

筑波大学

博士（医学）学位论文

Application to Breast cancer treatment
using transporter controlled by intracellular
Reactive Oxygen Species

(細胞内活性酸素が与えるトランスポーター制御を用いた
乳がん治療への応用)

2 0 2 0

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

寺崎 梓

目次

目次.....	3
序論.....	5
<u>第 1 章 本研究の背景.....</u>	<u>6</u>
はじめに	6
1.1 癌および乳癌の疫学.....	6
1.2 乳癌の標準治療.....	8
1.3 酸化ストレスと活性酸素	12
1.4 癌と活性酸素.....	16
1.5 インドメタシンと活性酸素.....	16
1.6 MDR および ABC トランスポーター.....	16
1.7 使用細胞株	17
<u>第 2 章 マウス乳癌細胞を用いたインドメタシンによる光線力学療法</u> <u>(PHOTODYNAMIC THERAPY ; PDT) の相乗効果の検討.....</u>	<u>19</u>
2.1 背景と目的	19
2.2 対象と方法	20
2.3 実験結果.....	23
2.4 考察	25
2.5 結論	26
<u>第 3 章 ヒト乳癌細胞を用いた温熱療法による抗癌剤の相乗効果の検討.....</u>	<u>32</u>
3.1 背景と目的	32
3.2 対象と方法	33
3.3 実験結果.....	35
3.4 考察	36
3.5 結論	38
<u>総括.....</u>	<u>44</u>

参考文献.....	45
謝辭.....	52
出典.....	53
参 考 論 文.....	54

序論

人をはじめとする全ての好気性生物は常に酸素無くして生きていくことはできない。生命維持に必要なエネルギーを得るために、ミトコンドリアで絶えず酸素を消費している。しかし、これらの酸素の一部は、代謝過程で活性酸素と呼ばれる反応性の高い状態に変換されることがある。このような活性分子種は極めて反応性に富み、生体内の構造や機能を破壊しうる。つまり、酸素は生命維持に必要であるにも関わらず、両刃の剣のごとく、時に自らをも傷つけることがある。このため、全ての好気性生物は、これらの活性酸素を消去する防衛機構を備えており、これをなくしては生存できない。したがって、生物進化の過程は、酸素の代謝利用の獲得と同時に、その毒性を消去する抗酸化機構も獲得してきた歴史でもあった。健康時には、これらの反応系が動的平衡状態にあり、調和の取れた生命現象を維持している。しかし、物理化学的または生物学的負荷がかかると、それらの平衡関係が崩れ、“酸化ストレス”が生じ、細胞障害のみならず、時には生体の死をも招く結果となる。特に抗がん治療における化学療法や放射線療法などによる生体への物理化学的負荷は、非常に大きな酸素毒性を生じる。そのため、正常細胞においては有害事象を減らす上でこれらをいかに軽減するかが、がん細胞においては、酸素毒性による治療効果を期待することが臨床上の重要な課題である。

我々の研究室では、このような細胞内活性酸素関連機構と抗がん治療への応用について長らく研究を重ねている。本稿では、本来は生体内に有害であり、不要とされる活性酸素を用いた抗がん治療への応用についての研究の詳細を記し、さらに今後の展望について述べる。

第1章 本研究の背景

はじめに

本研究では乳癌細胞株を用いて研究を行っているため、本章ではまず乳癌について概説し、さらに本研究のテーマである活性酸素についての概説を記載する。

1.1 癌および乳癌の疫学

1.1.1 世界における癌および乳癌の疫学

世界の癌患者数は年々増加傾向であり、2018年には1,810万人が罹患し、死亡者数は960万人であった。罹患内訳を臓器別で見ると、乳癌は女性全体の24.2%と非常に頻度が高く、全体では肺癌に次いで第2位であり

(16.1%)、死亡率も肺癌、大腸癌、胃癌、肝臓癌に次いで第5位である[1]。そして、罹患率死亡率ともに毎年増加傾向である[2]。

1.1.2 本邦における乳癌の疫学

本邦においても乳癌患者数は1960年代より徐々に増加しつつあり、1995年には胃癌を抜いて女性の悪性腫瘍の罹患率第一位となった。2019年の予測乳癌年間罹患数は全国で約92,200人であり(Fig.1)、2019年予測年間死亡者数は約15,100人と、女性の悪性腫瘍による死亡原因のうち、大腸癌、肺癌、膵癌、胃癌に続いて第5位である(Fig.2)[3]。年齢的には30歳代から増加傾向にあり、40歳代後半から50歳代前半でピークを認め、また最近では60歳代から80歳代にかけても増加傾向がある。乳癌の罹患数、死亡者数は年々増加傾向が認められ、「全国がん罹患数・死亡数・有病数将来推計値(2015年～2039年)」によれば、日本人女性の乳癌罹患率は増加傾向にあり、今後も増加の一途を辿ることが予想されている(Fig.3)[4]。

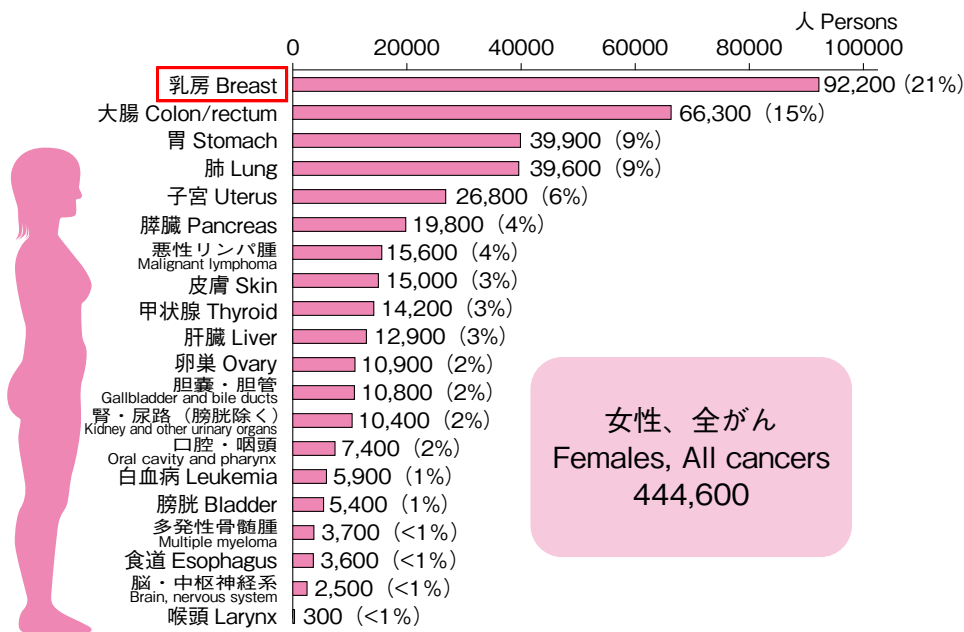


Fig.1. 部位別予測がん罹患数(2019年)

公益財団法人がん研究振興財団「がんの統計'19」より

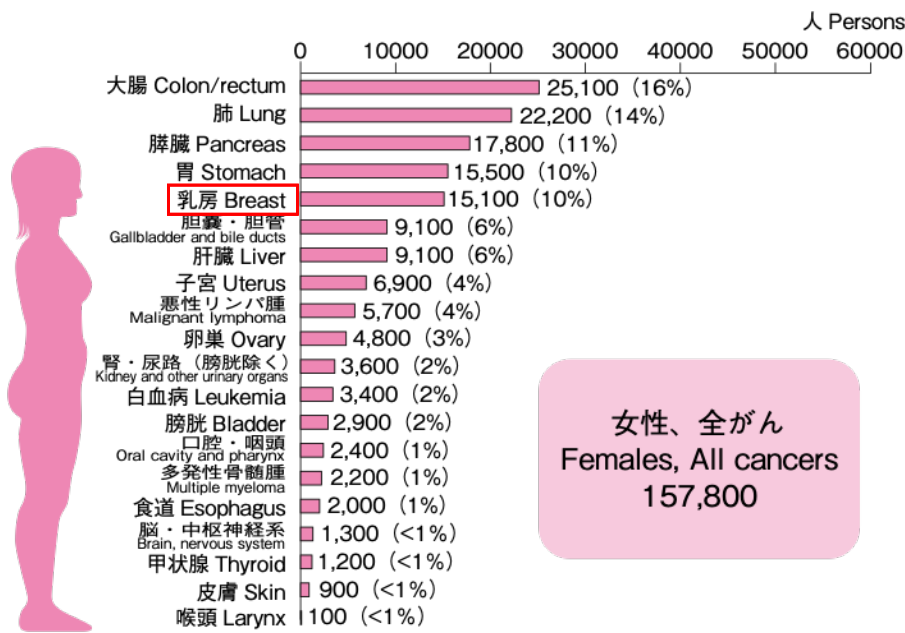


Fig.2. 部位別予測がん死亡数 (2019年)

公益財団法人がん研究振興財団「がんの統計'19」より

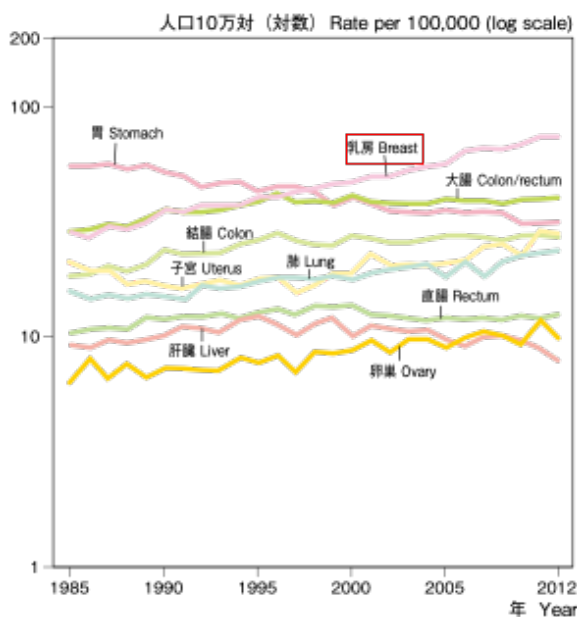


Fig.3. がん年齢調整罹患率年次推移（1985-2012年）

公益財団法人がん研究振興財団「がんの統計'19」より

1.2 乳癌の標準治療

乳癌の悪性腫瘍は上皮性悪性腫瘍が99%を占め、結合組織および非上皮性悪性腫瘍が1%を占める。乳癌のInternational Union Against Cancer(UICC)の臨床病期分類では、非浸潤癌の0期と、浸潤癌であり遠隔転移のないI～III期と、遠隔転移を有するIV期に分けられる。

1.2.1 原発性乳癌の標準治療

0期からIII期の原発性乳癌の治療は、根治を目的として手術と放射線治療による局所治療が行われ、必要な症例には術前や術後に化学療法も施行される。乳房手術には、乳房全切除術と乳房温存術があり、乳房温存術後には患側の乳房に対し、放射線治療を行う。また、臨床的にリンパ節転移陽性症例には腋窩リンパ節郭清術を行い、さらに腋窩リンパ節転移が4個以上の再発高リスク群には鎖骨上リンパ節領域への放射線治療が推奨されている。一方で臨床的にリンパ節転移陰性症例に対しては、センチネルリンパ節生検を行い、転移陰性と診断された場合は腋窩リンパ節郭清を省略することが標準治療である (Fig.4)[5]。

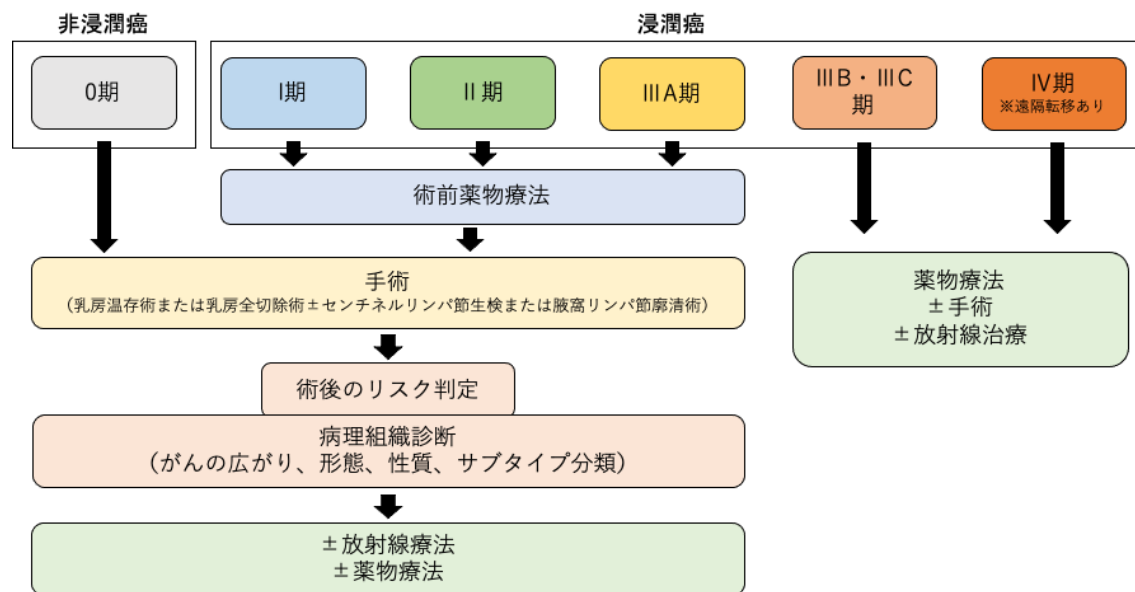


Fig.4. 原発性乳癌の標準治療

日本乳癌学会編「乳癌診療ガイドライン①治療編」(金原出版)より作成

1.2.2 転移再発乳癌の治療

乳癌は比較的予後良好な癌とされているが、*de novo* StageIV期や遠隔再発を来した症例では、治癒を望むことは困難であり、再発後の10年生存率は5%程度、根治に到ることは2~3%と稀である[6]。このような手術不能症例には、延命効果とQOLの改善を目的に、化学療法、ホルモン療法、分子標的療法といった薬物療法を主体とした全身療法行われるが、症状緩和に有用と考えられれば放射線療法や手術療法など、様々な治療法を組み合わせた集学的治療が行われる。

1.2.3 乳癌の薬物療法

乳癌の薬物療法にはエストロゲン受容体(ER)やプロゲステロン受容体(PgR)といったホルモン受容体の発現状況や、Human epidermal receptor type 2 (HER2)の発現状況を考慮した、サブタイプ別治療が行われる。基本的にはホルモン受容体とHER2の有無で分けられ、ホルモン受容体陽性乳癌を総じてルミナルタイプと呼び、全乳癌の60-70%を占める最も多い乳癌である。また、ルミナルタイプは細胞増殖マーカーのKi-67を参考に、増殖能力の低いルミナルAと、増殖能力の高いルミナルBに分けられる。その他、ホルモン受

容体陽性/HER2 陽性タイプ（ルミナル HER2 タイプ）、ホルモン受容体陰性/HER2 陽性タイプ（HER2 過剰タイプ）、ホルモン受容体陰性/HER2 陰性のトリプルネガティブタイプに分けられる（Fig.5）。ルミナルタイプにはホルモン療法が行われ、HER2 陽性であれば、抗 HER2 薬や化学療法を組み合わせた治療が行われる。トリプルネガティブタイプには化学療法が推奨される。[7]

手術不能または再発乳癌の治療については、Hortobagyi により提唱されて治療アルゴリズム(Fig.6)[8]を基本的な概念として、NCCN ガイドラインや乳癌診療ガイドラインに治療方針が提示されている。ホルモン受容体の発現状況や HER2 の発現状況、および生命を脅かす転移巣の有無で治療薬が決定される。ホルモン受容体陽性の場合には有害事象の少ないホルモン療法を先行し、ホルモン療法耐性になった場合や進行が早い場合などに化学療法が施行される。

HER2 陽性の場合には抗 HER2 薬を組み合わせた治療法が標準治療であり、HER2 陰性の場合には、様々な化学療法が用いられる。標準的な一次化学療法にはアンスラサイクリン系又はタキサン系抗悪性腫瘍薬を含む化学療法が施行され、二次化学療法としては、一次化学療法で使用されなかったアンスラサイクリン系又はタキサン系薬剤の使用が推奨されている[5]。

しかしホルモン療法、化学療法、分子標的薬をどの順番でどのように使うかについては、明確なエビデンスは少なく、臨床現場では主治医と患者間で相談し決定されることが多い。

	ホルモン受容体陽性		ホルモン受容体陰性	
増殖能力(Ki-67)	低い	高い	Triple negative	
HER2陰性	ホルモン受容体陽性 / HER2陰性			
	Luminal A	中間群		
HER2陽性	ホルモン受容体陽性 / HER2陽性 (Luminal HER2)		ホルモン受容体陰性 / HER2陽性 (HER2 過剰)	

Fig.5. 乳癌のサブタイプ分類

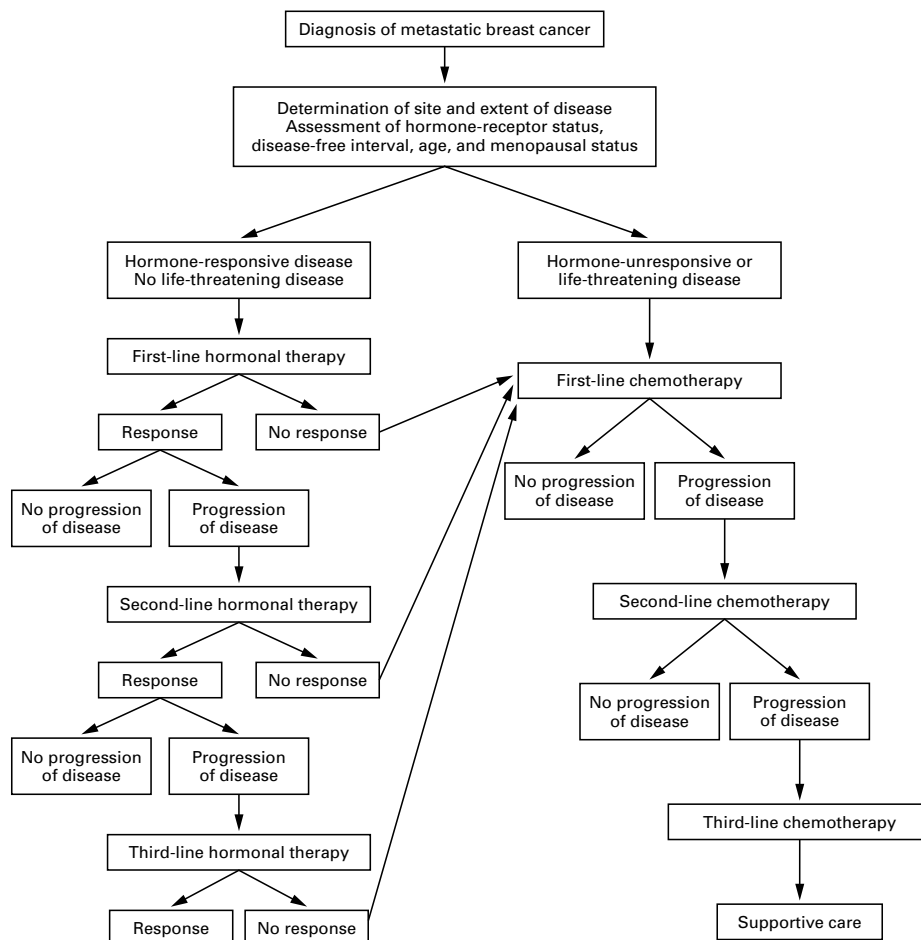


Fig.6. Hortobagyi 治療アルゴリズム

1.2.4 乳癌の集学的治療の今後

原発性乳癌の治療には手術療法、薬物療法（ホルモン療法、化学療法、分子標的薬）、放射線療法といった集学的治療が、転移再発乳癌には薬物療法を中心とした治療に、症状緩和目的に手術や放射線療法といった集学的治療が行われることもある。しかし、化学療法や分子標的薬は、有害事象や金銭的負担も多く、また放射線療法は、各臓器に照射できる線量に限度があるため、継続して続けられる治療ではない。転移再発乳癌では特に QOL の改善が目的であり、薬物療法による有害事象で QOL を損ねてしまうのは本末転倒であり、症状緩和目的の放射線照射も限度を超えた照射は推奨されない。

本研究では、このような臨床上の課題を打開すべく、がんの新たな集学的治療である光線力学療法や、温熱療法に注目し、これらを乳癌治療に応用していくための研究を行った。

1.3 酸化ストレスと活性酸素

1.3.1 酸化ストレス

酸化ストレスとは、生体内の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾き、生体にとっては好ましくない状態と定義され、酸化反応（電子の移動反応）を伴って生体に与えられる刺激やシグナルのことである[9]。生体にとって通常の酸化還元反応が乱されると、活性酸素やフリーラジカルが産生され、酸化ストレス状態となり、蛋白質、脂質、DNA が傷害される。酸化ストレスは、動脈硬化や発がん、ADHD、アルツハイマー病などをはじめとした様々な疾患を引き起こし、すべての疾患の約9割に関わるともいわれている（Fig. 7）。

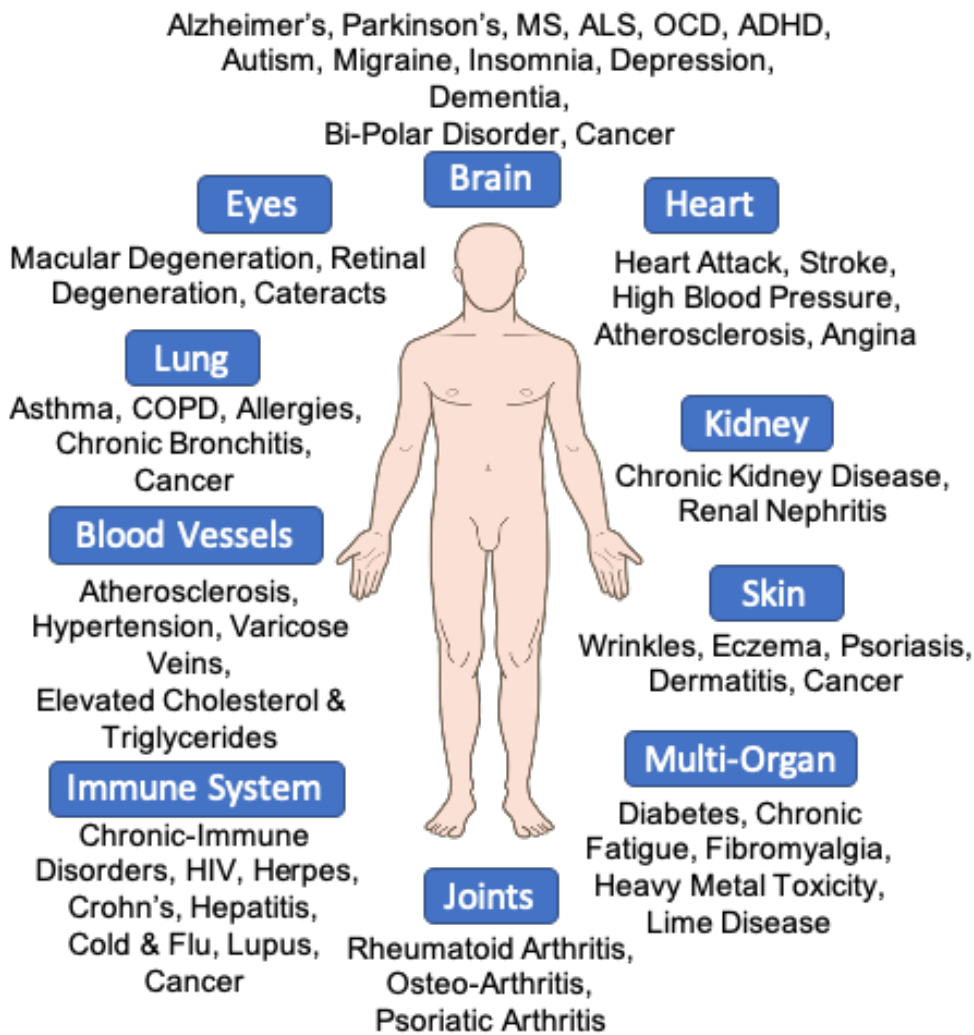


Fig.7. 酸化ストレスと疾患

1.3.3 活性酸素とフリーラジカル

活性酸素 (Reactive Oxygen Species) は、大気中に含まれる酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称である。一般的にスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot})、一重項酸素 (1O_2) の4種類が活性酸素種として定義されている (Fig.8) [10]。(広義には次亜塩素酸やNO、窒素酸化物や脂質過酸化を含む。)生物は酸素 (O_2) を生体内に取り込み、主にミトコンドリアに存在する電子伝達系により、ATPを産生し、生命活動に必要なエネルギーを得ている。この過程で O_2 は4電子還元され、 H_2O となるが、この時に漏れ出た電子が周囲の酸素分子と反応することで活性酸素種が産生される。つまり、酸素分子が部分的に還元されたものが活性酸素である[11]。

生体内においては、①各種オキシダーゼ (キサンチンオキシダーゼや好中球のNADPHを使うオキシダーゼ系) やリポキシゲナーゼなどの酵素によるもの、②細胞・顆粒での生成 (ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシゾーム、ミクロゾームなど)、③自動酸化による生成 (キノン系制癌剤、パラコートなど)、④環境因子による生成 (可視光・紫外線、フェオバイト、放射線、公害ガス、重金属など)、が活性酸素を発生させる[12]。また、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot}) などの不対電子を持つ物質をフリーラジカルと呼び、これらは不安定で高い反応性を持つ。これらが生体内で発生すると、脂質、タンパク質、核酸などの生体成分と反応して酸化する[9]。

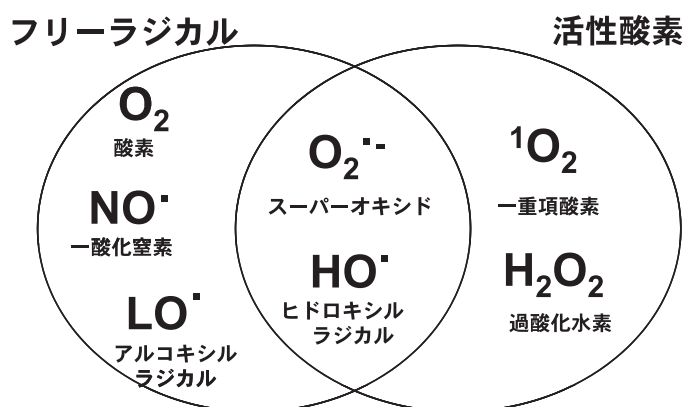


Fig. 8. 活性酸素とフリーラジカルの関係 (参考文献: 9 より引用)

1.3.4 ミトコンドリアとフリーラジカル

生体内におけるフリーラジカルの発生源はミトコンドリア電子伝達系である。ミトコンドリア基質で行われるクエン酸回路から NADH として回収した電子は、ミトコンドリア内膜と外膜に結合している電子伝達系複合体 Complex I : NADH ユビキノ還元酵素に受け渡され、内膜と外膜との間にある CoQ を経由して Complex III : ユビキノール-シトクロム c レダクターゼに受け渡される。その後シトクロム c から Complex IV : シトクロム c オキシダーゼにより $1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+$ に 2 個の電子が受け渡され、 H_2O となる。この過程で電子が漏れ出し、漏れ出した電子が O_2 を還元することでスーパーオキシドアニオンが生成される (Fig.9) [13-15]。

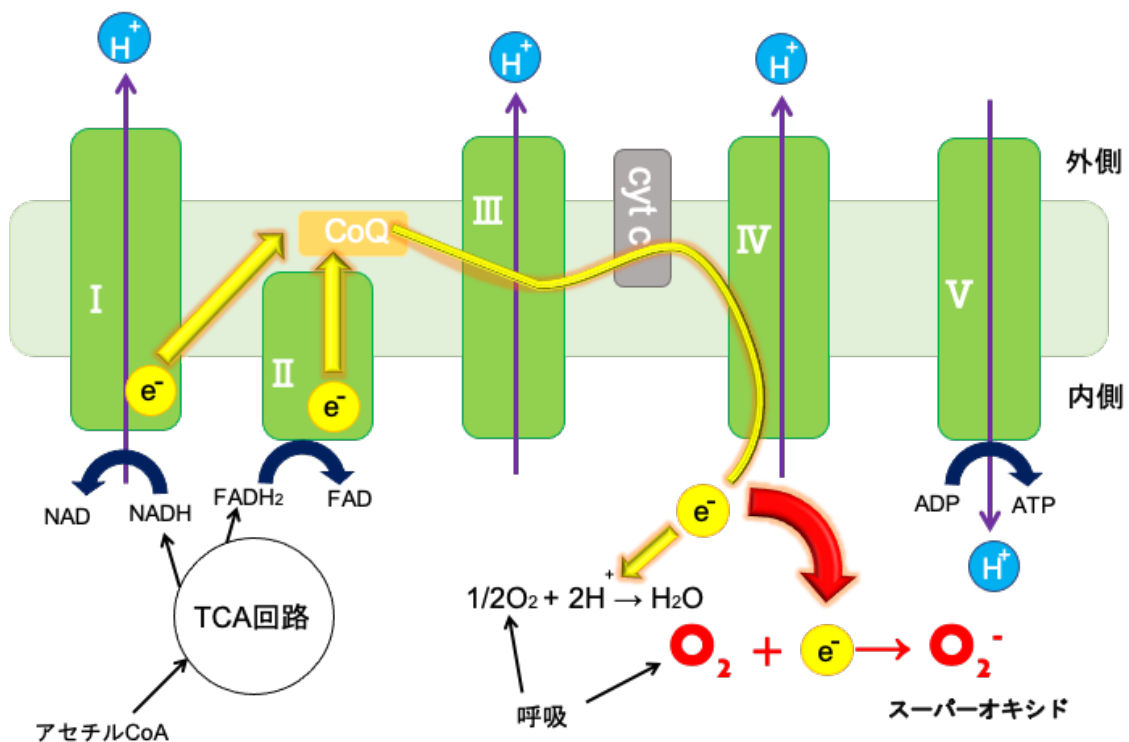


Fig. 9. ミトコンドリアでのフリーラジカルの発生

1.3.5 フリーラジカルの測定法

フリーラジカルの測定法で最も直接的なものは、電子スピン共鳴法 (electron spin resonance ; ESR) である。磁場の中にフリーラジカルがあると、そのエネルギー状態は低いエネルギー準位 (β スピン) と高いエネルギー準位 (α スピン) に分裂する (この現象をゼーマン効果という)。この状態に外から電磁波 (マイクロ波) を照射すると、低エネルギー準位の電子はマイクロ波のエネルギーと共鳴吸収し、高エネルギー準位に移行する。この時のマイクロ波の吸収が観察される。外部磁場中で、共鳴吸収されることで、減少したマイクロ波を

観測することを一般に磁気共鳴法というが、磁気共鳴法の中で電子スピンを測定する分光器を電子スピン共鳴 (ESR) という。ESR 法は、このマイクロ波の吸収を測定する物理化学的分析法である。ESR 法によって得られたスペクトルを解析することで、ラジカルや遷移金属などの物質中の電子スピン状態とその量を調べることができる [16]。

しかし、一般的に寿命の短いフリーラジカルを常温のまま検出することは困難である。そこで、フリーラジカルと特別な化合物であるスピントラップ剤と反応させて、寿命の長いラジカル種に変換させ測定する、スピントラッピング法が開発された。酸化ストレスの測定には、安定性の理由からニトロン系化合物 [5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO)、5-ジエチルホスホノ-5-メチル-1-ピロリン-N-オキシド (DEPM-PO)、 α -フェニル-N-tert-ブチルニトロン (PBN) 等] が多用される [17]。DMPO については、すでに多くのラジカル種に対して研究が行われ、超微細結合定数が求められており [18]、これらのデータを参照することで構造、すなわちもとのフリーラジカルの種類を推定できる [19]。反磁性の DMPO はヒドロキシルラジカルと反応し、比較的安定なニトロキシル基である常磁性 DMPO-OH を生成し [20] (Fig.10)、DMPO-OH は特徴的な 1:2:2:1 の 4 本線の ESR 信号を示すことが知られている (Fig.11) [21]。

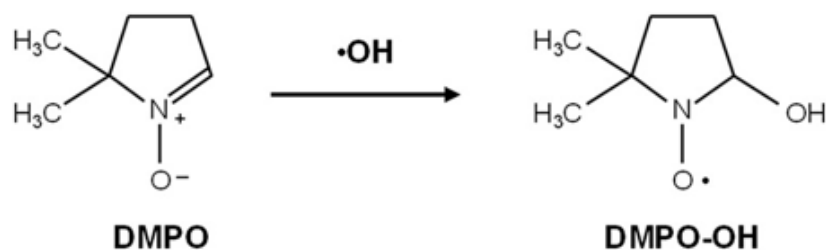


Fig.10. DMPO とヒドロキシルラジカルの反応 (参考文献: 17 より引用)



Fig.11. DMPO を用いたヒドロキシルラジカルの ESR スペクトラム (参考文献: 18 より引用)

1.4 癌と活性酸素

前述の通り、生体内の活性酸素の主力な産生源はミトコンドリアであるが、一般的に癌では、ミトコンドリア DNA 変異に伴う電子伝達系複合体の異常が生じているために、電子の漏出が多く、正常細胞と比べて、活性酸素を産生しやすい。さらに、外的環境変化によってさらに活性酸素が発生しやすい。また、癌には本来至適な活性酸素濃度があり、さらなる活性酸素の増加刺激に対しては、癌細胞は正常細胞と比べて傷害されやすい[22]。つまり、活性酸素を利用することにより、癌細胞だけを標的とした治療が可能となる。

1.5 インドメタシンと活性酸素

インドメタシンをはじめとする NSAIDs はミトコンドリアの電子伝達系複合体 Complex I を障害するといわれている[23]。これにより電子が漏出しやすく、漏出した電子は O_2 と反応し、活性酸素種の一つであるスーパーオキシドが発生する。

1.6 MDR および ABC トランスポーター

MDR (multi-drug resistance) は、化学構造や作用機序が異なる薬剤に対して、がん細胞が耐性を持つようになる現象である[24]。がん化学療法における MDR は、化学療法を長期間にわたり暴露された後に発症するが、これは薬物を細胞外に排泄するトランスポーターの過剰発現に起因すると考えられている[25]。がん細胞で MDR を産生する最も一般的なメカニズムの 1 つは、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターと呼ばれる、特異的な膜貫通型エネルギー依存性トランスポーターファミリーの過剰発現である。ABC トランスポーターファミリーは、ヒトゲノムにコードされている最も豊富な膜貫通タンパク質ファミリーであり[26]、ABC-A から G までの 7 つのサブファミリーに分けられ、その構造の類似性や違いによってさらにサブファミリーに細分化されている[27]。ABCG2 トランスポーターは、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 で初めて発見され、ドキソルビシン (DOX) に対して耐性を持つようになった。そのため、乳がん耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein ; BCRP) としても知られている[28]。ABCG2 トランスポーターは、乳がん、大腸がん、胃がん、小細胞肺癌、卵巣がん、腸がん、メラノーマなど、さまざまな種類のがんにおける MDR のモジュレーターである[29]。ABC トランスポーターは、がん細胞からの薬剤の流出を増加させ、化学療法薬の細胞内蓄積を減少させる。これが薬剤耐性のメカニズムである (Fig.12) [30]。このような薬剤耐性の原因とな

る ABC トランスポーターの過剰発現を改善することが、薬剤耐性を打開する上で非常に重要である。

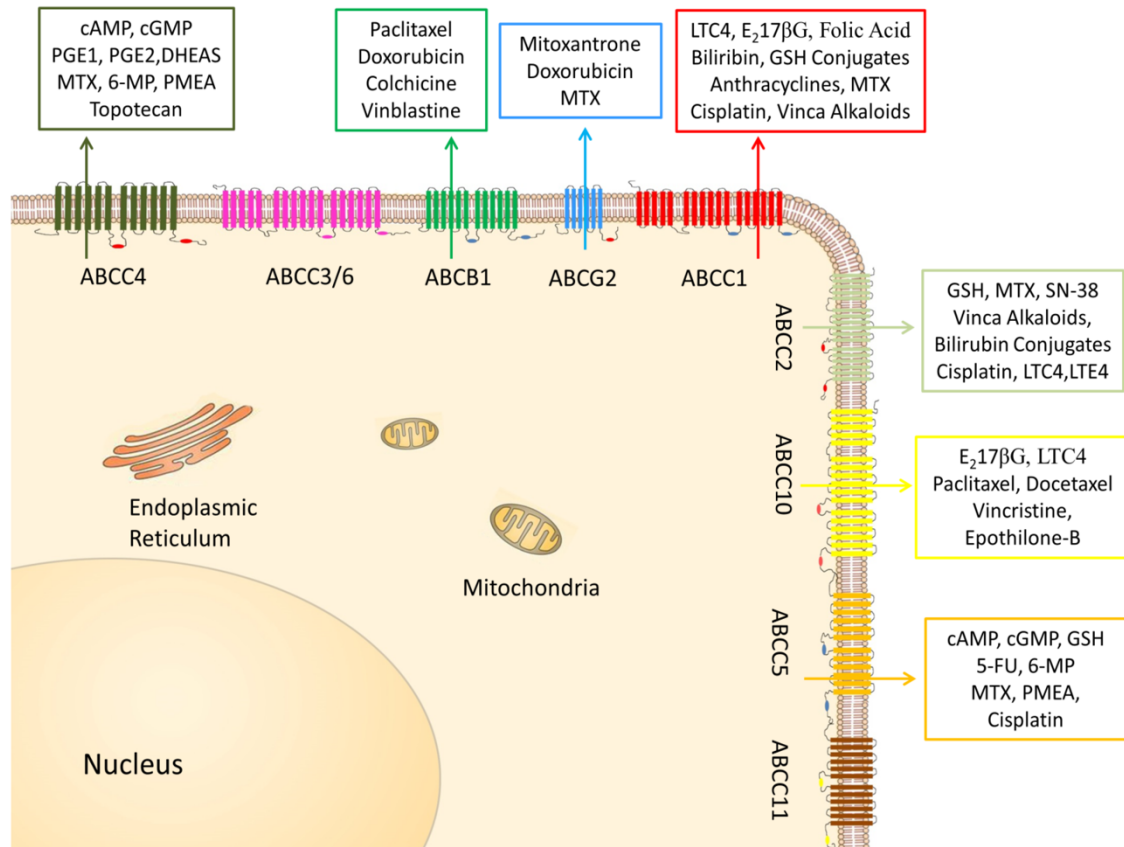


Fig.12. ABC トランスポーターの代表的基質薬剤 (参考文献 30 : 2 より引用)

1.7 使用細胞株

本研究で使用した細胞株について記載する。

1.7.1 マウス乳癌細胞株 4T1E

4T1E 細胞は、BALB/c 由来の自然発生マウス乳腺癌細胞株である 4T1 細胞に、ネオマイシン耐性遺伝子を導入し、in vivo でのセレクションによって樹立された細胞株である [31-33]。

1.7.2 高骨髄転移性マウス乳癌細胞株 4T1E/M3

4T1E 細胞を、BALB/c マウスに静脈内注射し、骨髄から採取し、in vivo で培養するプロトコルを 3 回繰り返すことにより確立された細胞株である [31]。

1.7.3 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453

1976年に48歳女性の乳癌患者の胸水から確立された細胞株であり、エストロゲン受容体（ER）陰性、HER2陽性である[34,35]。

1.7.4 ヒト乳癌細胞株 MCF-7

1970年に放射線療法およびホルモン療法後の転移性乳癌を伴う69歳の白人女性の胸水から確立された細胞株であり、エストロゲン受容体（ER）陽性、HER2陰性である[36,37]。

第 2 章 マウス乳癌細胞を用いたインドメタシンによる光線力学療法 (photodynamic therapy ; PDT) の相乗効果の検討

本章ではインドメタシンによる ROS 産生を利用した光線力学療法 (photodynamic therapy ; PDT) の増強効果について、2 種類のマウスの乳癌細胞を用いて検討した結果について記載する。

2.1 背景と目的

第 1 章でも述べたように、乳癌は世界で最も一般的な癌種であり、罹患率死亡率ともに毎年増加傾向である [1]。乳癌は比較的予後良好とされているが、中には容易にリンパ節や骨、肺や肝臓といった多臓器への転移を来す症例もある [2,3]。遠隔転移を来した症例は、その症状により QOL を阻害する可能性がある [4]。このため、延命効果と QOL の改善を目的に、ホルモン療法や化学療法、分子標的薬療法といった、薬物を主体とした全身療法が行われるが、これらは時に副作用や有害事象により QOL を阻害し、さらには生命を脅かす事態となることもある。乳癌ではしばし骨転移がみられるが、骨転移の治療には、ホルモン療法や化学療法の他に、放射線療法、破骨細胞性骨吸収を抑制するビスフォスフォネートに製剤などが用いられる。ビスフォスフォネート製剤は消化器症状や腎障害、顎骨壊死の原因となる [5]。したがって骨転移の治療には、より副作用の少ない有効な治療薬が必要とされている。

光線力学療法 (PDT) は癌特異的な集積性を示す光感受性物質とレーザー光照射による光化学反応を利用した局所的治療法である [6,7]。PDT は、手術や放射線を必要としないため、侵襲性を最小限に抑えた代替の癌治療として、消化器内視鏡を用いて主に消化管悪性腫瘍の治療に用いられることが多い。PDT は癌細胞に取り込まれた光増感剤に適切な波長のレーザーを照射するだけで、ROS を産生し、それによる腫瘍細胞死を誘発する。5-アミノレブリン酸 (5-ALA) はプロドラッグで、細胞内で光増感剤であるプロトポルフィリンIX (PpIX) に変換される。5-ALA は、悪性神経膠腫の蛍光ガイド下切除や、表在性膀胱癌への PDT など用いられている [8-10]。5-ALA は、ペプチドトランスポーター 1 (PEPT1) を介して細胞内に取り込まれるが、我々は以前に PEPT1 の発現が、細胞内のミトコンドリアにより産生された ROS (mitROS) により調節されることを報告している [11,12]。

第1章でも述べたが、ROSはミトコンドリアの電子伝達系(ETC)の副産物として、またNADPHオキシダーゼなどによっても生成される[13]。ROSの過剰生成は細胞に酸化ストレスを与え、発癌、心血管疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経系疾患、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患などのさまざまな種類の疾患に関連する[14]。さらに、癌細胞のミトコンドリア変異によるETCからの電子漏出はROSの発生を増加させ、癌の転移と浸潤の悪性度に関連している[15、16]。対照的に、ROSの増加は細胞内のシグナル伝達と代謝経路も活性化する。また、我々は以前に、ポルフィリン化合物がヘムキャリアプロテイン1(HCP1)を介して癌細胞に取り込まれ、非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシン(IND)がmitROSの産生とHCP1の発現を増加させ、PDTの効果をもつことを報告した[17-19]。本研究では、PDTが新たな乳癌の集学的治療の一つとして期待すべく、転移性レベルの異なる2種類のマウス乳癌細胞にINDを暴露させ、これらの細胞株のROS生成と5-ALAの取り込み、PpIXの蓄積、およびレーザー照射によるPDT効果を検討した。

2.2 対象と方法

2.2.1 実験細胞株

高骨髄転移性マウス乳癌細胞である4T1E/M3とその親株であるマウス乳癌細胞株4T1Eを使用した。細胞株は岡田博士(岡田知子: Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST))から提供され[30,31]、2 mM L-グルタミン、1.5 g/L 重炭酸ナトリウム、4.5 g/L グルコース、10 mM HEPES、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)および10%ウシ胎児血清(Equitech-Bio Inc., Kerrville, TX)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific, Inc.)を添加したRPMI 1640培地(Thermo Fisher Scientific, Inc.)で、37°C、5%CO₂下で培養した。

2.2.2 RIラベルした5-ALAの取り込みアッセイ

IND暴露後の4T1Eおよび4T1E/M3細胞内の5-ALA取り込みを、プレートリーダーを用いて測定した。6wellの細胞培養プレートに上記細胞をそれぞれ1×10⁵個/wellで播種し、一晩培養した。細胞をそれぞれ1%DMSOで溶解された20 μMのIND(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)溶解液に24時間暴露させ、その後PBSで洗浄した。次に、¹⁴Cの放射性同位体

でラベルした 5-ALA 塩酸塩 (American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO) 溶液 $20\ \mu\text{M}$ に、細胞を 6 時間培養した。その後 PBS で 3 回洗浄し、RIPA 緩衝液を細胞溶解のために添加し、溶解液を、液体シンチレーション液 (Pico-Fluor40) を含むバイアルに集めた後、液体シンチレーションカウンター (LSC-7200, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Japan) を用いて放射線量を測定した。

2.2.3 細胞内 PpIX 蛍光量の測定

IND および 5-ALA 暴露後の細胞内 PpIX 蓄積は、PpIX 蛍光の検出によって測定された。4T1E および 4T1E/M3 を 12well 細胞培養プレートに 1×10^5 個/well で播種し、一晩培養した。細胞をそれぞれ $20\ \mu\text{M}$ の IND で 24 時間暴露し、PBS で 2 回洗浄した。その後 $1\ \text{mM}$ 5-ALA 塩酸塩 (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) 溶液を添加し、6 時間培養した。その後、細胞を RIPA 緩衝液に溶解し、Varioskan マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、細胞溶解液の蛍光強度を測定した。波長は 410nm で励起し、 $635\ \text{nm}$ の蛍光波長を測定した。

2.2.4 ESR による細胞内活性酸素測定

IND 暴露後の 4T1E と 4T1E/M3 の細胞内 ROS の測定は、ESR を用いて測定した。それぞれの細胞をスライドガラス ($49\ \text{mm} \times 5\ \text{mm} \times 0.2\ \text{mm}$) 上に播種し、一晩培養した後、 $20\ \mu\text{M}$ の IND を 24 時間暴露した。そのスライドガラスを ESR 測定用組織ガラス (Radical Research Inc., Tokyo, Japan) へ載せ、ESR 測定用溶液 ($5\ \text{mM}$ succinic acid, $5\ \text{mM}$ malic acid, $5\ \text{mM}$ D-glutamic acid, and $5\ \text{mM}$ NADH, $5.9\ \%$ v/v DMPO) $80\ \mu\text{l}$ を組織ガラスに添加し、JEOL-TE X-band spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は 10mW incident microwave power、 0.1mT modulation width、 8min sweep time、 7.5mT sweep width、 0.1s time contrast、 333.5mT center field、 15mT scan range とした。測定データの解析は Win-Rad Radical Analyzer System (Radical Research) を用いた。

2.2.5 Western blotting による PEPT1 と ABCG2 の発現測定

IND 暴露後の PEPT1、ABCG2 トランスポーターのタンパク発現は Western blotting で解析した。4T1E および 4T1E/M3 に $20\ \mu\text{M}$ の IND を 24 時間暴露したディッシュを PBS で 3 回洗浄し、氷上でプロテアーゼ阻害剤カクテル (Thermo Fisher Scientific) を含む RIPA バッファーを添加し、高速冷却遠心機で 10 分間遠心した後、上清を破棄し、細胞溶解液を作成した。NuPAGE

LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で細胞溶解液を調整し、各サンプルを 95°C で 5 分間加熱後、10 μ L ずつ NuPAGE 12%Bis-Tris Protein Gel (Thermo Fisher Scientific, Inc.) のウェルに充填した。ゲルを 200 V で 30 分電気泳動し、タンパク質を 2.0 mA/cm² で 60 分間電気泳動することによりポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA) に転写した。PVDF 膜を Can Get Signal 製のブロッキング試薬 (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) に 25°C、60 分間浸してブロッキングを行い、抗 PEPT1 抗体 (Bioss Antibodies Inc., Woburn) または抗 ABCG2 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO CO., LTD.) で 1 : 1000 に希釈した一次抗体溶液にメンブレンを浸し、4°C で一晩反応させた。その後、メンブレンを 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich Co.) を含む PBS (PBS-T) で 10 分間 3 回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ IgG 二次抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO CO., LTD.) で 1:1000 に希釈した二次抗体溶液にメンブレンを浸し、25°C 60 分間反応させた。その後メンブレンを PBS-T で 10 分間 3 回洗浄し、Lumina Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) に浸し、Image Quant LAS 4000 (GE Health Care Japan, Tokyo, Japan) を用いて発光を測定した。サンプルローディングコントロールとして、抗アクチン抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) を用いて、 β アクチンをコントロールとして測定した。

2.2.6 PDT 後の細胞毒性試験

PDT を行った後の細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて評価した。4T1E および 4T1E/M3 を 96well プレートに 2×10^3 個/well で播種し、一晩培養した。細胞を 20 μ M の IND で 24 時間暴露後、1mM 5-ALA 塩酸塩を暴露し、24 時間培養した。培地をフェノールレッドを含まない培地に置換した後、EDL-1 レーザーダイオードドライバ (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) を使用して、細胞にエキシマレーザー光 (630 nm, 0.5 J cm²) を照射した。照射後、細胞を 24 時間培養し、培地を 10% CCK-8 試薬を含む培地に置換し、さらに 1 時間培養した。DTX880 マルチモードマイクロプレートリーダー (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) を用いて、450 nm での吸光度を測定した。

2.2.7 統計解析

本実験の統計処理は SPSS (International Business Machines Corporation, Armonk, NY) を用いた。2 群間以上の検定には Scheffe's test を、2 群間の検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ を統計的に有意な差とした。すべてのデータは平均±標準偏差で示した。

2.3 実験結果

2.3.1 各種細胞株における IND 暴露後の 5-ALA の取り込み比較

4T1E および 4T1E/M3 の細胞内の 5-ALA の取り込みを、 ^{14}C の放射性同位体でラベルした 5-ALA を用いて、IND 暴露群と DMSO コントロール群で比較した。

通常のマウス乳癌細胞株である 4T1E と比較し、高骨髄転移性株である 4T1E/M3 の放射線数は高値を示した (Fig.1)。さらに、IND 暴露により、双方の細胞株の放射線数がさらに増加した。ただし、4T1E/M3 の放射線数は、IND 暴露前後の 4T1E の放射線数よりも高値であった。これらの結果は、4T1E より 4T1E/M3 の方が 5-ALA を細胞内に取り込みやすく、IND 暴露が 4T1E/M3 の 5-ALA の細胞内取り込みを大幅に増強したことを示している。

2.3.2 細胞内の PpIX 蓄積の検出

細胞内の PpIX 蓄積の検出結果を Fig.2 に示す。IND 暴露群と DMSO コントロール群で、5-ALA 暴露後の細胞溶解物から測定された PpIX 蛍光強度を測定した。4T1E/M3 細胞溶解液の PpIX 蛍光強度は、DMSO コントロールの 4T1E 細胞溶解液よりもはるかに高値を示した。さらに、IND 暴露により 4T1E/M3 の蛍光強度が大幅に向上した (19.94%増加)。これとは対照的に、4T1E の蛍光強度は、IND 暴露後でも有意な増加を示さなかった。これらの結果は、5-ALA から生成された PpIX は高骨髄転移性株である 4T1E/M3 に蓄積する傾向があり、IND 暴露がこの細胞株における PpIX 蓄積を増加させたことを示唆している。

2.3.3 高骨髄転移性マウス乳癌細胞株 4T1E/M3 における ROS 産生の上昇

生細胞における ROS 産生量は、ESR によって測定した。4T1E および 4T1E/M3 の IND 暴露群、または DMSO コントロール群の ESR スペクトルを Fig.3 (a) に示し、シグナル対ノイズのピーク強度の比を Fig.3 (b) に示す。Fig.3 (a) に示すように、4T1E/M3 のピークシグナルは IND 暴露により明らかに増強された。IND 暴露群では、DMSO コントロール群と比較して 4T1E でわずかな増加のみが観察された。また、IND 暴露後の 4T1E/M3 ではシグナル対ノイズのピーク強度の比が大幅に増加したが、4T1E では増加しなかった。

(Fig.3 (b))。さらに 4T1E/M3 では 4T1E よりも、IND 暴露群、DMSO コントロール群ともに高レベルの ROS が測定された。これらの結果は、高骨髄転移性株である 4T1E/M3 細胞が積極的に ROS を産生し、IND 暴露およびその後の ROS の産生に対してより高い感受性を有することを示した。

2.3.4 トランスポーター発現の変化

5-ALA 取り込みタンパクである PEPT1 と細胞内 PpIX 排泄タンパクである ABCG2 のタンパクの発現を Western blotting で解析した。4T1E では、IND 暴露後の PEPT1 発現は変化しなかった (Fig.4 (a))。一方で、ABCG2 の発現は、IND 暴露により有意にはないものの、減少傾向であった (Fig.4

(b))。これに対し、4T1E/M3 では、IND 暴露での PEPT1 タンパク発現を有意に増加させた。ABCG2 発現においては、元の発現が非常に弱く、IND 暴露後でもほとんど変化しなかった。これらの結果は、IND 暴露後の 4T1E/M3 は、5-ALA が取り込まれ易く、PpIX が排泄されにくいことを示している。

2.3.5 高骨髄転移性マウス乳癌細胞株 4T1E/M3 における PDT 効果の増強

5-ALA および IND 併用による PDT の相乗効果を 4T1E および 4T1E/M3 で分析した。Fig.5 に 5-ALA および IND の単独または併用による PDT 後の細胞生存率を示す。4T1E において、5-ALA および IND 暴露後の細胞生存率は、コントロール群と比較し有意に減少した。しかし、5-ALA および IND 単独群では、細胞生存率に減少傾向は見られるものの、有意差は認めなかった。

4T1E/M3 においても、5-ALA および IND 暴露後の細胞生存率は、コントロール群と比べて有意に減少した。さらに 5-ALA 単独群、5-ALA 単独群と IND 単独群間においても有意に減少した。さらに双方の細胞株で、IND 単独群ではコントロールと比較し、有意差は認めなかった。これらの結果は、高骨髄転移性株である 4T1E/M3 が PDT に感受性が高く、IND の追加暴露が PDT 効果をさらに高め、生存率の低下に寄与したことを示している。しかしながら、IND 単独では 4T1E と 4T1E/M3 双方の生存率に影響を与えなかった。

以上の結果から、IND は 4T1E/M3 の ROS 産生を誘導し、続いて 5-ALA のインポーターとして機能する PEPT1 の発現を上昇させた。このタンパク発現の変化は、PpIX の細胞蓄積と関連していると考えられる。PpIX の排泄は ABCG2 によって行われる。IND 暴露は ABCG2 の発現を低下させる傾向にあったが、4T1E/M3 においては ABCG2 の発現はもともと低かった。そのため PpIX は 4T1E/M3 により蓄積したと考えられ、これにより PDT 効果を加速させ、細胞生存率を低下させたと考えられる。

2.4 考察

本研究では、転移性の異なる 2 種類の乳癌細胞株を用いて、PDT 後の細胞内 5-ALA 取り込み、PpIX 産生、細胞生存率を解析し、ROS 感受性の観点から 5-ALA 取り込みおよびポルフィリン排泄タンパクの発現レベルを評価した。癌細胞は ROS を活性化し、ROS の影響を受けるシグナル伝達経路は転移性と関連している。本研究で使用した高骨髄転移性乳癌細胞株は、非転移性細胞株よりも高い ROS の発生を示した (Fig.3)。興味深いことに、細胞のミトコンドリアにダメージを与えて ROS の発生を誘導する IND を投与すると、高骨髄転移性乳癌細胞ではさらに ROS レベルが上昇した。これは、4T1E/M3 における酸化ストレスに対する生体防御機構の崩壊を示唆していると考えられる。Liou と Storz は、上昇した ROS レベルが多くの癌で検出され、腫瘍細胞もまた抗酸化タンパク発現レベルの上昇と関連していることを報告した[20]。Birben らは、酸化ストレスは、活性化された NF- κ B のレベルの増加に起因しており、これがその後の抗酸化防御の活性化につながることを報告した[21]。癌細胞における ROS のさらなる産生は、抗酸化タンパク質の発現を誘導する可能性があり、ROS のさらなる漏出は、本研究で観察された PEPT1 発現のような他のシグナルの伝達に関連している可能性がある (Fig.4(a))。PEPT1 の発現上昇の結果として、細胞内の 5-ALA の取り込みが増加し (Fig.1)、一方で 5-ALA から生合成されたポルフィリンは ABCG2 を介して排泄され、その発現も ROS によって制御されている [22, 23]。ROS の少ない 4T1E でも、4T1E/M3 に比べて ABCG2 の発現が亢進しており、IND を暴露すると 4T1E では発現が低下した (Fig.4(b))。ABCG2 の発現はもともと 4T1E/M3 では低く、IND による発現変化は生じにくいと考えられた。また、ABCG2 は乳癌耐性タンパク質として同定されており、乳癌における薬剤耐性の原因となることが知られている [24, 25]。本研究では、高骨髄転移性乳癌細胞における ABCG2 の発現は、非転移性乳癌細胞における発現よりもはるかに低かった (Fig.4(b))。

前述したように、ROS 産生を介したシグナル伝達経路の活性化は、トランスポーターの調節と関連している可能性が高く、その後、4T1E/M3 優位な 5-ALA の取り込みの増加と PpIX 排泄の抑制が続いた (Fig.1, 2)。さらに、ヘム生合成経路における酵素活性が、4T1E/M3 細胞における PpIX 蓄積の亢進に影響を及ぼす可能性がある。山本らは、細胞内一酸化窒素 (NO) が PpIX をヘムに変換する ferrochelatase を減少させ、これが細胞内のポルフィリン蓄積をもたらすことを報告している [26]。酸化ストレスに伴う NO 合成酵素の誘導は NO を発生させるため、IND の投与も NO 産生を上昇させる可能性がある [27]。さらに、ミトコンドリア由来のスーパーオキシドは NO と反応して活性

窒素種 (RNS) であるペルオキシナイトライトを生成する[28]。これらの NO や NO 由来の RNS は、ferrochelatase の鉄・硫黄クラスターを破壊し、酵素の活性を失活させる[29]。また、RNS は他のシグナルの伝達を仲介する可能性もある。このように、ROS を介してヘム合成に関与する酵素の活性が変化することで、細胞内ポルフィリン蓄積が増加し、PDT 効果が高まる可能性がある (Fig.2, 5)。

2.5 結論

高骨髄転移性乳癌細胞株 4T1E/M3 に IND を暴露すると、細胞内の ROS が増加し、その後 PEPT1 の発現、5-ALA の取り込み、PpIX の蓄積が増加し、PDT 効果が増強された (Fig.6)。以上より、PDT は高い浸潤性のある転移性乳癌の、副作用の少ない有効な治療法として期待される。今後ヒトでの有効性を確認するためには、in vivo モデルを用いた更なる研究が必要である。

Fig.1.

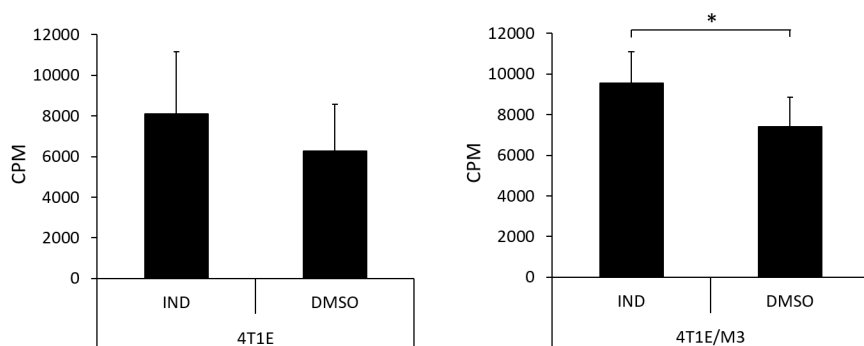


Fig. 1. Cellular 5-ALA incorporation in 4T1E and 4T1E/M3 cells treated with IND or DMSO were estimated using ^{14}C labeled 5-ALA. Statistical significance was tested by Student's *t*-test. $n = 6$, Error bar; S.D. $*p < 0.05$

Fig.2.

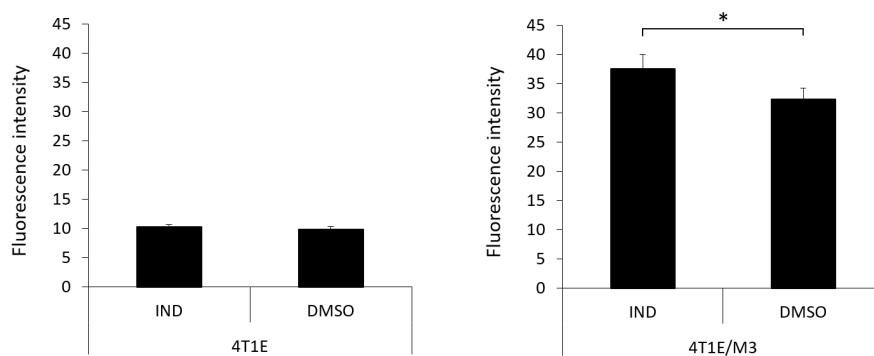
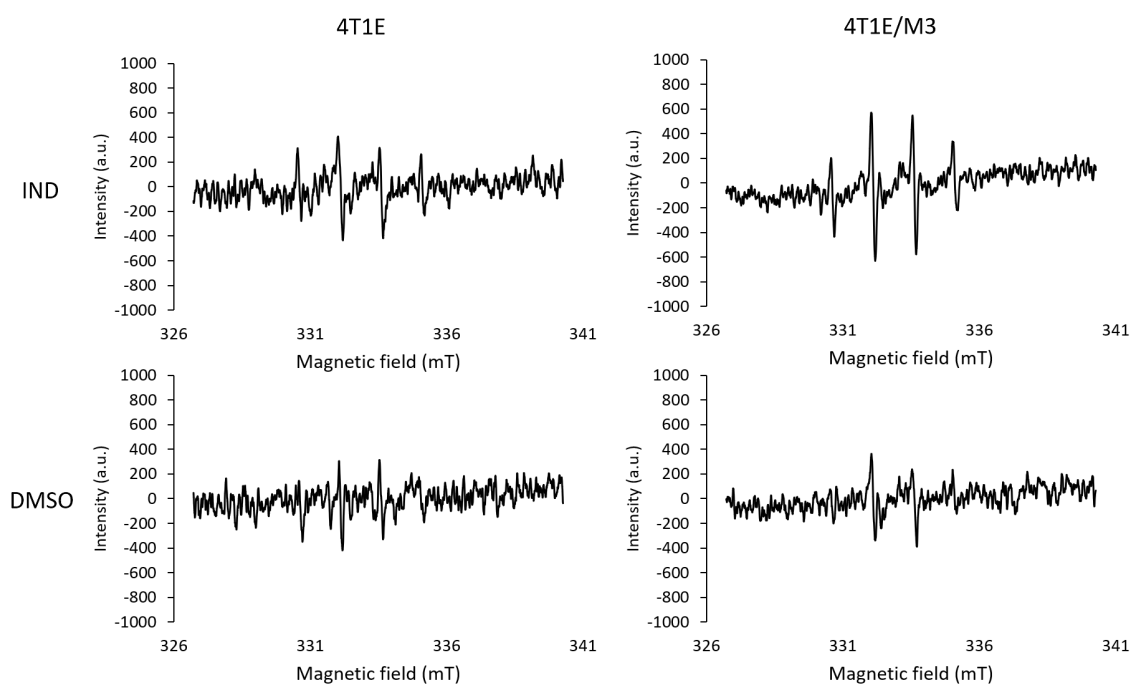
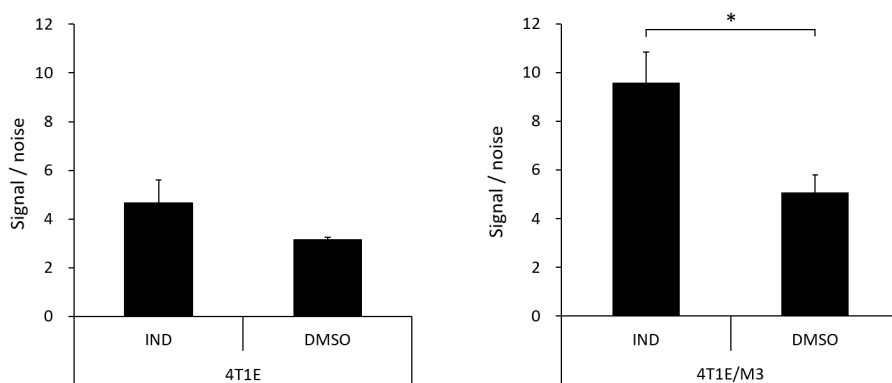


Fig. 2. Porphyrin fluorescence in cells after 5-ALA treatment and IND or DMSO pre-treatment were measured. The measurement wavelengths of excitation and emission were 410 nm and 635 nm, respectively. Statistical significance was tested by Student's *t*-test. $n = 6$, Error bar; S.D. $*p < 0.01$

Fig.3.



(a)



(b)

Fig. 3. ROS production levels were measured by ESR. (a) Representative ESR signal waves were shown. (b) Signal/noise ratio was represented in graphs. Statistical significance was tested by Student's *t*-test. $n = 3$, Error bar; S.D. * $p < 0.01$

Fig.4.

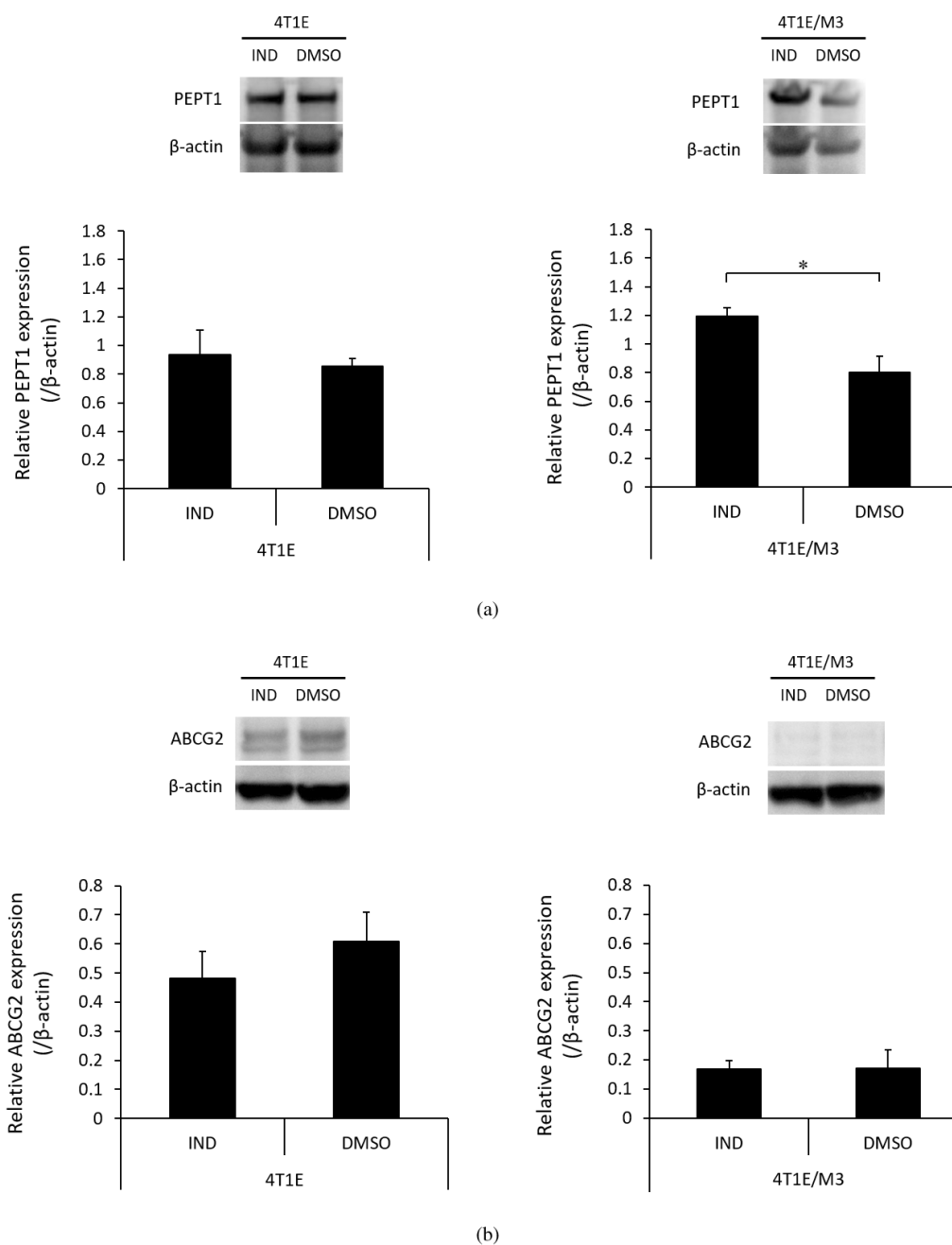


Fig. 4. Protein expression transitions after treatment with IND or DMSO were analyzed by western blotting. (a) The expression levels of PEPT1 (a) and ABCG2 (b) were shown. Statistical significance was tested by Student's *t*-test. *n* = 3, Error bar; S.D. **p* < 0.01

Fig.5.

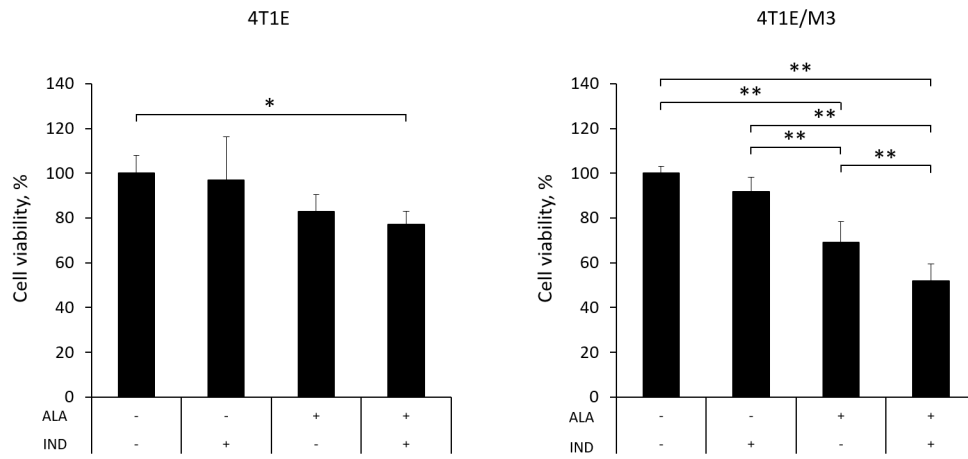


Fig. 5. Cells were treated with or without IND and cell viabilities after 5-ALA treatment and laser irradiation were measured by CCK-8 method. Statistical significance was tested by Scheffe's test. $n = 6$, Error bar; S.D. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

Fig.6.

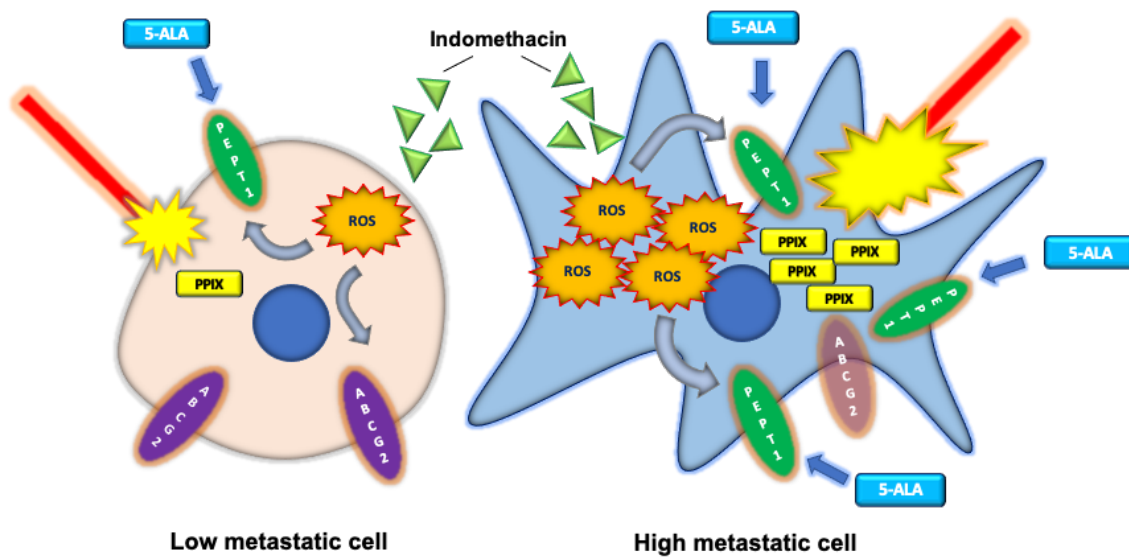


Fig.6. Exposure of IND to the highly metastatic breast cancer cell line 4T1E/M3 enhanced intracellular ROS and subsequently upregulated the PEPT1 expression, 5-ALA incorporation, and PpIX accumulation, enhancing the PDT effect.

第3章 ヒト乳癌細胞を用いた温熱療法による抗癌剤の相乗効果の検討

第2章ではインドメタシンによる ROS 産生を利用した光線力学療法 (PDT) の増強効果について記載した。本章では第2章からの継続研究として、ヒト乳癌細胞を用いて、温熱療法による ROS の産生とドキソルビシン (DOX) の相乗効果について検討した結果について記載する。

3.1 背景と目的

温熱療法 (Hyperthermia : HT) とは、腫瘍の病巣部を 41°C 以上に加温することにより、がん治療に役立たせようとするものである [1]。HT は非侵襲的ながんの治療法であり、化学療法や放射線療法との併用により相乗効果が期待される治療法である。腫瘍の温度を 40~42°C に加温することにより、腫瘍内の血流を増加させ、腫瘍細胞の低酸素環境を改善することで、放射線感受性を高めたり、腫瘍への薬剤の取り込みを増加させ、抗癌剤に対する感受性を高めるなど効果があるといわれている [1-4]。また、近年では HT の効果に自己免疫が重要な働きを示すことや、HT が免疫療法をより効果的にさせることが報告されている [5,6]。HT は悪性腫瘍の集学的治療の一つとして期待され、現在までに様々な癌種で多くの基礎および臨床研究が報告されているが、そのメカニズムは未だに明らかになっていない。

HT の臨床での応用については、本邦において 1990 年より放射線療法との併用に限り電磁波加温については保険適応となり、その後化学療法との併用、温熱療法単独治療についても保険適応となった [2]。HT のメカニズムの一つとして、癌細胞の未熟な血管が熱放散を妨げることによる、熱自体の細胞傷害性以外にも、温熱により放出される活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) が関連していると考えられているが、その詳細は明らかではない。

我々の研究室では、ROS による細胞内シグナル伝達について研究しており、抗癌剤耐性の原因として知られている ABC トランスポーターと ROS の関係についても研究を重ねてきた。我々は以前に、胃癌細胞にシスプラチンを暴露した後の ROS の上昇が ABCG2 トランスポーターの発現を低下させたこと報告している [7]。また同様に、胃癌細胞を用いて、HT による mitROS の上昇により制御された ABCG2 を利用して、HT と PDT の相乗効果を報告した [8]。ABCG2 トランスポーターは ABC トランスポーターファミリーメンバーの一つで、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 で初めて発見され、ドキソルビシン (DOX) に対して耐性を持つようになったため、乳癌耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein ; BCRP) とも呼ばれている [9]。ABC トランスポーターは、薬剤を細胞外に排泄し、薬剤の細胞内蓄積を減少させる。これが薬剤耐性のメ

カニズムであり、抗癌剤耐性の原因は、ABC トランスポーターの過剰発現と言われている [10]。DOX は ABCG2 トランスポーターから排泄される。よって、HT により細胞内の mitROS の上昇が ABCG2 トランスポーターの発現を制御することで、DOX との相乗効果が期待できるのではないかと考えた。

また、乳癌にはホルモン受容体の有無と HER2 受容体の有無で分類されるサブタイプが存在し、サブタイプ別で治療法は少しずつ異なる。現在までに乳癌に対する HT をサブタイプ別に検討した文献は少なく、どのサブタイプが HT に効果的かについては、未だ不明である。以上のことから本研究では、サブタイプの異なる 2 種類のヒト乳癌細胞を用いて、HT に DOX を上乗せすることで乳癌細胞に与える細胞傷害性について検討した。

3.2 対象と方法

3.2.1 実験細胞株と HT について

実験には、理研 cell bank から購入したエストロゲン受容体 (ER) 陽性 HER2 陰性ヒト乳癌細胞株 MCF-7 (RCB1904) と ER 陰性 HER2 陽性ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 (RCB1192) を用いた。MCF-7 の培地は、L-グルタミンおよびフェノールレッドが添加された E-MEM (Wako Pure Chem. Ind. Ltd., Osaka, Japan) に、10% ウシ胎児血清 (GE Healthcare Life Sciences, Inc., S Logan, UT)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Wako Pure Chem. Ind. Ltd.)、1.0mM ピルビン酸ナトリウム溶液 (Wako Pure Chem. Ind. Ltd.) および 1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) を添加して使用した。培養は、37°C・5%CO₂ 下で行った。MDA-MB-453 の培地は、L-グルタミンおよびフェノールレッドが添加されたライボビッツ L-15 培地に 10% ウシ胎児血清 (GE Healthcare Life Sciences, Inc.) および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Wako Pure Chem. Ind., Ltd.) を添加して使用した。培養は、37°C 下で CO₂ を添加せずに行った。HT は、細胞を 42°C のインキュベーターで 1 時間培養した。

3.2.2 HT と DOX 投与後の細胞毒性試験

細胞の生存率は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD) キットを用いて、メーカーのプロトコルに従って測定した。MCF-7 および MDA-MB-453 を 96well プレートに 5.0×10^3 個/well で播種し、一晩培養した。HT として 42°C のインキュベーターで 1 時間培養した後、37°C で 24 時間培養した。その後、培養液の上清を吸引し、培地に 0, 0.1, 1 μ M の DOX (Wako Pure Chem. Ind., Ltd.) を加えた新鮮な培地に交換した。その後 37°C で 24 時間培養した後、10% Cell Counting Kit-8 を含む新鮮な培地に

交換し、細胞をさらに1時間培養した。DTX880 マルチモードマイクロプレートリーダー (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) を用いて、450 nm での吸光度を測定した。

3.2.3 ESR による細胞内活性酸素測定

HT 後の MCF-7 と MDA-MB-453 の細胞内 ROS の測定は、ESR 法で測定した。それぞれの細胞をスライドガラス (49 mm × 5 mm × 0.2 mm) 上に播種し、一晩培養した後、温熱療法群のみ、42°C のインキュベーターで1時間培養した。そのスライドガラスを ESR 測定用組織ガラス (Radical Research Inc., Tokyo, Japan) へ載せ、ESR 測定用溶液 (5 mM succinic acid, 5 mM malic acid, 5 mM D-glutamic acid, and 5 mM NADH, 5.9 % v/v DMPO) 80 μ l を組織ガラスに添加し、JEOL-TE X-band spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は 10mW incident microwave power、0.1mT modulation width、8min sweep time、7.5mT sweep width、0.1s time contrast、333.5mT center field、15mT scan range とした。測定データの解析は Win-Rad Radical Analyzer System (Radical Research) を用いた。

3.2.4. ミトコンドリア活性酸素 (mitROS) の検出

HT 後の mitROS 産生を、MitoSOX™ Red superoxide indicator (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。MCF-7 および MDA-MB-453 を 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 または 2.0×10^4 個/well で播種し、一晩培養した。細胞を 37°C または 42°C で1時間培養した後、培地を 5 μ M MitoSOX™ を含む MSF solution (Modified HBSS) に置換した。細胞を 37°C で1時間培養し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence Co., Tokyo, Japan) を用いて MitoSOX™ の蛍光像を撮影し、蛍光強度を ImageJ Fiji を用いて解析した。

3.2.5 Western blotting による ABCG2 の発現測定

HT 後の mitROS 産生と ABCG2 のタンパク発現レベルとの関係を調べるために、HT 後の ABCG2 の発現を Western blotting で測定した。MCF-7 及び MDA-MB-453 を 100mm ディッシュ中で一晩培養した。その後、コントロール群は 37°C のまま、HT 群のみ 42°C で1時間培養し、さらに 37°C で24時間培養した。ディッシュを PBS で3回洗浄し、氷上でプロテアーゼ阻害剤カクテル (Thermo Fisher Scientific) を含む RIPA バッファーを添加し、高速冷却遠心機で10分間遠心した後、上清を破棄し、細胞溶解液を作成した。NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で細胞溶解液を調整し、各サンプルを 95°C で5分間加熱後、10 μ L ずつ NuPAGE 12%Bis-

Tris Protein Gel (Thermo Fisher Scientific, Inc.) のウェルに充填した。ゲルを 200 V で 30 分電気泳動し、タンパク質を 2.0 mA/cm² で 60 分間電気泳動することによりポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA) に転写した。PVDF 膜を Can Get Signal 製のブロッキング試薬 (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) に 25°C、60 分間浸してブロッキングを行い、抗 ABCG2 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO CO., LTD.) で 1 : 1000 に希釈した一次抗体溶液にメンブレンを浸し、4°Cで一晩反応させた。その後、メンブレンを 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich Co.) を含む PBS (PBS-T) で 10 分間 3 回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ IgG 二次抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO CO., LTD.) で 1:1000 に希釈した二次抗体溶液にメンブレンを浸し、25°C60 分間反応させた。その後メンブレンを PBS-T で 10 分間 3 回洗浄し、Lumina Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore)に浸し、Image Quant LAS 4000 (GE Health Care Japan, Tokyo, Japan) を用いて発光を測定した。サンプルローディングコントロールとして、抗アクチン抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) を用いて、 β アクチンをコントロールとして測定した。

3.2.6 統計解析

本実験の統計処理は SPSS (International Business Machines Corporation, Armonk, NY) を用いた。2 群間以上の検定には Scheffe's test を、2 群間の検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ を統計的に有意な差とした。すべてのデータは平均±標準偏差で示した。

3.3 実験結果

3.3.1 HT による DOX の細胞毒性の増強

HT 後の DOX 投与による MDA-MB-453 と MCF-7 の細胞生存率を測定した。Fig.1 に、HT 後に DOX を投与した 24 時間後の細胞生存率を示す。HT 併用群の MDA-MB-453 および MCF-7 の細胞生存率は、コントロール群、すなわち DOX 投与のみの群と比較し、DOX の濃度依存性に低下し、DOX1、10 μ M では有意差を認めた。これらの結果から、HT 併用による DOX 療法は相乗効果があることが示唆された。

3.3.2 HT による mitROS の増加

生細胞における ROS 産生量を、ESR 法を用いて測定した。MCF-7 および MDA-MB-453 の HT 群またはコントロール群の ESR スペクトルを Fig.2(a)と Fig.2(c)に、シグナル対ノイズのピーク強度の比を Fig.2(b)と Fig.2(d)に示す。HT 後の MDA-MB-453、MCF-7 とともに ESR スペクトルは、コントロール群の細胞に比べて有意に増加した。

また、HT 後の mitROS を、ミトコンドリアスーパーオキシドを指標にした MitoSOX™を用いて測定した。蛍光像 Fig.3(a)に示すように、HT 後の蛍光強度はコントロール群と比較し増加した。ImageJ Fiji で定量化すると、MDA-MB-453、MCF-7 とともにその差は有意であった(Fig.3(b))。これらの結果から、HT はミトコンドリアからの ROS を産生させることを示した。

3.3.3 HT による ABCG2 トランスポーターの発現制御

HT 群とコントロール群の細胞内 ABCG2 トランスポーターの発現を Western blotting で解析した。Fig.4 に、HT 後 24 時間後の ABCG2 トランスポーターの発現を示す。コントロール群と HT 群を比較すると、MDA-MB-453 では、HT 群で ABCG2 トランスポーターの発現は有意に減少した。MCF-7 では、ABCG2 トランスポーターの発現に減少傾向が見られるものの、有意ではなかった。これらの結果は、HT により、MDA-MB-453 は MCF-7 よりも容易に ABCG2 の発現が制御されることを示した。

3.4 考察

本研究では、異なる 2 種類のヒト乳癌細胞株を用いて、HT による ROS の産生と DOX の相乗効果について検討した。

HT24 時間後の DOX 投与による細胞毒性試験では、MDA-MB-453 および MCF-7 いずれも HT 群で有意に細胞生存率が低下し、HT は DOX の効果を高めることが示唆された。さらに、HT 単独ではいずれの細胞においても細胞生存率に違いが見られなかったことから、42°C1 時間の HT は、細胞にとって安全に行えることが実証された (Fig.1)。この相乗効果には、HT による ROS の産生と、ABCG2 トランスポーターの発現の低下が関与していると考えられる。

HT により細胞内の ROS が増加することはよく知られている [11,12]。本研究においても、ESR のシグナル強度はコントロール群と比較し、42°C1 時間の HT により有意に増加した (Fig.2)。同様に、mitROS を検出する MitoSOX™を用いた実験でも、HT 群で有意に蛍光強度が増強した (Fig.3)。これはつまり、ESR で検出された ROS はミトコンドリア由来であることを示している。

ミトコンドリアからの ROS による細胞内伝達機構は未だ明らかになっていないが、我々は以前に胃癌細胞を用いた研究で、mitROS の増加が、ABCG2 トランスポーターの発現の低下に参与していることを報告した[7,8]。今回の結果でも、Fig.4 が示すように、MDA-MB-453 においては、HT 後 24 時間後の ABCG2 の発現は有意に低下していた。MCF-7 においては、有意ではなかったものの、低下傾向が見られた。この差が出なかった理由として、MDA-MB-453 と MCF-7 では、HT 後の ROS の産生量に違いが見られたためと考えられる。Fig.2 の ESR スペクトルとシグナル対ノイズのピーク強度の比が示すように、MCF-7 は MDA-MB-453 と比べて、ROS の産生量が少ない。また、Fig.3 の蛍光像とその定量化グラフでも、MCF-7 の ROS の産生量は MDA-MB-453 と比較し、少ないことが分かる。以上のことから、ABCG2 トランスポーターの発現制御は、mitROS の産生量と関係していることが示唆された。

ABCG2 トランスポーターは ABC トランスポーターの一つであり、別名 BCRP (Breast cancer resistance protein) と呼ばれ、このトランスポーターの過剰発現は、乳癌における薬剤耐性の原因となることでも知られている [9,10]。ABC トランスポーターのうち、ABCB1、MDR1、ABCB1

(MRP1)、ABCG2 (BCRP) などは、種々の抗がん剤を細胞外に排泄する働きを持つ。このため、がん細胞においてこれらのトランスポーターの過剰発現は、抗がん剤耐性を示し、正常細胞での発現の低下は、抗がん剤毒性を増強させる。これは有害事象の増加につながると考えられる。したがって、がん細胞だけの ABCG2 トランスポーター発現を特異的に制御出来れば、有害事象を増やさずに抗がん剤の効果を増強させることができる。今回の実験では、ヒト乳癌細胞株だけを用いており、正常細胞との比較は行っておらず、癌細胞特異的かどうかの検討はできない。しかし正常細胞と比較し、癌細胞は特異的に mitROS の産生が増加していることは様々な研究で報告されており [13,14]、我々の以前の研究でも、正常細胞と癌細胞の比較で、癌細胞特異的に mitROS が増加したことを報告している [15,16]。さらに mitROS の増加が ABCG2 の発現低下に参与していることも報告した [7,8]。以上のことから、癌種に関わらず HT ががん細胞特異的に ROS を増加させ、ABCG2 トランスポーターの発現を低下させることに期待したい。また、乳癌のような体表の悪性腫瘍は HT を局所的のみに行うことが可能である。局所のみ HT であれば、がん細胞のみの ROS の増加を期待できる。これは有害事象の増加に繋がらず、抗癌剤の増強効果を期待できると考える。

HT のメカニズムについては未だ解明されておらず、現在までに多くの基礎研究がなされ、以下のような生物学的メリットが示されている [2,17,18]。1) 42-43°C の HT により、加温時間とともに細胞生存率が低下する、これは多くの細

胞に共通して見られ、感受性は組織型に左右されない。2) 腫瘍組織の方が正常組織より加温されやすい。3) 低酸素細胞の方が有酸素細胞より HT に弱い。4) 細胞の放射線あるいは抗癌剤からの回復が HT により阻止される。5) 放射線と HT に対する細胞周期の感受性が異なる。このような生物学的根拠をもとに加温装置の開発が進み、多くの臨床試験が行われ、その有効性が示されている。本来の HT と化学療法の併用療法は、同時遂行で最も効果が高いことが知られている。しかし現状は、場所の確保や設備の問題などによって同時遂行は難しく、そもそも HT 自体が運営面の不都合さや、コストベネフィットの悪さから、敬遠されがちである。本研究では、*in vitro* であるものの、HT24 時間後の有効性を示すことができた。これは HT の今後の展望において、大きな一歩となりうる可能性がある。今後は *in vivo* において研究を進め、さらには臨床に応用出来る形として結果を残していきたい。

3.5 結論

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 と MDA-MB-453 において、HT は mitROS を産生させ、DOX の効果を増強させた。これは HT による細胞内の mitROS の増加が ABCG2 トランスポーターの発現を制御したために、細胞内の DOX 濃度が増加したためと考えられる (Fig.5)。このことから、HT 後の DOX 治療は相乗効果が期待できる。今後は *in vivo* モデルを用いて検討をすすめていく。

Fig.1

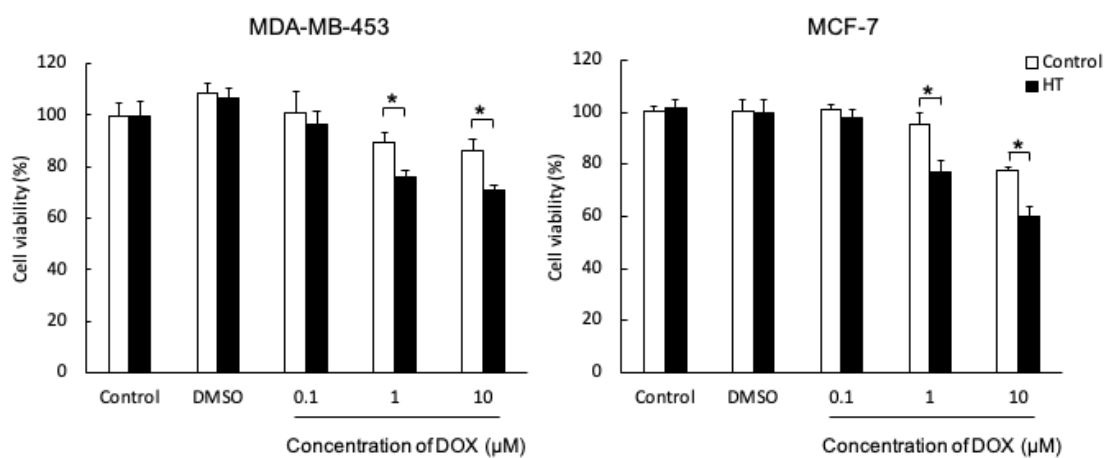


Figure 1. MDA-MB-453 and MCF-7 cells were treated with or without HT and cell viabilities after DOX treatment were measured using the CCK-8 method. Statistical significance was tested by Student's t-test. $n = 10$ (MDA-MB-453), $n = 4$ (MCF-7), error bar; S.D. * $p < 0.01$.

Fig.2

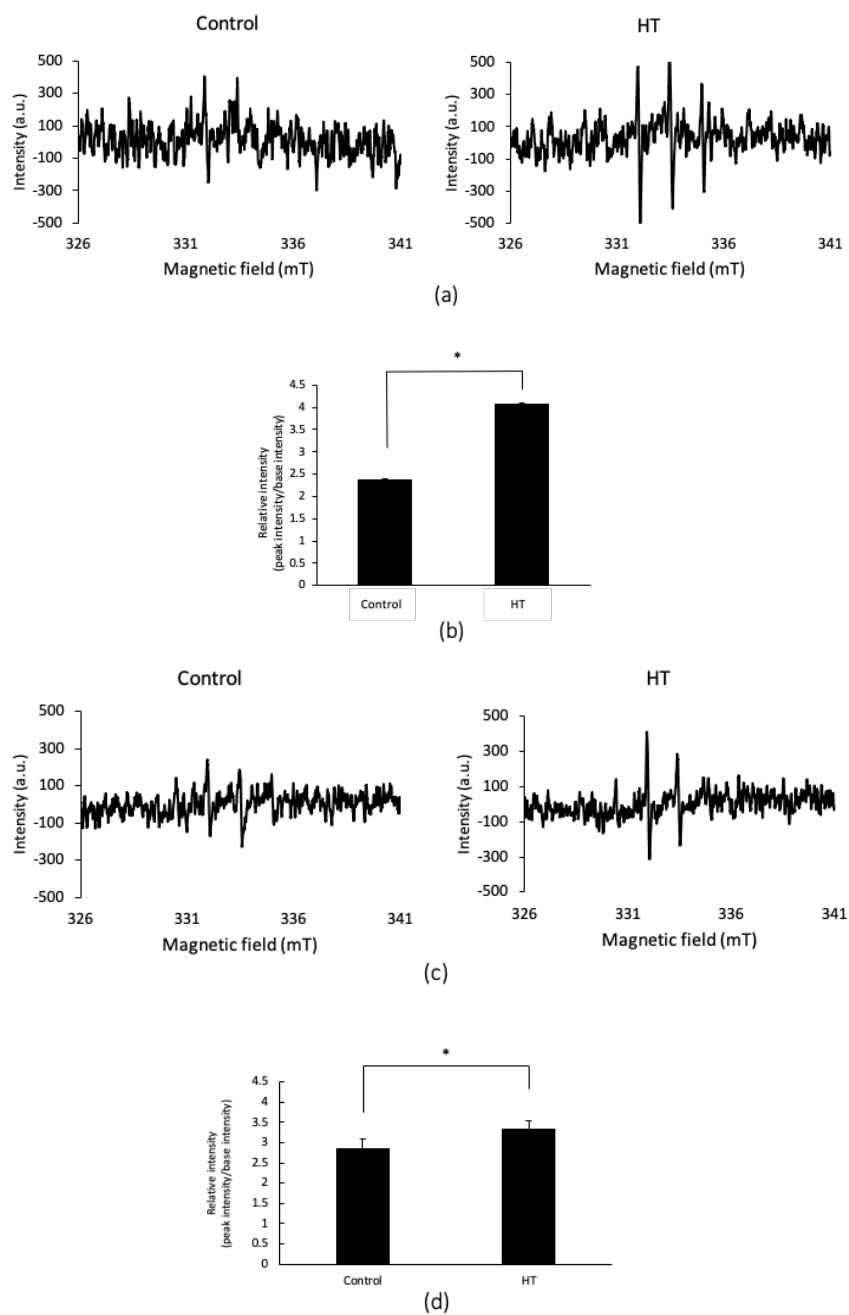


Figure 2. Intracellular ROS production levels after HT or non-HT treatment were measured using ESR. Representative ESR signal waves in MDA-MB-453 (a) and MCF-7 (c) were shown. Signal-to-noise ratio in MDA-MB-453 (b) and MCF-7 (d) were represented in graphs. Statistical significance was tested via Student's t-test. $n = 3$ (MDA-MB-453), $n = 4$ (MCF-7), error bar; S.D. $*p < 0.01$.

Fig.3

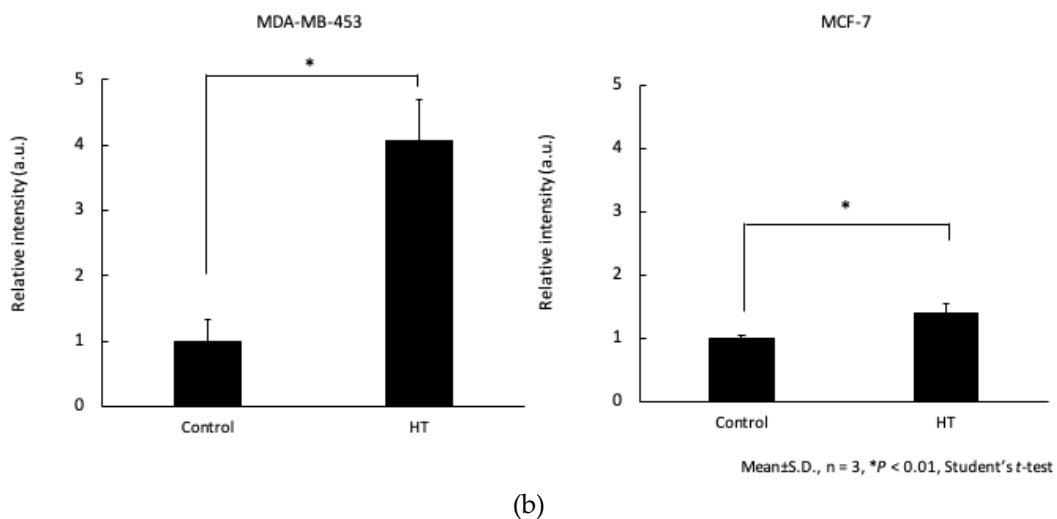
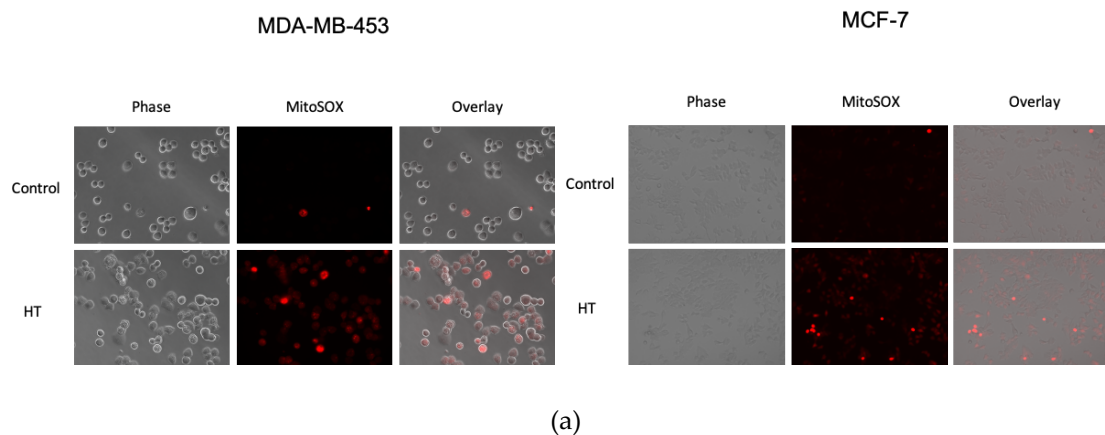


Figure 3. Mitochondrial ROS after HT or non-HT treatment in MCF-7 and MDA-MB-453 cells were measured using MitoSOX™. (a) The fluorescence images were captured using an epifluorescence microscope. (b) The fluorescence intensities were analyzed using ImageJ Fiji. Statistical significance was tested via Student's t -test. $n = 3$, error bar; S.D. * $p < 0.01$.

Fig.4

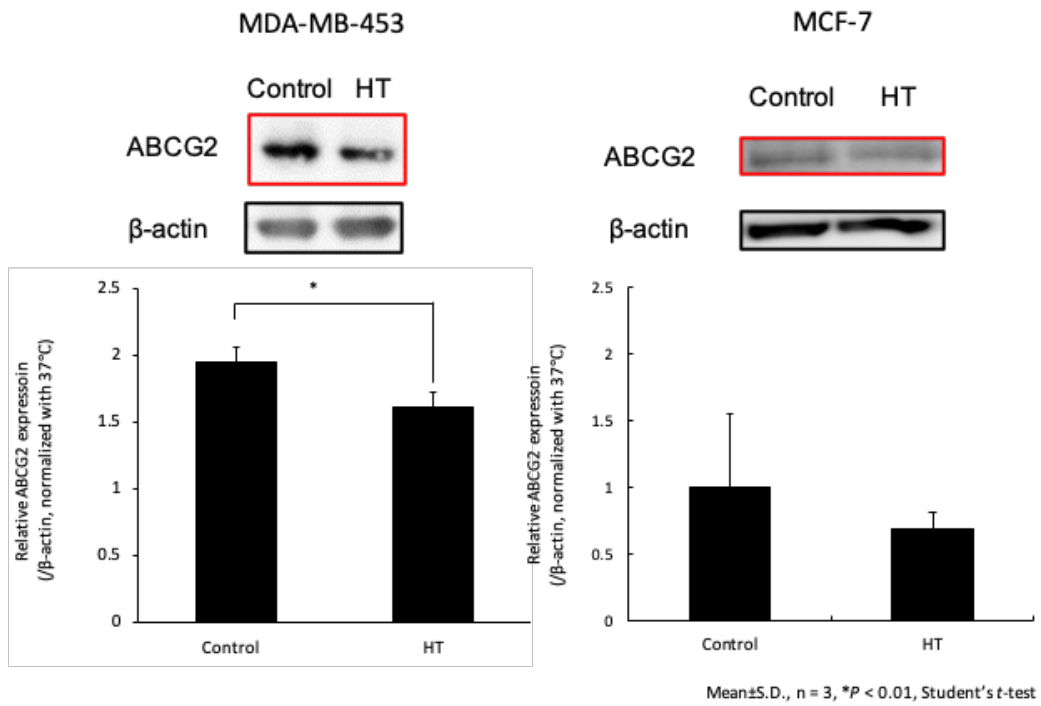


Figure 4. ABCG2 protein expression transitions after HT or non-HT treatment were analyzed using western blotting. Statistical significance was tested via Student's t-test. $n = 3$, error bar; S.D. * $p < 0.01$.

Fig.5

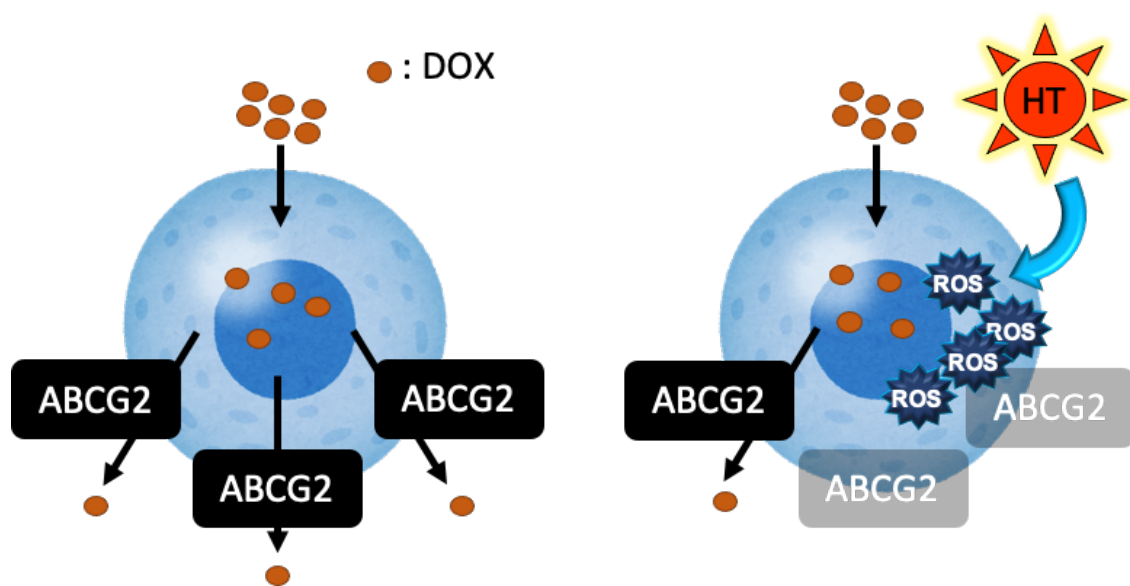


Figure 5. The combination treatment with DOX and HT showed that HT increased intracellular ROS production and downregulated ABCG2 protein expression, leading to cell damage enhancement via DOX.

総括

私は大学院4年間を通して、活性酸素を利用した新たな癌治療の研究を行ってきた。本来は生体にとって有害となる活性酸素を利用するという方法は、とても斬新で、大変興味深いものである。第2章で述べた、乳癌における光線力学療法は、未だ臨床においても応用される機会は少なく、今後は *in vivo* モデルを用いて研究を進め、日常臨床に応用できる形として結果を残していきたい。また、第3章で述べた温熱療法に関しては、現在保険適応となっているものの、コストベネフィットからなかなか日常臨床に応用できないのが現状である。今後は *in vivo* での研究を進めるとともに、臨床研究にも応用できるような形で研究を進め、今後の癌治療の発展に貢献していきたい。

なお、本稿第2章は別紙参考論文のように、*J. Porphyrins Phthalocyanines* 2019; 23: 1447–1447. に掲載されている[*]。

また、本稿第3章は *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Dec 15;21(24):9522. doi: 10.3390/ijms21249522. に掲載されている[**]。

[*] Terasaki, Azusa, Kurokawa, Hiromi, Bando, Hiroko, P.Indo, Hiroko, Hara, Hisato, Majima, Hideyuki J, Matsui, Hirofumi, Ito, Hiromu. Enhancement of PDT-cytotoxicity via ROS induced by indomethacin in metastatic breast cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2019; 23: 1447–1447.

[**] Azusa Terasaki, Hiromi Kurokawa, Hiromu Ito, Yoshiki Komatsu, Daisuke Matano, Masahiko Terasaki, Hiroko Bando, Hisato Hara and Hirofumi Matsui, Elevated Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species via Hyperthermia Enhanced Cytotoxic Effect of Doxorubicin in Human Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-453 and MCF-7 *Int J Mol Sci* 2020 Dec 15; 21(24): 9522. doi: 10.3390/ijms21249522.

参考文献

第1章

1. World Health, O., *WHO report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing care for all*. World Health Organization: Geneva, 2020.
2. Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T.F., Al Lami, F.H. et al. "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study." *JAMA Oncol.* 2018; **4**: 1553-1568.
3. 公益財団法人 がん研究振興財団 「がんの統計'19」(2019)
4. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」.
5. 日本乳癌学会 「乳癌診療ガイドライン 治療編 2018年版」, 金原出版
6. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL., et al. "Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer." *J Clin Oncol.* 1996; **14**: 2197-2205.
7. 日本乳癌学会 「乳腺腫瘍学 第3版」(2020), 金原出版
8. Hortobagyi GN. "Treatment of breast cancer." *N Engl J Med.* 1998; **339**: 974-984.
9. 吉川敏一. 「フリーラジカルの医学」京府医大誌 2011;**120**: 381-391
10. 吉川敏一, 河野雅弘, 野原一子「活性酸素・フリーラジカルのすべて」(2000); 丸善出版, p.13
11. 中村成夫. 「活性酸素と抗酸化物質の化学」日医大医学会誌 2013; **9**: 164-169
12. 青柳一正. 「活性酸素」日本内科学会雑誌 1991; **80**: 122-126
13. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. "Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis." *Cell*2005; **122**: 221-33
14. Toren Finkel. "Signal transduction by reactive oxygen species." *J. Cell Biol.* 2011; **194**: 7-15
15. Gerald W Dorn II. "Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change." *EMBO Mol Med.* 2015; **7**: 865-877
16. 江頭享, 高山房子. 「フリーラジカルと酸化ストレス-ESRによる測定法を中心に-」日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) 2002; **120**, 229-236
17. 吉川敏一 「酸化ストレスの医学」(2008); 診断と治療社
18. Buettner GR. "Spin trapping: ESR parameters of spin adducts." *Free Radic Biol Med.* 1987; **3**: 259-303.

19. Nakagawa H, Ohyama R, Kimata A, et al. "Hydroxyl radical scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base." *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; **16**: 5939-42.
20. Matsumoto C, Sekine-Suzuki E, Nyui M, et al. "Analysis of the antioxidative function of the radioprotective Japanese traditional (Kampo) medicine, hangeshashinto, in an aqueous phase." *J Radiat Res.* 2015; **56**: 669-77.
21. Althoff F, Benzing K, Comba P, et al. "Abiotic methanogenesis from organosulphur compounds under ambient conditions." *Nat Commun.* 2014; **5**: 4205.
22. Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., et al. "A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth." *Cancer Cell.* 2007; **11**: 37-51.
23. Pallab M, Samik B, Uday B, et al. "Indomethacin, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Develops Gastropathy by Inducing Reactive Oxygen Species-mediated Mitochondrial Pathology and Associated Apoptosis in Gastric Mucosa." *J Biol Chem.* 2009; **284**: 3058-3068
24. Deeley, R. G., Westlake, C., Cole, S. P., "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." *Physiol Rev.* 2006; **86**: 849-899.
25. Gottesman, M. M. "Mechanisms of cancer drug resistance." *Annu Rev Med.* 2002; **53**: 615-627.
26. Ambudkar, S. V., Kim, I. W., Xia, D., et al. "The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding." *FEBS Lett.* 2006; **580**: 1049-1055.
27. Dean, M. and T. Annilo. "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; **6**: 123-142.
28. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., et al. "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**: 15665-15670.
29. Tiwari, A. K., Sodani, K., Dai, C. L., et al. "Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy." *Curr Pharm Biotechnol.* 2011; **12**: 570-594.
30. Wang, Y. J., Zhang, Y. K., Kathawala, R. J., et al. "Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in

- Anticancer Drug Resistance.” *Cancers (Basel)*. 2014; **6**: 1925-1952.
31. Takahashi, M., Furihata, M., Akimitsu, N., et al. “A highly bone marrow metastatic murine breast cancer model established through in vivo selection exhibits enhanced anchorage-independent growth and cell migration mediated by ICAM-1.” *Clin Exp Metastasis*. 2008; **25**: 517-529.
 32. Aslakson, C. J. and F. R. Miller. “Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor.” *Cancer Res*. 1992; **52**: 1399-1405.
 33. Takahashi, M., Miyazaki, H., Furihata, M., et al. “Chemokine CCL2/MCP-1 negatively regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model.” *Clin Exp Metastasis*. 2009; **26**: 817-828.
 34. Cailleau, R., Olivé, M., Cruciger, Q. V., et al. “Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization.” *In Vitro*. 1978; **14**: 911-915.
 35. Siciliano, M. J., et al. “Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker.” *Cancer Res*. 1979; **39**(3): 919-922.
 36. Soule, H. D., Barker, P. E., Cailleau, R. “A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.” *J Natl Cancer Inst*. 1973; **51**: 1409-1416.
 37. Brooks, S. C., Locke, E. R., Soule, H. D. “Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma.” *J Biol Chem*. 1973; **248**: 6251-6253.

第 2 章

1. Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 Million New Cases and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
2. Müller A, Homey B, Soto H, et al. “Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis” *Nature* 2001; **410**: 50-56.
3. Coleman RE and Rubens RD. “The clinical course of bone metastases from breast cancer” *Br. J. Cancer* 1987; **55**: 61-66.
4. Coleman RE. “Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity” *Clin. Cancer Res*. 2006; **12**: 6243s-6249s.
5. Papapetrou PD. “Bisphosphonate-associated adverse events” *Hormones* 2009; **8**: 96-110.

6. Agostinis P, Berg K, Cengel KA., et al “Photodynamic therapy of cancer: an update” *CA Cancer J. Clin.* 2011; **61**: 250-281.
7. Moret F and Reddi E. “Strategies for optimizing the delivery to tumors of macrocyclic photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT)” *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2017; **21**: 239-256.
8. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T., et al. “Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial” *Lancet Oncol.* 2006; **7**: 392-401.
9. Hadjipanayis CG, Widhalm G and Stummer W. “What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas?” *Neurosurgery* 2015; **77**: 663-673.
10. Kriegmair M, Baumgartner R, Lumper W., et al. “Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer” *Br. J. Urol.* 1996; **77**: 667-671.
11. Ito H, Tamura M, Matsui H., et al “Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5-aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells” *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2014; **54**: 81-85.
12. Kurokawa H, Ito H and Matsui H. “The Cisplatin-Derived Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Enhances the Effectiveness of Photodynamic Therapy via Transporter Regulation” *Cells* 2019; **8**: 918.
13. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N., et al. “Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria” *J. Biol. Chem.* 2009; **284**: 14809-14818.
14. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM., et al. “Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?” *Free Radic. Biol. Res.* 2010; **49**: 1603-1616.
15. Sullivan LB and Chandel NS. “Mitochondrial reactive oxygen species and cancer” *Cancer Metab.* 2014; **2**: 17.
16. Tamura M, Matsui H, Tomita T., et al. “Mitochondrial reactive oxygen species and cancer” *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2014; **54**: 12-17.
17. Hiyama K, Matsui H, Tamura M., et al. “Cancer cells uptake porphyrins via heme carrier protein 1” *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2013; **17**: 36-43.
18. Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O., et al “Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells” *J. Physiol. Pharmacol.* 2012; **63**: 137-142.
19. Ito H, Matsui H, Hirayama A., et al. “Reactive oxygen species induced by non-

- steroidal anti-inflammatory drugs enhance the effects of photodynamic therapy in gastric cancer cells” *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2016; **58**: 180-185.
20. Liou GY and Storz P. “Reactive oxygen species in cancer” *Free Radic. Res.* 2010; **44**: 479-496.
 21. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C., et al. “Oxidative stress and antioxidant defense” *World Allergy Organ J.* 2012; **5**: 9-19.
 22. Hagiya Y, Endo Y, Yonemura Y, et al. “Pivotal roles of peptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 in 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photocytotoxicity of gastric cancer cells in vitro” *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2012; **9**: 201-214.
 23. Kurokawa H, Ito H, Terasaki M., et al. “Hyperthermia enhances photodynamic therapy by regulation of HCP1 and ABCG2 expressions via high level ROS generation” *Sci. Rep.* 2019; **9**: 1638.
 24. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV., et al. “A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**: 15665-15670.
 25. Doyle L and Ross DD. “Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)” *Oncogene* 2003; **22**: 7340-7358.
 26. Yamamoto F, Ohgari Y, Yamaki N., et al. “The role of nitric oxide in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of cancerous cells” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; **353**: 541-546.
 27. Zhen J, Lu H, Wang XQ., et al. “Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species” *Am. J. Hypertens.* 2008; **21**: 28-34.
 28. Motoori S, Majima HJ, Ebara M., et al. “Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE” *Cancer Res.* 2001; **61**: 5382–5388.
 29. Furukawa T, Kohno H, Tokunaga R., et al “Nitric oxide-mediated inactivation of mammalian ferrochelatase in vivo and in vitro: possible involvement of the ironsulphur cluster of the enzyme” *Biochem. J.* 1995; **310**: 533–538.
 30. Takahashi M, Furihata M, Akimitsu N., et al “A highly bone marrow metastatic murine breast cancer model established through in vivo selection exhibits enhanced anchorage-independent growth and cell migration mediated by ICAM-1” *Clin. Exp. Metastasis* 2008; **25**: 517–529.
 31. Takahashi M, Miyazaki H, Furihata M., et al “Chemokine CCL2/MCP-1

negatively regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model” *Clin. Exp. Metastasis* 2009; **26**: 817–828.

第3章

1. 日本ハイパーサーミア学会 (2008) 「ハイパーサーミア がん温熱療法ガイドブック」 毎日健康サロン
2. Ohguri, T. “Current Status of Clinical Evidence for Electromagnetic Hyperthermia on Prospective Trials.” *Thermal Medicine* 2015; **31**: 5-12.
3. Wust, P., et al. “Hyperthermia in combined treatment of cancer.” *The Lancet Oncology* 2002; **3**: 487-497.
4. Bull, J. M. “An update on the anticancer effects of a combination of chemotherapy and hyperthermia.” *Cancer Res.* 1984; **44**: 4853s-4856s.
5. Schildkopf, P., Ott, O. J., Frey, B., et al. “Biological rationales and clinical applications of temperature controlled hyperthermia--implications for multimodal cancer treatments.” *Curr Med Chem.* 2010; **17**: 3045-3057.
6. Frey, B., Weiss, E. M., Rubner, Y., et al. “Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system.” *Int J Hyperthermia* 2012; **28**: 528-542.
7. Kurokawa, H., Ito, H., Matsui, H., “The Cisplatin-Derived Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Enhances the Effectiveness of Photodynamic Therapy via Transporter Regulation.” *Cells* 2019; **8**: 918.
8. Kurokawa, H., Ito, H., Terasaki, M., et al. “Hyperthermia enhances photodynamic therapy by regulation of HCP1 and ABCG2 expressions via high level ROS generation.” *Sci Rep.* 2019; **9**: 1638.
9. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., et al. “A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 15665-15670.
10. Ejendal, K. F. and C. A. Hrycyna. “Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2.” *Curr Protein Pept Sci.* 2002; **3**: 503-511.
11. Zhao, G., Yu, R., Deng, J., et al. “Pivotal Role of Reactive Oxygen Species in Differential Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Prostaglandins Production in Macrophages.” *Molecular Pharmacology* 2013; **83**: 167.
12. Curtin, J. F., Donovan, M., Cotter, T. G., “Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis.” *J Immunol Methods* 2002; **265**: 49-72.

13. Slimen, I. B., Najar, T., Ghram, A., et al. "Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review." *Int J Hyperthermia* 2014; **30**: 513-523.
14. Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., et al. "Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies." *Redox Biol.* 2018; **15**: 347-362.
15. Terasaki, M., Ito, H., Kurokawa, H., et al. "Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells." *J Clin Biochem Nutr.* 2018; **63**: 36-41.
16. Tamura, M., Matsui, H., Tomita, T., et al. "Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion." *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2014; **54**: 12-17.
17. Dewhirst, M. W., Viglianti, B. L., Lora-Michiels, M., et al. "Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia." *Int J Hyperthermia* 2003; **19**: 267-294.
18. Horsman, M. R. and J. Overgaard "Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy." *Clin Oncol (R Coll Radiol.)* 2007; **19**: 418-426.

謝辞

本研究では、たくさんの方々にご指導、ご鞭撻をいただきました。

研究全体のご指導賜りました、筑波大学乳腺甲状腺内分泌外科 原尚人教授、坂東裕子准教授に深謝の意を表します。また、日常の研究の場において、直接のご指導ご鞭撻をいただいた筑波大学消化器内科 松井裕史先生に心より感謝申し上げます。そして、直接実験手技や意義深い討論、アドバイスを頂いた筑波大学医学医療系 黒川宏美先生、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 伊藤紘先生に心より感謝申し上げます。同じく、日々の研究生活をともに過ごし、切磋琢磨した筑波大学消化器内科 日下部涼子先生、俣野大介先生、小松義希先生、池田貴文先生、筑波大学乳腺甲状腺内分泌外科 星葵先生、また当研究室秘書、草由香様に心から感謝申し上げます。

そして最後に、ここまで私を心身ともに支えてくれた家族に心より感謝致します。

出典

本学位論文の第 2 章は J. Porphyrins Phthalocyanines 2019; 23: 1447–1447.

doi : <https://doi.org/10.1142/S1088424619501542>

に掲載された論文の内容を同ジャーナルサイトの Copyright and permissions Requests より許可を得て再利用している。

本学位論文の第 3 章は Int J Mol Sci 2020 Dec 15; 21(24): 9522. doi :

<https://doi.org/10.3390/ijms21249522>

に掲載された論文の内容を同ジャーナルサイトの Copyright and permissions Requests より許可を得て再利用している。