1,000倍希釈し、室温で2時間反応させた。TBS-Tで洗浄した後、ChemiDox™ XRS+ with Image Lab™ software version 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にてバンドの検出を行った。その後、ImageJ software version 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いてバンドの輝度を測定し、数値化した。これらは、独立した実験を3回行い、平均値および標準偏差を算出した。

2-3. 統計解析

ウエスタンブロット法から得られたデータを ImageJ software にて数値化した後、Bcl-2 タンパクおよび WT1 タンパクの発現レベルについて、一元配置分散分析を行い、事後検定として Dunnett's test を用いて統計学的有意差について解析した。P 値 0.05 未満を統計学的に有意な結果であるとした。

2-4. RNA 干渉法 (RNAi)

RNA 干渉法 (RNAi) は HCT116 細胞における WT1 をノックダウンするために行った。HCT116 細胞は、0.25%トリプシン処理後に計数し、300,000 細胞/60-mm ディッシュに播種した。WT1 siRNA (cat. no. HSS111390) は Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc. より購入し、コントロール siRNA (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, SIC001-10) は Sigma-Aldrich; Merck KGaA より購入した。HCT116 細胞へのトランスフェクションは 10 μ l の Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いた。解析を行うサンプルとして、(1) None : 10 μ l Lipofectamine のみ (2) Scramble RNAi : 10 μ l Lipofectamine と 100 nM コントロール siRNA (3) WT1 RNAi : 10 μ l Lipofectamine と 100 nM WT1 siRNA の 3 群を作り、トランスフェクションから 12 時間後と 24 時間後にタンパク抽出を行い、それぞれ WT1 と Bcl-2 のタンパク発現レベルをウエスタンブロット法および ImageJ software により解析した。Scramble RNAi および WT1 RNAi に用いた siRNA は、300 pmol/60-mm ディッシュとした。WT1 RNAi は、12 時間後と 24 時間後、それぞれにつき独立した実験を 2 回を行い、平均値を算出した。

3. 結果

3-1. HCT116 細胞における薬剤処理後の Bcl-2 ファミリータンパクの解析

薬剤併用効果による殺細胞効果増強が得られた HCT116 細胞について、薬剤処理から 4 日目、6 日目、8 日目の総タンパクを用いて、抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 と Bcl-xL、アポトーシス促進タンパクである BAK1 と BAX の発現を調べた結果、薬剤処理から 6 日目

の Bcl-2 タンパクに顕著な発現減少を認めた (図 9A). そのタンパク発現レベルは, コントロールに対して CPT-11 単剤が 62.7%, SN-38 単剤が 66.7%, DAC 単剤が 50.0%, CPT-11+DAC が 7.8%, そして, SN-38+DAC が 6.9%であった (図 9B). 一方, Bcl-xL や BAK1, BAX については顕著なタンパク発現の増減を認めなかった (図 10).

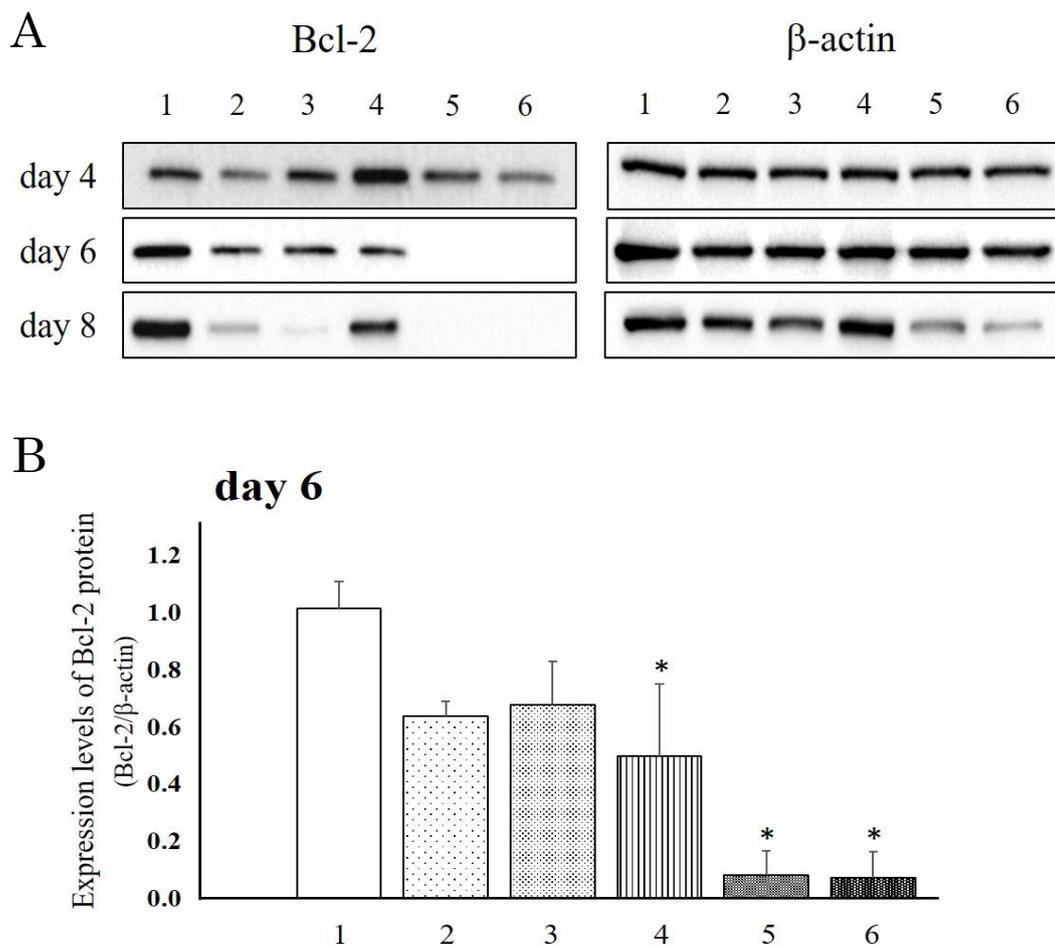


図 9. (A) HCT116 細胞における薬剤処理から 4, 6, 8 日目の ACTB および Bcl-2 タンパク. (B) 薬剤処理から 6 日目の Bcl-2 タンパクの発現レベル. 各サンプルは対応する ACTB の発現レベルでノーマライズした. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 31.25 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+31.25 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+31.25 nM DAC を示す. *はコントロールに対する有意差を示す ($P < 0.05$). これらは独立した実験を 3 回行った.

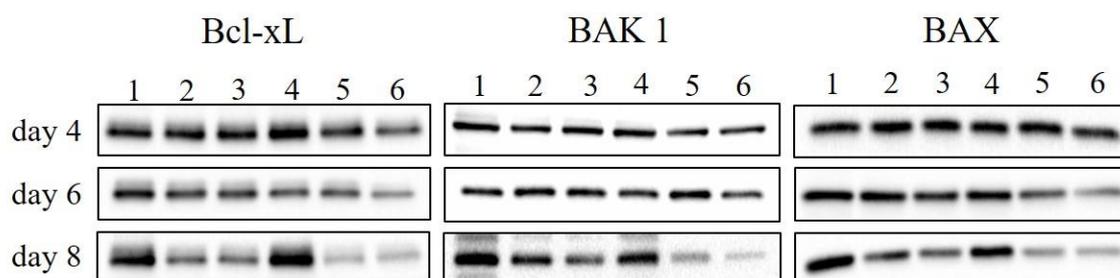


図 10. HCT116 細胞における薬剤処理から 4, 6, 8 日目の Bcl-2 ファミリータンパク. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 31.25 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+31.25 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+31.25 nM DAC を示す. これらは独立した実験を 3 回行った.

3-2. HT29 細胞における薬剤処理後の Bcl-2 ファミリータンパクの解析

CPT-11 または SN-38 と DAC との併用効果が得られた HCT116 細胞では, 2 剤併用による Bcl-2 タンパクの発現抑制が観察された. 一方, 薬剤併用による殺細胞効果増強を認めなかった HT29 細胞についても薬剤処理から 6 日目の総タンパクを用いてウエスタンブロッティングを行ったが, 内在性 Bcl-2 タンパクの発現が検出限界以下であった (図 11). また, 他の Bcl-2 ファミリータンパクの発現は確認されたが顕著な変化は見られなかった (図 12).

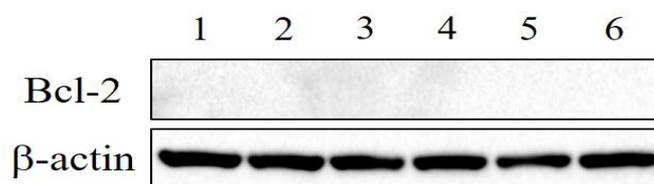


図 11. HT29 細胞における薬剤処理から 6 日目の Bcl-2 タンパク. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 75 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+75 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+75 nM DAC を示す. これらは独立した実験を 3 回行った.

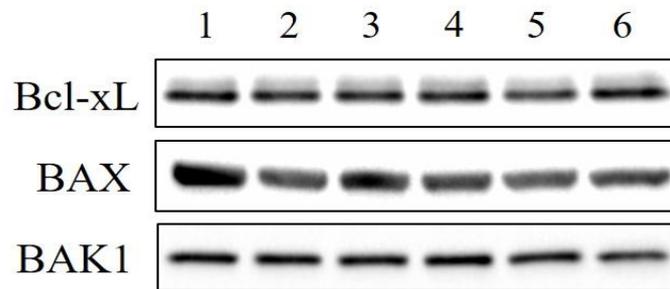


図 12. HT29 細胞における薬剤処理から 6 日目の Bcl-2 ファミリータンパク. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 75 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+75 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+75 nM DAC を示す. これらは独立した実験を 3 回行った.

3-3. HCT116 細胞における薬剤処理後の WT1 タンパクの解析

HCT116 細胞を薬剤処理した後の WT1 タンパク発現レベルは, コントロールに対して CPT-11 単剤で 79.2%, SN-38 単剤で 71.1%, DAC 単剤で 62.9%, CPT-11+DAC で 14.0%, SN-38+DAC で 8.0%であり, その発現レベルは抑制される結果となった (図 13, 14).

また, 薬剤処理時の WT1 タンパク発現抑制のパターンは, Bcl-2 タンパクの発現抑制のパターンとよく類似していた (図 9).

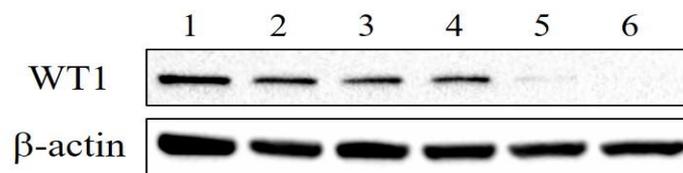


図 13. HCT116 細胞における薬剤処理から 6 日目の β -actin および WT1 タンパク. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 31.25 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+31.25 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+31.25 nM DAC を示す. これらは独立した実験を 3 回行った.

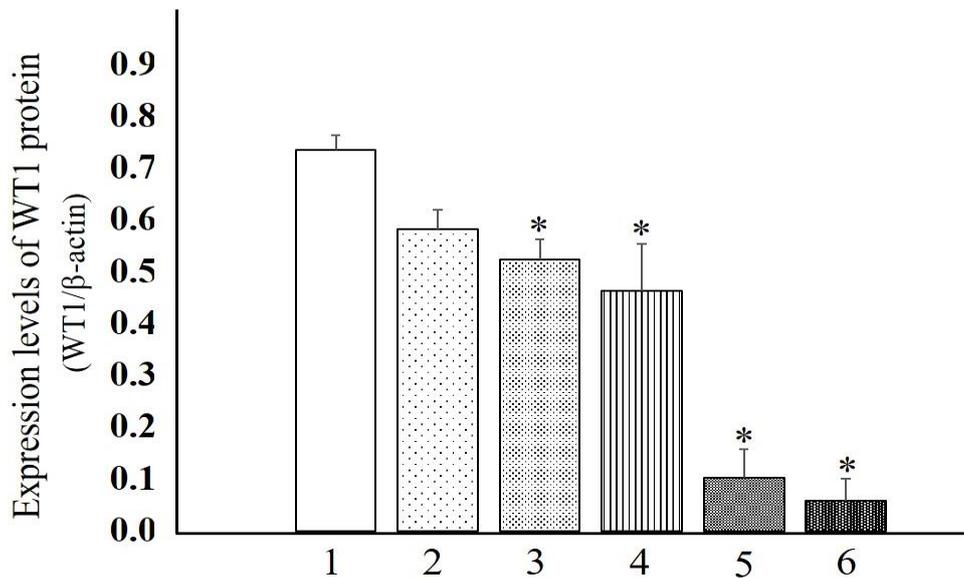


図 14. HCT116 細胞における薬剤処理から 6 日目の WT1 タンパクの発現レベル. 各サンプルは対応する ACTB の発現レベルでノーマライズした. X 軸は, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 31.25 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+31.25 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+31.25 nM DAC を示す. *はコントロールに対する有意差を示す ($P < 0.05$). これらは独立した実験を 3 回行った.

3-4. HT29 細胞における薬剤処理後の WT1 タンパクの解析

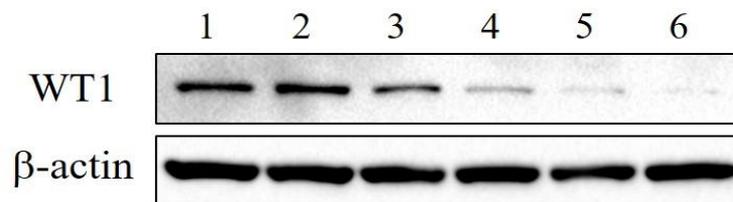


図 15. HT29 細胞における薬剤処理から 6 日目の β-actin および WT1 タンパク. 各レーンは, 1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 75 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+75 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+75 nM DAC を示す. これらは独立した実験を 3 回行った.

内在性 Bcl-2 タンパクの発現が認められなかった HT29 細胞であるが、WT1 タンパクの発現は検出可能であった。さらに、各薬剤に曝露した後の WT1 タンパクの発現レベルは、コントロールに対して CPT-11 単剤で 81.4%、SN-38 単剤で 67.2%、DAC 単剤で 53.2%、CPT-11+DAC で 21.4%、SN-38+DAC で 13.1%と減少していた (図 15, 16)。

また、この結果は、薬剤処理時の HCT116 細胞における WT1 タンパクの発現レベル減少のパターンと類似していた (図 13, 14)。

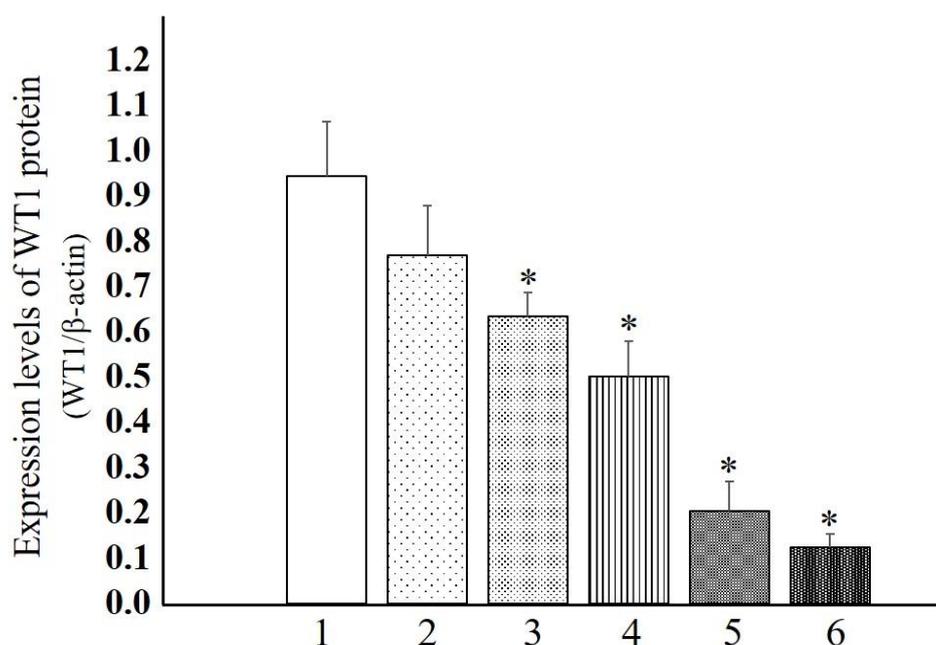


図 16. HT29 細胞における薬剤処理から 6 日目の WT1 タンパクの発現レベル。各サンプルは対応する ACTB の発現レベルでノーマライズした。X 軸は、1: 溶媒コントロール, 2: 500 nM CPT-11 単剤, 3: 1.0 nM SN-38 単剤, 4: 75 nM DAC 単剤, 5: 500 nM CPT-11+75 nM DAC, 6: 1.0 nM SN-38+75 nM DAC を示す。*はコントロールに対する有意差を示す ($P < 0.05$)。これらは独立した実験を 3 回行った。

3-5. HCT116 細胞における WT1 ノックダウンと、それともなう Bcl-2 タンパクの発現解析

HCT116 細胞に 100 nM WT1 siRNA (300 pmol/dish) を作用させてから 12 時間後に、WT1 のタンパクレベルでの発現抑制が確認された。WT1 RNAi から 12 時間後の WT1 タンパクの発現レベルは、None と比較して 88.8%、Scramble RNAi と比較して 88.2%に抑制されていた。24 時間後では、None に対して 66.1%、Scramble RNAi に対して 71.2%であり、発現の回復が確認された (図 17)。

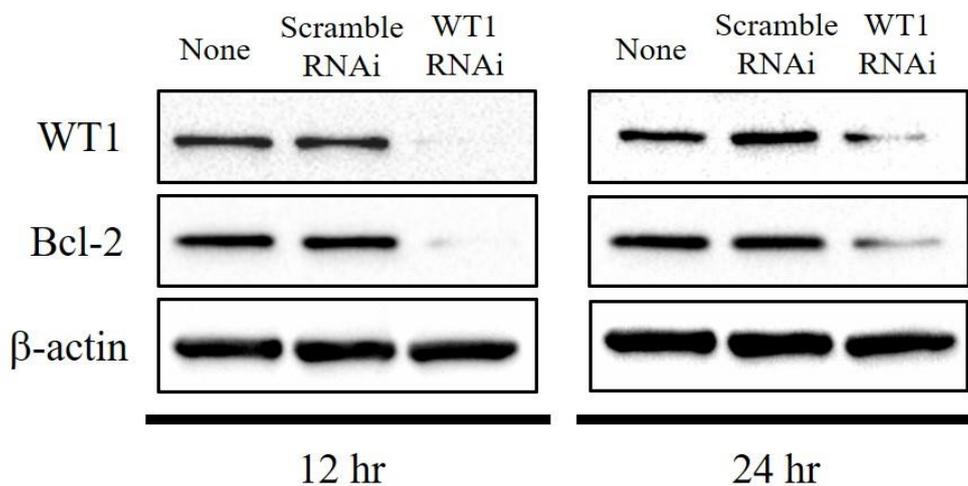


図 17. HCT116 細胞における WT1 ノックダウン時の WT1 および Bcl-2 タンパクの発現変動。None: 10 μ l Lipofectamine のみ, Scramble RNAi: 10 μ l Lipofectamine および 100 nM コントロール siRNA, WT1 RNAi: 10 μ l Lipofectamine および 100 nM WT1 siRNA を示す。トランスフェクション後、12 時間と 24 時間におけるサンプルにてウエスタンブロットを行った。これらは独立した実験を 2 回行った。

同様に、Bcl-2 タンパクの発現レベルは、WT1 RNAi から 12 時間後では None に対して 44.6%、Scramble RNAi に対して 55.8%と WT1 タンパクの発現抑制にともない減少した。さらに 24 時間後の Bcl-2 タンパクは、None に対して 62.3%、Scramble RNAi に対して

66.9%であり，その発現レベルの回復が確認された（図 17）。

4. 考察

以上の結果より，DAC と CPT-11 または SN-38 との併用で殺細胞効果増強が得られた HCT116 細胞と，殺細胞効果増強が認められなかった HT29 細胞での大きな相違点は，内在性 Bcl-2 タンパクの発現レベルであった。いくつかの先行研究では，がん細胞における内在性 Bcl-2 の発現量が，CPT-11 や SN-38 に対する耐性化と関連していることを示しており，Bcl-2 が，がん細胞の抗悪性腫瘍薬に対する感受性を低下させることを報告している^{45,46}。HCT116 細胞では，各薬剤の単剤処理時と比較して，2 剤併用時に顕著な Bcl-2 タンパクの発現抑制が起きている。このことから，DAC と CPT-11 や SN-38 との併用時の HCT116 細胞内では，単剤処理時と比較してより多くの DNA ダメージが蓄積し，アポトーシス等の亢進が惹起されているものと推察する。また，Bcl-2 の転写調節因子である WT1 タンパクに関しては，WT1 ノックダウンにより Bcl-2 タンパクの発現が抑制されたことから，大腸がん細胞内では Bcl-2 を正に転写調節していることが示された。

Tatsumi らは，線維肉腫細胞 HT-1080，胃がん細胞 AZ-521，肺がん細胞 LU99B を用いて WT1 が exon 5 [17 AA(+)/KTS(-) かつ 17 AA(+)/KTS(+)] を有する場合，これらのがん細胞がアポトーシス抵抗性になることを示しており，WT1 の exon 5 に対する shRNA 導入により，抗がん剤の感受性増強とアポトーシスの誘導が起こることを報告している⁴⁷。本実験結果では，DAC および CPT-11 または SN-38 の併用によって，HCT116 細胞と HT29 細胞について WT1 タンパクの顕著な発現減少が認められた。Tatsumi らの報告を考慮すると，HCT116 細胞のみならず，HT29 細胞についても薬剤感受性の増強が誘導されると思われる。しかし，HT29 細胞については 2 剤併用による殺細胞効果増強は認められなかった。

したがって、DACによるCPT-11またはSN-38の殺細胞効果の増強が得られる過程には、
内在性Bcl-2の発現量が重要な因子のひとつであると考えられる。

第5章 総合考察および結論

本研究は、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞と HT29 細胞を用いて、DAC と CPT-11 または SN-38 の 2 剤併用による殺細胞効果増強の分子メカニズムを明らかにすることを目的としていた。まず、HCT116 細胞を用いた WT1 RNAi の結果より、ヒト大腸がん細胞株における WT1 タンパクの Bcl-2 に対する転写調節機構が、正の転写調節であることをはじめて明らかにした。また、CPT-11 または SN-38 と DAC との併用に対する薬剤応答性が異なる HCT116 細胞と HT29 細胞との分子的差異を調べた結果、2 細胞間における大きな差異は、内在性 Bcl-2 タンパクの発現レベルにあった。その一方、Bcl-2 の転写を促進させる WT1 タンパクは両細胞ともに発現していた。さらに、WT1 タンパクの発現は 2 剤併用により両細胞とも顕著に抑制されていた。これらの結果を踏まえて、CPT-11 または SN-38 と DAC の併用による殺細胞効果増強に関する分子メカニズムのひとつとして、WT1 タンパクの抑制と、それに付随する Bcl-2 タンパクの発現抑制、すなわち、WT1-Bcl-2 経路の不活性化が関与していると結論した。この結論にともない、この経路の不活性化が 2 剤併用によるものであるか否かを、WT1 ノックダウン下の各薬剤単剤処理群、薬剤併用群における細胞増殖抑制率より明らかにすることが今後の課題である。

エピジェネティクス修飾薬が固形がんに対して臨床応用されることは、既存抗がん剤の耐性化に関する問題や、進行性大腸がん等における化学療法の無効例といった問題を打開するための有望な治療戦略となり得る。しかし、その選択毒性や作用機序については明確でない点も多い。本研究において、2 剤併用による殺細胞効果増強が得られた HCT116 細胞についても、殺細胞効果を示さない濃度の DAC が CPT-11 または SN-38 の殺細胞効果を増強させた。この殺細胞効果増強には WT1 タンパクの発現抑制が関与するものと考えているが、低濃度 DAC がどのように作用して WT1 の発現を抑制しているのかは、現時点では不明である。マイクロアレイ解析等の網羅的解析により、この、低濃度 DAC 処理時や 2

剤併用時に発現変動をきたす遺伝子やタンパク質を探索し，作用機序を明らかにすることは本研究で得られた知見をさらに発展させ，大腸がんに対する DAC とイリノテカンの併用療法における新たな標的分子発見に繋がる可能性があるため，今後の有用な研究課題であると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始，丁寧かつ熱心にご指導とご助言を賜りました岩手医科大学薬学部薬物代謝動態学講座 教授 小澤正吾 先生に深く感謝し，厚く御礼申し上げます。また，実験結果および研究方針等について多大なるご助言を賜りました，岩手医科大学薬学部臨床医化学講座 教授 那谷耕司 先生，機能生化学講座 教授 中西真弓先生，情報薬科学講座 教授 西谷直之 先生，薬物代謝動態学講座 准教授 幅野渉先生に深く感謝いたします。さらに，Bcl-2 family 抗体を供給してくださり，実験手技のご指導もいただきました腫瘍生物学部門 教授 前沢千早 先生，ならびに助教 安平進士先生に感謝申し上げます。そして，本研究の实地にあたりご協力とご支援をいただきました岩手医科大歯学部分子微生物学分野 講師 下山佑 先生，岩手医科大学薬学部薬物代謝動態学講座 助教 寺島潤 先生，岡田浩司 先生（現東北医科薬科大学薬学部病院薬剤学教室 講師），藤岡志保氏，伊藤恵莉佳氏に感謝いたします。

引用文献

1. Stewart BW and Wild CP (eds.), International Agency for Research on Cancer, WHO.
World Cancer Report 2014 [Online].
Available from: <http://www.thehealthwell.info/node/725845>
2. Media Centre (2017) Cancer fact sheet February 2017, World Health Organization, Switzerland.
3. 村上 優 : [新しい抗癌剤シリーズ] Topoisomerase 阻害剤 : 塩酸イリノテカン.
日本産科婦人科学会雑誌第 52 巻 12 号 : 432-437, 2000.
4. Rivory LP, Bowles MR, Robert J and Pond SM: Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol* 52: 1103-1111, 1996.
5. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H and Sato K: Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 51: 4187-4191, 1991.
6. Tanizawa A, Fujimori A, Fujimori Y and Pommier Y: Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 11: 836-842, 1994.

7. Hsiang YH, Lihou MG and Liu LF: Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I -DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptotecin. *Cancer Res* 49: 5077-5082, 1989.
8. te Poele RH and Joel SP: Schedule-dependent cytotoxicity of SN-38 in p53 wild-type and mutant colon adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 81: 1285-1293, 1999.
9. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S and Liu LF: Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260: 14873-1478, 1985.
10. Hsiang YH and Liu LF: Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48: 1722-1726, 1988.
11. Tsai HC and Baylin SB: Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 21: 502-517, 2011.
12. Ishiguro M, Iida S, Uetake H, Morita S, Makino H, Kato K, Takagi Y, Enomoto M and Sugihara K: Effect of combined therapy with low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine and irinotecan on colon cancer cell line HCT-15. *Ann Surg Oncol* 14: 1752-1762, 2006.
13. Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, Sato F, Meltzer

- SJ and Sidransky D: Pharmacologic unMasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 2: 485-495, 2002.
14. Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Polla nM, Herman JG and Esteller M: A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63: 1114-1121, 2003.
15. Gnyszka A, Jastrzebski Z and Flis S: DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* 33: 2989-96, 2013.
16. Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, Shin JJ, Harbom KM, Beaty R and Zahnow CA *et al*: Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer cell* 21: 430-436, 2012.
17. Wang B, Li H, Yang R, Zhou S and Zou S: Decitabine inhibits the cell growth of cholangiocarcinoma in cultured cell lines and mouse xenografts. *Oncol Lett* 8: 1919-1924, 2014.
18. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K and Iwakawa S: Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 37: 67-73, 2014.
19. Lou YF, Zou ZZ, Chen PJ, Huang GB, Li B, Zheng DQ, Yu XR and Luo XY:

- Combination of gefitinib and DNA methylation inhibitor decitabine exerts synergistic anti-cancer activity in colon cancer cells. *PLoS ONE* 29: e97719, 2014.
20. Gagnon JF, Bernard O, Villeneuve L, Têtu B and Guillemette C: Irinotecan inactivation is modulated by epigenetic silencing of UGT1A1 in colon cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1850-1858, 2006.
21. Sugimoto Y, Tsukahara S, Oh-hara T, Isoe T and Tsuruo T: Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody. *Cancer Res* 50: 6925-6930, 1990.
22. Goldwasser F, Bae I, Valenti M, Torres K and Pommier Y: Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res* 55: 2116-2121, 1995.
23. Tsujimoto Y: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3: 697-707, 1998.
24. Ola MS, Nawaz M and Ahsan H: Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351: 41-58, 2011.
25. Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y and Cossman J. bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer*

- Res 18: 4251-4256, 1993.
26. Dole M, Nuñez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA and Castle VP: Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 12: 3253-3259, 1994.
27. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H and Lewis WH, *et al*: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60: 509-520, 1990.
28. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM and Housman DE: Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9618-9622, 1991.
29. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ and Saunders GF: Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 55: 5386-5389, 1995.
30. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE and Baldwin AS: WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 18: 3990-4003, 1999.
31. Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, Nakano Y, Akahani S, Nakatsuka S, Koga S, Ikeba A, Abeno S and Sugiyama H, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 94: 523-529, 2003.

32. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, Miyake S, Tamaki H, Oji Y, Yamagami T, Tatekawa T, Soma T, Kishimoto T and Sugiyama H: Aberrant overexpression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89: 1405-1412, 1997.
33. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y and Sugiyama H, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 100: 297-33, 2002.
34. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S, Abeno S, Kiyotoh E, Jomgeow T, and Sugiyama H, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 94: 712-717, 2003.
35. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D and Sukumar S: Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 61: 921-925, 2001.
36. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, Abeno S, Ikeba A, Takashima S and Sugiyama H, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 95: 583-587, 2004.
37. Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H and

- Noguchi S: High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 8: 1167-1171, 2002.
38. Hakata S, Okada K, Terashima J, Gamou T, Habano W and Ozawa S: Strategic perspectives on improved anti-tumor drug effects in combination with clinically equivalent or lower concentrations of epigenetic modifiers, DNA methyltransferase inhibitors, and histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Sci Ther* 9: 540-544, 2017.
39. Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, Reade S and Jadayel D *et al.*: Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol* 25: 4603-4609, 2007.
40. Oki Y, Kondo Y, Yamamoto K, Ogura M, Kasai M, Kobayashi Y, Watanabe T, Uike N, Ohyashiki K and Okamoto S *et al.*: Phase I/II study of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome: a multi-center study in Japan. *Cancer Sci* 103: 1839-1847, 2012.
41. Chou TC: Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58: 621-681, 2006.
42. Chou TC: Drug combination studies and their synergy quantification using Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70: 440-446, 2010.

43. トポテシン[®]点滴静注（イリノテカン塩酸塩水和物注）インタビューフォーム：2016年11月改訂（第14版）
44. 伊藤 恵莉佳：5-Aza-2'-deoxycytidine 併用による irinotecan に対するヒト大腸がん細胞の感受性亢進と Bcl-2 発現抑制：岩手医科大学薬学部薬物代謝動態学講座，2015年度卒業論文.
45. Ohmori T, Podack ER, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H and Ohira T, *et al*: Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by BCL-2. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 30-36, 1993.
46. Palissot V, Belhoussine R, Carpentier Y, Sebille S, Morjani H, Manfait M and Dufer J: Resistance to apoptosis induced by topoisomerase I inhibitors in Multidrug-resistant HL60 leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 918-922, 1998.
47. Tatsumi N, Oji Y, Tsuji N, Tsuda A, Higashio M, Aoyagi S, Fukuda I, Ito K, Nakamura J and Sugiyama H, *et al*: Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *Int J Oncol* 32: 701-711, 2008.