

学位論文要旨

学位申請者氏名 大野 恵一

現在、我が国の死因第一位であるがんは増加の一途を辿っており、がんの克服は非常に大きな課題となっている。近年、医療の進歩によって、分子標的薬を含む新たな治療戦略が確立されつつあるが、これは、多数の患者に恩恵をもたらすと共に、医療費の増大を引招いた。疾患別医療費においては、がん治療にかかる直接的なコストは他の疾患を超えて一位であり、年々増加する医療費は我が国の医療システムの根幹である国民皆保険の破綻をもたらしかねず、医療コストの観点からも、がん治療の転換期にあると考えられる。

本研究では魚油成分中に含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) が前立腺がんおよび乳がんに影響に着目した。EPA および DHA は医療現場にてスイッチ OTC、サプリメント、処方箋医薬品として使用されており、近年において、複数のがんに対する抗がん効果が報告されるようになった。今回注目した前立腺がんは治療開始初期こそホルモン療法が奏効するものの、治療開始から数年が経過することでホルモン療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) となる。現在、この CRPC に使用できる薬は少なく、さらに転移を伴った場合の予後は非常に悪い。今回、治療戦略が十分に確立されていない CRPC を対象とし、EPA、DHA が CRPC の新規治療戦略の発展に寄与する可能性を探索した。

第一章においては、CRPC の性質を持つ細胞株である PC3 を用いて、EPA、DHA が単独でその増殖、転移・浸潤を抑制するかを検討した。その結果、EPA、DHA は単独で濃度依存的な生細胞数減少効果を認めた。その最小有効濃度は EPA、DHA を含有する製剤を継続的に服用すれば到達可能なレベルであった。さらに EPA、DHA の PC3 に対する転移・浸潤の抑制効果について検討した。その結果、先の結果において生細胞数の増減に影響しない低レベルの濃度範囲で優位な転移・浸潤抑制効果を認めた。以上、第一章の結果から、EPA、DHA はそれぞれ単独で PC3 細胞の増殖、転移および浸潤抑制効果を持つことが明らかとなった。

第二章においては、CRPC に対して効果を示す抗がん剤を探索するとともに、それらを EPA または DHA と併用することによる効果を検討した。用いた抗がん剤は 5-FU、Doxorubicin、Etoposide、Cyclophosphamide および Paclitaxel であり、これらはすべて単独添加であっても効果の差はあるが、有意な生細胞数減少効果を認めた。さらに EPA、DHA との併用実験においては、ほとんどの組み合わせにおいて抗がん剤と EPA、DHA を併用することで抗がん剤の作用を増強する可能性が示された。さらにこれらの抗がん剤単独添加時、併用添加時の結果をもとにコンビネーションインデックス (CI) を用いて併用効果を判定した。CI の結果からごく一部の組み合わせにおいて拮抗効果を認めたが、多くが相乗効果を示すと判定された。さらに抗がん剤単独で用いた最大濃度の生細胞数減少効果と各抗がん剤の濃度を低く抑えたうえでの併用効果を比較した。その結果、EPA または DHA を 50 μ M で併用すると、多くの組合せで抗がん剤単独で用いた最大濃度の生細胞数減少効果を上回った。これらの結果から、抗がん剤と EPA または DHA を併用することにより、抗がん剤の濃度を低く抑えても十分な抗がん効果を期待できることが判明した。

第三章においては、n-3 PUFA を EPA に限定し、PC3 に対する EPA の作用メカニズムを確認した。

まず、細胞周期の影響を排除するために 24 時間の血清飢餓条件を追加した上で EPA の効果を確認し、さらに EPA が PC3 に対して経時的にどのように影響を与えているかを確認した。これらの結果を基に二種類の抗体アレイを用いて網羅的にアポトーシスと細胞増殖に関するリン酸化タンパク質を検出した。アレイの結果からアポトーシスシグナルの最終産物であるカスパーゼの活性化は生じないと推測された。この結果から、通常のアポトーシスとは異なる機序による細胞増殖抑制を疑い、Reactive Oxygen Species(ROS)による細胞死について検討した。ROS の消去剤である *N*-acetyl cysteine(NAC)を用いて EPA と同時に添加することで EPA の生細胞数減少効果が消失することが示された。以上より、EPA が PC3 に対して抗がん効果を示すためには ROS の存在が重要な因子であることが判明した。さらにリン酸化タンパク質に関する抗体アレイの結果、多数のリン酸化タンパク質の発現レベルの変動が認められた。この結果から、複数の細胞増殖刺激および抑制シグナルが複雑に増減することが判明した。これらの中でもより大きく抑制された細胞増殖に関与する Pyk2-Src-ERK の経路に注目し、Pyk2 と ERK のリン酸化に関してウェスタンブロットによって確認した。その結果、ERK のリン酸化が時間によって変動する一方で、Pyk2 のリン酸化が 0.5~4 時間で抑制されることが判明した。またこの時使用した Pyk2 のリン酸化を識別する抗体は Pyk2 が Src を活性化する際に必要なリン酸化サイトを認識する。今回の検討で、このリン酸化部位の活性化が EPA によって抑制されていることが判明した。抗体アレイの結果においても Src のリン酸化が抑制されていることから、Pyk2 のリン酸化抑制によって、Src および ERK のリン酸化抑制に繋がったと考えられる。さらに NAC の同時添加で ROS の影響を除去した条件下でも、EPA は Pyk2 のリン酸化を抑制した。よって EPA の Pyk2 のリン酸化抑制効果は細胞内の ROS レベルとは独立した作用であることが判明した。

以上より、n-3 PUFA を抗がん剤と併用することで、抗がん剤の濃度を低く抑えながら、より強い抗がん作用を発揮できることが判明した。また、EPA の作用機序として ROS を介した生細胞減少効果と細胞増殖に関与する Pyk2-Src-ERK 経路の活性化抑制が同時に生じることで、PC3 細胞の増殖、転移および浸潤抑制効果に繋がるということが判明した。これら結果は、CRPC に対する低コストかつ抗がん剤濃度を低く抑えることによる副作用低減を同時に望める、新規治療戦略の基礎的検討に位置づけられる。

Abstract

Keiichi Oono

In recent years, cancer is the most leading cause of death in Japan, and its incidence is steadily increasing. The establishment of therapeutic strategy of cancer is one of the urgent issues.

Current advances in medical care developed the new therapy of cancer including molecular targeted drugs. Although it brought much benefits to the patient with cancer, and in parallel increased health care costs. The direct cost of cancer therapy is very high and the first place in all diseases, leading bankruptcy of national health insurance system as a basis of Japanese medical system. Cancer therapy is confronting the turning point from the viewpoint of health care costs. In this study, we focused our attention to the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) on prostatic cancer cells. EPA and DHA are classified as supplements, switch OTC and prescription drugs in the medical field. In recent years, anticancer effects of EPA and DHA on several types of cancers have been reported. In this study, I choosed prostate cancer cell as a target of EPA and DHA. Although prostate cancer responds to anti-androgen therapy in the beginning of treatment, the cancer becomes resistant to anti-androgen therapy after several years, and the cancer with the resistance called castration-resistant prostate cancer (CRPC). Currently, there are few drugs available for CRPC, and the prostate cancer with metastasis is poor prognosis. I searched for the possibility that EPA, DHA could lead to new therapeutic strategy of CRPC.

In the first chapter, I examined whether EPA or DHA suppresses proliferation, metastasis and invasion of PC3 cells characterized by CRPC. As a result, EPA and DHA alone reduced concentration-dependently the number of viable cells. The minimal effective concentrations of EPA and DHA was $\sim 500 \mu\text{M}$, and the concentration is physiologically available by regular taking of n-3 PUFA tablets. I also observed the effects of EPA and DHA on migration and invasion of PC3 cells. EPA and DHA suppressed both metastasis and invasion of PC3 cells in the concentration range that does not affect the number of viable cells. Therefore, these results showed that EPA and DHA have the suppressive effects on proliferation, metastasis and invasion of PC3 cells.

In the second chapter, I searched for drugs that showed anticancer effects on CRPC, and examined the combination effects of these drugs with EPA or DHA. The anticancer drugs used in these examinations were 5-FU, Doxorubicin, Etoposide, Cyclophosphamide and Paclitaxel. Although the minimal effective concentrations were different, each drug showed the anticancer effects on PC3 cells. Furthermore, in combination experiments of these drugs with EPA and DHA, the possibility of enhancing the action of anticancer drugs was demonstrated by the combinations in the most cases. These results were evaluated using calculated Combination Index (CI). Although the antagonistic effect was observed in a very few cases of combinations from the CI results, moderate or prominent synergistic effects were recognized in most cases. Next, I compared the anticancer effect induced by the maximal concentration of each drug and the anticancer effect induced by the

combination each drug at lower concentration combined with EPA or DHA. The results showed that the anticancer effects induced by combination of a drug with EPA or DHA at 50 μ M exceeded the maximal effects of single anticancer drug treatments at the highest concentrations used in the experiments. Therefore, combination use of n-3 PUFAs for the treatment of malignant disease including CRPC could reduce the dose of anticancer drug without the reduction of anticancer effects.

In the third chapter, I investigated the mechanisms of anticancer effects of EPA on PC3 cells. At first I observed the effects of EPA on PC3 cells in serum-free medium for 24 h for removing the effect of cell cycle, and detected the time course of the anticancer effects. I used two kinds of antibody arrays, apoptosis array and phosphor-kinase protein array. The results from the apoptosis array suggested that EPA did not increase the expression level of caspase 3. Then it may be speculated that ROS induced cell death via a pathway independent of caspase-induced apoptosis may be involved. We next analyzed the contribution of ROS to the effects of EPA on PC3 cell survival, and found that the treatment with both EPA and a ROS eliminator, N-acetyl cysteine(NAC) restored the survival rate to the control level. Thus, NAC abrogated the anticancer effect of EPA on PC3 cells. Then existence of ROS induced by EPA is an important factor for inducing anticancer effect of EPA.

We also investigated the contribution of cell proliferation pathways to the anticancer effects of EPA using a phosphokinase antibody array. The results showed the change of expression levels of many phosphokinase proteins relating the stimulation and inhibition of cell proliferation. I focused the attention to the most suppressed phosphorylated protein, Pyk2 and Pyk2-Src-ERK pathway, and confirmed the effect of EPA on the phosphorylation of Pyk2 and ERK. Western blotting showed that phosphorylation of Pyk 2 was suppressed from 0.5 to 4 hours, whereas the changing of the phosphorylation levels of ERK was complex between 0.5~4 h. The antibody used in this experiment detected phosphorylated tyrosine 402 of Pyk2, which is necessary for Src activation. It was revealed that activation of this phosphorylation site was suppressed by EPA. As phosphorylation of Src is also suppressed in the result of the antibody array, it may be speculated that the suppression of activation of Pyk 2 leads to suppression of phosphorylation of Src and ERK. Furthermore, treatment of NAC for excluding ROS did not affect the inhibitory effect of EPA on Pyk2 phosphorylation. The results suggested that the inhibitory effect of EPA on Pyk2 phosphorylation was independent of levels of ROS in PC3 cells. The present study suggests the possibility that the dose of anticancer drugs can be reduced co-using n-3 PUFAs, and side effects of cancer chemotherapy could be decreased.

In conclusion, our results demonstrate that EPA induced cell death by stimulating ROS production in PC3 cells, and suppressed Pyk2-Src-ERK system induced inhibition of cell proliferation, migration, and invasion. These findings provide a basis for the development of novel therapeutics with low cost and adverse effects for the treatment of CRPC.

論文審査の結果の要旨

がんは我が国の死因の第一位であり、その克服は非常に大きな課題となっている。前立腺がんは、加齢に伴って発症頻度が増加し、その罹患率は世界的に増加傾向にある。前立腺がんは、治療開始初期にはアンドロゲンの分泌抑制や受容体遮断によるホルモン療法が奏効するものの、時間の経過とともにホルモン療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）となる。現在、CRPC の治療薬の選択肢は少なく、さらに転移を伴った場合の予後は非常に悪い。魚油成分中に含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸（n-3 PUFA）であるエイコサペンタエン酸（EPA）およびドコサヘキサエン酸（DHA）は、脂質異常改善を目的とした医薬品やサプリメントとして使用される一方、基礎研究において、前立腺がん細胞を含む複数のがん細胞に対する増殖抑制効果を有することが報告されている。

本研究において大野恵一氏は、EPA および DHA が CRPC の新規治療戦略の発展に寄与する可能性について、CRPC の性質を持つヒト前立腺がん細胞株である PC3 細胞を用いた *in vitro* の実験系にて検証し、その結果を三章構成で論じている。まず第一章において、PC3 細胞の増殖および転移、浸潤に対する EPA、DHA の単独作用を検討した上で、第二章では EPA、DHA と既存の抗がん剤との併用による PC3 細胞の増殖抑制効果について評価を行っている。さらに第三章では、アポトーシスおよび細胞増殖に関するリン酸化タンパク質活性を網羅的に評価し、EPA が持つ抗がん作用機序を検証している。以下に、各章の実験項目とその結果および考察とともに審査内容の概要をまとめた。

第一章では、PC3 細胞の増殖および転移、浸潤に対する EPA、DHA の単独作用を、これらを培養培地に添加することによって検討した。その結果、EPA および DHA は、いずれも PC3 細胞の生存率を濃度依存的に低下させることが明らかになった。さらに、Migration assay と Invasion assay を行い、遊走、浸潤に対する効果についてそれぞれ検討したところ、EPA、DHA は共に、細胞生存率に影響しない低濃度において PC3 細胞の遊走および浸潤を抑制した。EPA および DHA の有効濃度は、ヒトにおいてこれらの既存製剤を服用した際の血中濃度の範囲内であったことを踏まえ、本章の結果から、EPA および DHA は臨床応用可能な用量で CRPC の増殖および転移、浸潤抑制効果を示す可能性が期待できると考察した。

第二章では、作用機序の異なる数種類の抗がん剤と EPA、DHA との併用効果を検討した。CRPC に対して臨床適応外の 5-フルオロウラシル、ドキシソルビシン、エトポシド、シクロホスファミド、パクリタキセルについて、PC3 細胞の生存率に対する作用を検証したところ、シクロホスファミドを除く 4 薬剤は、効果の程度には差はあるものの、生存率を低下させることが明らかになった。これらの抗がん剤と EPA または DHA を併用した場合、ほとんどの組み合わせにおいて作用の増強または増強傾向が認められたが、より強い効果を得るためには EPA、DHA、抗がん剤の濃度の設定が重要であると考えられた。得られた結果をもとに、コンビネーションインデックス（CI）を用いて併用効果について解析した

ところ、多くが相乗作用であった。本章の結果から、EPA、DHAを併用することによって抗がん剤の効果が増強されることから、より低用量で抗がん剤の効果をえられる可能性が示された。したがって、抗がん剤の投与量の低減により副作用の軽減も期待できることが示唆された。

第三章では、PC3細胞に対するEPAの抗がん作用機序を検証した。まず、抗体アレイによってアポトーシスと細胞増殖に関するリン酸化タンパク質活性を網羅的に評価した。アポトーシスに関する抗体アレイの結果から、EPAは、アポトーシスシグナルの最終産物であるカスパーゼの活性化を誘導しないことが推察されたため、通常のアポトーシスとは異なる細胞増殖抑制機序として、活性酸素種(ROS)を介した細胞死に注目して検討した。PC3細胞の培養培地にROS消去剤である*N*-acetyl cysteine(NAC)をEPAと同時に添加するとEPAによる細胞生存率の低下作用が消失したことから、EPAの抗がん作用にはROSが介在することが示唆された。さらに、細胞増殖に関するリン酸化タンパク質の抗体アレイの結果、EPAにより複数の細胞増殖刺激および抑制シグナルが複雑に増減していることが明らかになったが、中でもproline-rich tyrosine kinase-2(Pyk2)-Src-extracellular signal-regulated kinase(ERK)経路がより顕著に抑制され、Western blot法によってもこのことが確認された。NACを同時添加した条件下においても、EPAはPyk2のリン酸化を抑制したことから、EPAによるPyk2-Src-ERK経路の抑制にはROSは関与しないことが示唆された。本章の結果から、EPAの抗がん作用の一部には、ROSを介した細胞死の誘導およびPyk2-Src-ERK経路の抑制の二つが寄与していると結論付けた。

以上、本論文では、n-3 PUFAであるEPAおよびDHAがPC3細胞の増殖、および転移、浸潤抑制効果を示すこと、EPA、DHAを抗がん剤と併用することにより相乗的な細胞増殖抑制効果が得られることを明らかにした。また、EPAの抗がん作用機序として、ROSを介した細胞死の誘導および細胞増殖に関わるPyk2-Src-ERK経路の抑制が関与することを明らかにした。本研究は、栄養成分であり、治療薬としても利用されるn-3 PUFAがCRPCに対する低コストで安全性に優れた抗がん剤治療の実現のために貢献できる可能性を示した初めての報告であり、がんの新規治療戦略のための有用な基礎的知見を提供している。よって、本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科課程による博士(薬学)論文に十分値すると判断した。