

アンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株における細胞増殖並びに転移・浸潤に
及ぼす n-3 系多価不飽和脂肪酸の影響

大野 恵一

目次

略語一覧	・・・1
総論の部	
緒言	・・・3
第一章 n-3 系多価不飽和脂肪酸によるアンドロゲン非依存性前立腺細胞株に 対する増殖並びに浸潤・転移抑制効果	
第一節 小緒言	・・・8
第二節 実験方法	
1-2-1 試薬	・・・10
1-2-2 試薬調製	・・・10
1-2-3 細胞培養	・・・10
1-2-4 細胞増殖	・・・11
1-2-5 Migration アッセイ	・・・11
1-2-6 Invasion アッセイ	・・・11
1-2-7 統計解析	・・・12
第三節 結果	
1-3-1 PC3 細胞の増殖に及ぼす EPA、DHA の影響	・・・13
1-3-2 PC3 細胞の移動能に及ぼす EPA、DHA の影響	・・・14
1-3-3 PC3 細胞の浸潤能に及ぼす EPA、DHA の影響	・・・16
第四節 小括	・・・18

第二章 n-3 系多価不飽和脂肪酸によるアンドロゲン非依存性前立腺細胞株に対する抗がん剤の効果と併用効果における増殖抑制効果

第一節 小緒言	・・・ 20
第二節 実験方法	
2-2-1 試薬	・・・ 22
2-2-2 試薬調製	・・・ 22
2-2-3 抗がん剤単独における PC3 細胞の増殖への影響	・・・ 22
2-2-4 抗がん剤と EPA、DHA の併用による PC3 細胞の増殖への影響	・ 23
2-2-5 抗がん剤と EPA、DHA の併用における相乗、相加、拮抗効果の判定	・・・ 23
2-2-6 抗がん剤単独、並びに EPA、DHA 併用における効果の判定	・・・ 23
2-2-7 統計解析	・・・ 24
第三節 結果	
2-3-1 抗がん剤単独における PC3 細胞の増殖への影響	・・・ 25
2-3-2 抗がん剤と EPA、DHA の併用による PC3 細胞の増殖への影響	・ 29
2-3-3 抗がん剤と EPA、DHA の併用における相乗、相加、拮抗効果の判定	・・・ 35
2-3-4 抗がん剤単独、並びに EPA、DHA 併用における効果の判定	・・・ 37
第四節 小括	・・・ 38

第三章 アンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株における n-3 系多価不飽和脂肪酸が及ぼす抗がん機構の検討

第一節 小緒言	・・・ 41
第二節 実験方法	

3-2-1	試薬	．．．43
3-2-2	試薬調製	．．．43
3-2-3	細胞培養	．．．43
3-2-4	PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の効果	．．．44
3-2-5	PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の Time course	．．．44
3-2-6	PC3 細胞のアポトーシスおよびリン酸化シグナルへ EPA が及ぼす 影響	．．．45
3-2-7	ROS inhibitor 存在下における EPA の細胞増殖に及ぼす影響	．．．45
3-2-8	細胞増殖に関するタンパクのリン酸化に及ぼす EPA の効果	．．45
3-2-9	統計解析	．．．46
第三節 結果		
3-3-1	PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の効果	．．．47
3-3-2	PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の Time course	．．．48
3-3-3	PC3 細胞のアポトーシスおよびリン酸化シグナルへ EPA が及ぼす 影響	．．．49
3-3-4	ROS inhibitor 存在下における EPA の細胞増殖に及ぼす影響	．．．54
3-3-5	細胞増殖に関するタンパクのリン酸化に及ぼす EPA の効果	．．55
第四節	小括	．．．59
結論		
		．．．64
謝辞		
		．．．65
参考文献		
		．．．66

略語一覧

本論文中では、以下に示す記号を略語として用いた。

5-FU 5-フルオロウラシル

ADMT androgen deprivation monotherapy

AR アンドロゲン受容体 (androgen receptor)

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

CAB combined androgen blockade

CI コンビネーションインデックス (combination index)

CPA シクロフォスファミド (cyclophosphamide)

CRPC 去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer)

DHA ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid)

DMSO ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)

DOX ドキソルビシン (doxorubicin)

eNOS endothelial nitric oxide synthase

EPA エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid)

EPT エトポシド (etoposide)

ERK1/2 extracellular signal-regulated kinase 1/2

LH-RH 性腺刺激ホルモン放出ホルモン

MLCP ミオシン軽鎖フォスファターゼ (Myosin light-chain phosphatase)MMP9

matrix metalloproteinase 9

M-PER mammalian protein extraction reagent

n-3 PUFA n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 polyunsaturated fatty acid)

NAC N-アセチルシステイン (*N*-acetyl cysteine)

NRTK 非受容体チロシンキナーゼ (nonreceptor tyrosine kinase)

p-ERK1/2 phospho- extracellular signal-regulated kinase 1/2

p-Pyk2 phospho-Proline-rich tyrosine kinase-2

PTX パクリタキセル (paclitaxel)

Pyk2 proline-rich tyrosine kinase-2

Rho キナーゼ Ras homolog gene family kinase

RIP receptor-interacting protein kinase

ROCK Rho-associated coiled-coil kinase

ROS 活性酸素種 (Reactive oxygen species)

RSK1/2/3 ribosomal S6 kinases 1/2/3

RTK 受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase)

SMAC second mitochondria-derived activators of caspase

STAT3 signal transducer and activator of transcription 3

sTNF-R2 可溶性腫瘍壊死因子レセプター2 (soluble tumor necrosis factor receptor 2)

TRAIL-R1 tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 1

総論の部

緒言

脂質とは三大栄養素の一つである。脂質の主要構成分子である脂肪酸は一般的に炭素鎖を持ち、その末端にカルボキシル基を持つ構造をしている。この炭素鎖の長さによって短鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸に分類される。さらに炭素鎖の炭素数によって、異なる種類が存在する。本研究で、用いた脂肪酸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) は、n-3 PUFA に分類される。EPA は炭素鎖 20 の中に五箇所の二重結合を持ち、DHA は炭素鎖 22 の中に六箇所の二重結合を持つ。EPA、DHA 共に海洋生物の多くが豊富に持つ脂肪酸であり、特に魚油の主成分として知られている。昨今、サプリメントの主成分としても多くの製品に用いられる他、臨床の場においても現在、末端のカルボキシル基がエチルエステル化された製剤が高脂血症治療薬として処方せん医薬品に指定されている。また、第一類医薬品、スイッチ OTC としても販売されている。これら n-3 PUFA である EPA、DHA の作用として報告されているものは、血清脂質低下、リポタンパク代謝作用 (1, 2)、閉塞性動脈硬化症に伴う冷感、疼痛、潰瘍の治療効果である。一方、副作用として主なものは出血傾向、肝機能障害、消化器症状等である。また、心血管系に対する作用として心血管系イベントの抑制効果 (3, 4, 5)、冠状動脈疾患の患者におけるアテローム性動脈硬化症の進行遅延 (6)、コラーゲンによる血小板凝集の阻害 (7)、ウサギにおける血管動脈壁の進展性を改善する (8)、及び血管平滑筋の弛緩効果 (9) などが報告されて

いる。近年、これらの効能に加えてがんの抑制効果が報告されるようになった。我が国で行われた大規模疫学調査においても n-3 PUFA 摂取量が多いほど肝臓がん発症抑制効果が大きいというエビデンスを得ている (10)。さらに臨床における重要ながんの悪液質改善作用に関しては肯定的なものばかりではないが、複数の報告がなされている (11, 12, 13, 14)。このように n-3 PUFA のがんやそれに関連する病態に対する効果が認知されつつある。その、がんに対する効果に関しては種々の報告があり (15)、乳癌 (16, 17)、神経芽細胞腫 (18)、肝臓癌 (19)、結腸直腸癌 (20)、結腸癌 (21)、B 細胞慢性リンパ球性白血病 (22) などにおいては、細胞実験でその効果が実証されている。

近年、日本の死因第一位はがんとなった (23)。がんとは正式名称を悪性新生物と言い、自己の細胞が何らかの原因で DNA に異常を来し、無制限な増殖と転移を伴う致死性の病である。Ras などに代表される細胞を増殖させるために必要な遺伝子に変異することによって産まれるがん原遺伝子の活性化 (24)、p53 などに代表される細胞の異常を検知し細胞を死に向かわせるためのがん抑制遺伝子が抑制され (24, 25)、細胞周期の調節が失われることによってがん化の第一段階が起こる。この遺伝子の変異の段階をイニシエーションと言う。このイニシエーションの原因はウイルス感染、放射線被曝、薬物刺激など多岐にわたる (26, 27)。がん原遺伝子は本来細胞の増殖に関与し、個体の発生や分化時などにおいて、活発にその生理的機能を発現させている (28, 29, 30)。がん抑制遺伝子は本来細胞が過増殖もしくは何らかの刺激に対して細胞の生存が不都合、ないし不可能になった場合に細胞を死滅させるために働くものが多い。これには細胞周期の停止や細胞の自殺であるアポトーシスが関与する。細胞のがん化においては、イニシエーションに続いてさらに遺伝子に変異を起こし、細胞周期の歯止めがかからなくなり、変異した細胞が増殖を開始する。この無制限な増殖を開始し

た段階をプロモーションといい、この段階では発生したがん化細胞は臓器内に留まっている。この段階からさらなる遺伝子の変異などが蓄積し転移能を獲得するプログレッションという過程を経ることで一般的に知られる悪性度の高いがんに至る (31)。

本研究においては種々のがんの中で、前立腺がんに着目した。前立腺がんは男性特有の器官である前立腺に発症するがんであり、加齢に伴い発症頻度が増加する。また、2003年には部位別罹患率が3位であり、その後も男性における代表的ながんの地位を占めている(32)、日本における前立腺がんの死因簡単分類別に見た死亡率は2017年において人口10万人対で19.8人であり漸増している(23)。また、世界的にも前立腺がんは増加傾向にある(33)。前立腺がんの治療は主に内分泌療法が適応となるが、この内分泌療法はHugginsらによって既に1941年に報告され、この時には外科的去勢とエストロゲン投与が有効であったとされている(34)。現在、前立腺がんの治療薬は抗アンドロゲン作用を持つ薬が主流である。これは前立腺がん細胞がアンドロゲン受容体(AR)を介して増殖することに起因する。内分泌療法の目的は、このARの基質であるアンドロゲンの作用を遮断することである。アンドロゲンは精巣由来で分泌されるものと副腎より分泌されるものがあるため、内分泌療法は精巣由来のアンドロゲンを遮断する去勢単独療法ADMT (Androgen Deprivation Monotherapy) と、副腎を含めて複合的にアンドロゲンを遮断する複合アンドロゲン遮断療法CAB (Combined Androgen Blockade) に分かれる(35, 36)。特にCAB療法は、ADMTと比較して有効性が高く、標準治療として推奨される(37)。これらの治療には性腺刺激ホルモン放出ホルモン(LH-RH)アゴニストやLH-RHアンタゴニストのようなLH-RH誘導体、ビカルタミドやフルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン薬などが用いられる(38, 39)。このような内分泌療法は治療開始初期の

奏効率が高い。また、前立腺がんの好発転移部位は骨であり、次に脳転移が多い。転移のある患者では CAB 療法の優位性は立証されておらず (37)、その他の治療法として、骨転移患者においては塩化ラジウム (^{223}Ra ; ゴーフィゴ[®]) を静脈投与することでがん細胞の DNA を α 線によって切断し、がん細胞を破壊する治療も内分泌療法と併用される (40)。投与は転移を有する前立腺がんにおいて生存期間を延長し、骨関連イベントまでの期間を延長させることが、海外の大規模無作為化比較試験で実証された (37, 41)。また骨転移に伴う骨疼痛に対しては従来のがんの転移に伴う緩和治療を行うが、十分な疼痛管理が困難な場合には鎮痛補助役として、造骨性転移を起こす前立腺がんの特徴に合わせて β 線を出すストロンチウム 89 を投与することがある (40)。しかし、このような治療を行っても遠隔転移を起こした患者の予後は悪い。また前立腺がん患者は高齢者が多く、抗がん剤の副作用などの身体的負担に耐えられない患者も多い。さらに、内分泌療法開始後から数年が経過すると前立腺がんは内分泌療法に抵抗性を示すようになる。また、本来前立腺がんの増殖を抑制する抗アンドロゲン薬が前立腺がんの増殖を促すように働く **Androgen withdrawal syndrome** がコホート研究によって明らかにされている (42)。このように本来前立腺がんにも有効であった内分泌療法に抵抗性を示すようになった前立腺がんは去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) と呼ばれ (43, 44, 45)、現在の日本で CRPC の治療に使用する抗がん剤はエンザルタミド、アピラテロンの新規抗アンドロゲン薬、タキサン系抗がん剤であるドセタキセル、カバジタキセルであり治療薬の選択肢は少ない (46, 47)。

本研究の目的は治療法の限られている CRPC の治療に n-3 PUFA を用いることで CRPC の新規治療の可能性を見出すことである。さらに n-3 PUFA は前立腺癌の発症を抑制する可能性が示されており (48)、EPA および DHA も前立腺癌細胞に対して増殖抑制効果を有することが判明している (49, 50)。本研究では骨転

移の患者から樹立した前立腺がん細胞である PC3 を用いて、*in vitro* の系で n-3 PUFA の有効性を検討した (51)。この PC3 細胞は AR が失活しており、CRPC の状態となっている前立腺がん細胞株である。第一章では、n-3 PUFA である EPA、DHA が単独で PC3 細胞の増殖、転移・浸潤にどのような影響を与えるかを検討するとともに、EPA、DHA が生理的な血中濃度範囲で効果を示すか否かを検討した。第二章では、第一章の結果から n-3 PUFA を既存の抗がん剤と併用した場合に、相乗効果を発揮できるか否かを検討した。CRPC の既存治療では内分泌療法薬以外ではタキサン系抗がん剤のみが用いられるが、第二章においては、本来適応がない抗がん剤を用い、これらの薬剤が単独で PC3 細胞に増殖抑制効果を認めるのか否か、そして、それら抗がん剤と n-3 PUFA を併用することで、その増殖抑制効果がさらに増強するか否かを検討した。これらの検討により、現時点では適応がない抗がん剤の効果、また、それらと n-3 PUFA を併用することによる利点を明らかとした。第三章では第一章、第二章で判明した n-3 PUFA の抗がん効果のメカニズムを解明することを目的とした。細胞内のシグナル伝達は膨大な数に及ぶため、抗体アレイを用いて複数のシグナルを確認した。アレイによる検討から通常のアポトーシス経路からのカスパーゼの活性化を伴った細胞死とは別の活性酸素種 (ROS) による細胞死を検証し、さらに細胞死だけではなく、細胞の増殖に関するシグナルを追うことで n-3 PUFA が持つがんに対するメカニズムの一端を追求した。

第一章 n-3 系多価不飽和脂肪酸によるアンドロゲン非依存性前立腺細胞株に対する増殖並びに浸潤・転移抑制効果

第一節 小緒言

がん細胞の増殖を抑制することは非常に重要な治療戦略である。さらには、がん細胞の増殖とともに転移・浸潤が生じることは患者の生命予後に大きく影響する。がん細胞は原発巣で増殖した後、原発巣から離れ、転移先の臓器において再度増殖を開始し、転移巣を形成する。転移は血行性転移、リンパ行性転移、管腔性転移に分類される (52, 53, 54)。そのメカニズムは共通性があり、原発巣での増殖、原発巣からのがん細胞の離脱と脈管への浸潤、脈管内での移動、転移臓器、標的臓器の血管内皮への接着、転移臓器への浸潤、転移臓器内での増殖という過程から構成され、この過程が患者の免疫監視機構から逃れてがん細胞が生存するなど全ての過程が連続して起こることが条件である。転移に至らないがんは新規治療法の確立、新規薬物の登場などで予後が良好であることが多い。そのため、この転移の有無は、がん患者の生命予後に関して大きな意味を持つ (55, 56)。そして、これは前立腺がんも同様である。

数多くの研究は EPA、DHA の持つがんの増殖抑制効果に着目している。本章においては、その増殖抑制効果のみならず転移・浸潤抑制効果にも着目した。

まず本章では、EPA、DHA が単独で細胞の増殖抑制効果を示すかを、血球計算盤とトリパンプルーを用いた生細胞数の計測を行うことで、EPA、DHA が濃度依存的な生細胞数の減少を認めるかを検討した。さらに、その結果からダブルチャンバー法による Migration assay と Invasion assay を用いることで、EPA、DHA

の持つ転移・浸潤能の抑制効果を評価した。これは細胞より小さな細孔を持つ膜を用いて、細胞に過酷条件と増殖に都合の良い条件を同時に用意することによって、その細胞の移動能を試験する方法であり、また、膜に特殊なゲルを固定することによって簡便に細胞の浸潤能を試験する方法である。

第二節 実験方法

1-2-1 試薬

PC3 細胞を国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター (茨城, 日本) より購入した。EPA、DHA を Sigma Aldrich (St. Louis, U.S.A) より購入した。マトリゲル基底膜マトリックス (以下、マトリゲル) を Corning (NY, U.S.A) より購入した。リン酸緩衝液(PBS)、RPMI1640 培地、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液、ウシ血清アルブミン (BSA) 、特級 Isopropanol、一級メタノール は Wako (大阪, 日本)より購入した。クリスタルバイオレット液は林純薬工業より購入した。

1-2-2 試薬調製

EPA、DHA は Isopropanol に溶解した。Isopropanol に溶解させた EPA,DHA は -30°C 以下で保存した。その後 3% BSA 含有 RPMI1640 培地に添加し、ソニケーションにより完全に溶解させた。

1-2-3 細胞培養

PC3 細胞を 5% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンの濃度になるよう調整した RPMI1640 培地で培養した。細胞は一日または、二日おきに培地を交換し、60~70%コンフルエントに達したとき培地をアスピレータで除去し PBS で二回洗浄後、Trypsin 溶液を用いて継代した。培養は CO_2 インキュベータ内にて 5% CO_2 、 37°C の条件下で細胞を培養した。

1-2-4 細胞増殖

PC3 細胞を 3×10^5 cells/well となるよう 6 well-plate に播種し、24 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行った。24 時間後 PBS で二回細胞を洗浄し、無血清培地に交換後 EPA、DHA を最終濃度 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。再度 24 時間培養を行い、Trypsin で剥離し、血球計算盤で細胞数を計測した。

1-2-5 Migration アッセイ

24 well-plate、Cell Culture Insert (Corning, NY, U.S.A) を用いて行った。上方となる Cell Culture Insert に PC3 細胞懸濁液を無血清条件で 5×10^4 cells/mL 入れ、下方となる 24 well-plate には 10%FBS 含有 RPMI1640 培地を入れた。この時上方には、EPA、DHA をそれぞれ 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した。24 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行った。その後、メタノールで細胞を固定しクリスタルバイオレットで染色し、顕微鏡にて Cell Culture Insert メンブレンのポアを通過し、メンブレン底部に付着した細胞を計測した。

1-2-6 Invasion アッセイ

24 well-plate、Cell Culture Insert を用いて行った。上方となる Cell Culture Insert にマトリゲルを入れ CO₂ インキュベータ内で 90 分固定した。マトリゲルの固定後、PC3 細胞懸濁液を無血清条件で 1×10^5 cells/mL 入れ、下方となる 24 well-plate には 10%FBS 含有 RPMI1640 培地を入れた。この時上方には、EPA、DHA をそれぞれ 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した。40 時間 CO₂ インキュベータにて

培養を行った。その後、メタノールで細胞を固定しクリスタルバイオレットで染色し、顕微鏡にて Cell Culture Insert メンブレンのポアを通過し、メンブレン底部に付着した細胞を計測した。

1-2-7 統計処理

全ての統計解析は R version 3.4.3 (R Core Team 2017)を用いて行い、Dunnett の検定にて有意差を判定した。

第三節 結果

1-3-1 PC3 細胞の増殖に及ぼす EPA、DHA の影響

EPA、DHA は PC3 細胞に対し濃度依存的な生細胞数の減少効果を認めた (Figure 1, 2)。EPA、DHA は共に 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では対照群と比較して生細胞数の減少を示さないが、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から、その生細胞数を有意に減少させ、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では著明に減少させた。

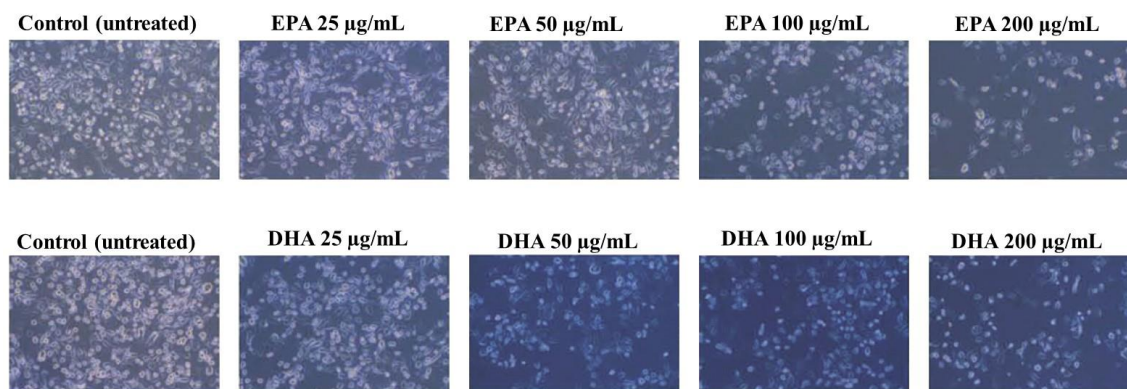


Figure 1. Photomicrographs of untreated and EPA added PC3 cells. The number of surviving cells after 24 h incubation of EPA and DHA concentrations 25 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and untreated cells.

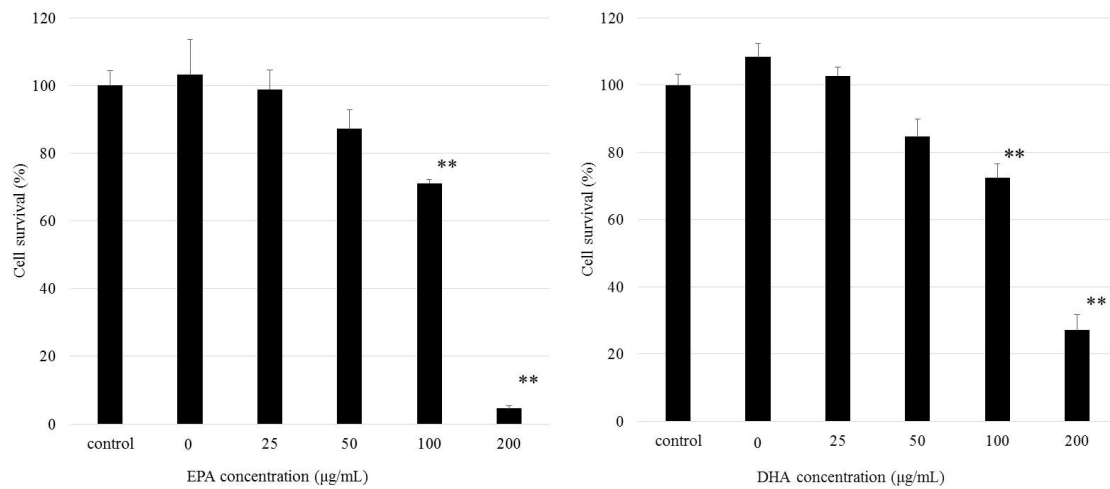


Figure 2. Effect of DHA (right panel) and EPA (left panel) on PC3 cell proliferation. At 24 h after seeding, various concentrations of DHA and EPA (0, 25, 50, 100, 200 µg/mL) were added. Final concentrations of BSA and isopropanol were adjusted in all wells. Data represent mean \pm S.E. (n = 3). **P<0.01.

1-3-2 PC3 細胞の移動能に及ぼす EPA、DHA の影響 (Migration assay)

EPA 及び DHA は増殖に影響を及ぼさない濃度である 25、50 µg/mL で PC3 の移動能を抑制し (Figures 3、4)、EPA と DHA 25 µg/mL では有意差を認めることは出来なかったが、50 µg/mL では有意差を認めた。

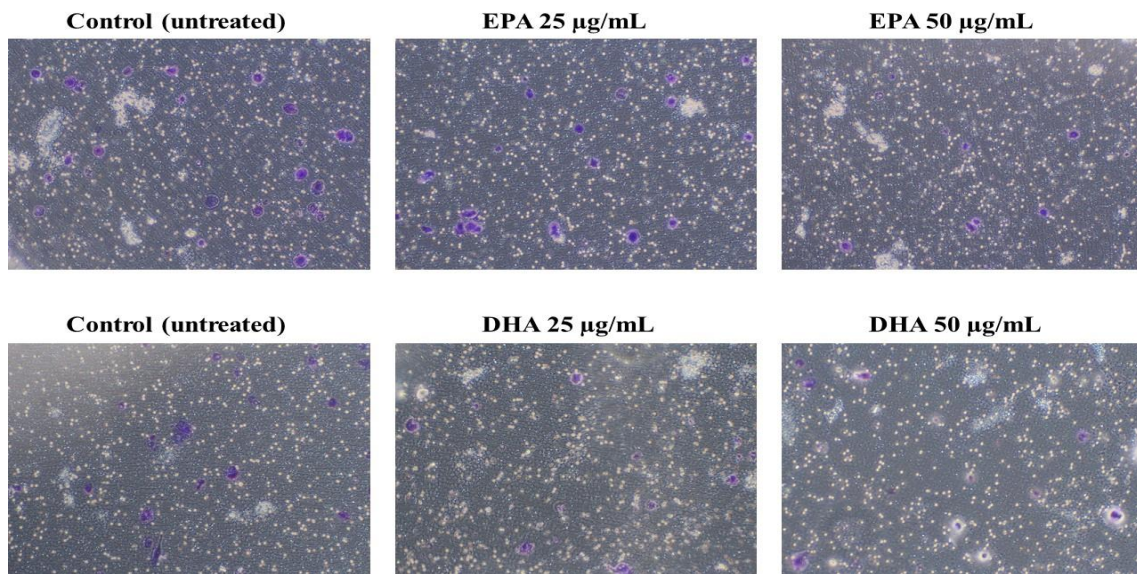


Figure 3. Photomicrographs of untreated and EPA added PC3 cells. PC3 cells and EPA or DHA were placed in cell culture insert and incubated for 24 h. PC3 cells were stained with crystal violet.

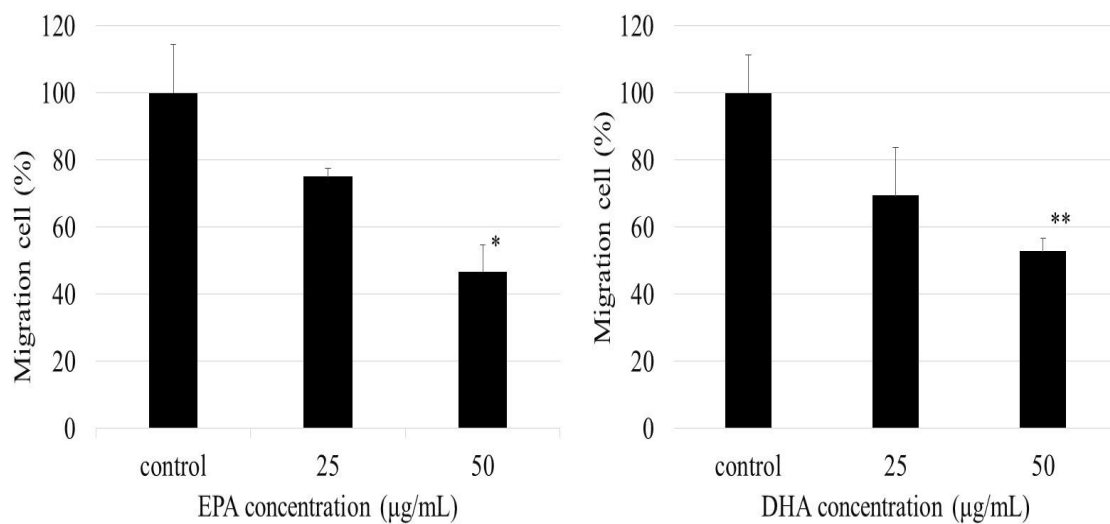


Figure 4. Effect of DHA (right panel) and EPA (left panel) on PC3 cell migration. PC3 cells were seeded in the upper chamber and incubated with various concentrations of DHA or EPA (25 and 50 µg/mL) with 10% FBS supplemented medium in the lower

chamber. After 24 h, the number of migrating cells were counted. Data are presented as mean \pm S.E. (n = 3). *P<0.05, **P<0.01 vs. control PC3 cells.

1-3-3 PC3 細胞の浸潤能に及ぼす EPA、DHA の影響 (Invasion assay)

EPA 及び DHA は PC3 細胞の増殖に影響を及ぼさない濃度である 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で PC3 細胞の浸潤能を抑制し (Figures 5、6)。EPA では 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では浸潤能の抑制に影響しなかったが、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 50 %まで抑制した。一方 DHA は 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において浸潤能を 50 %程度まで有意に抑制した。

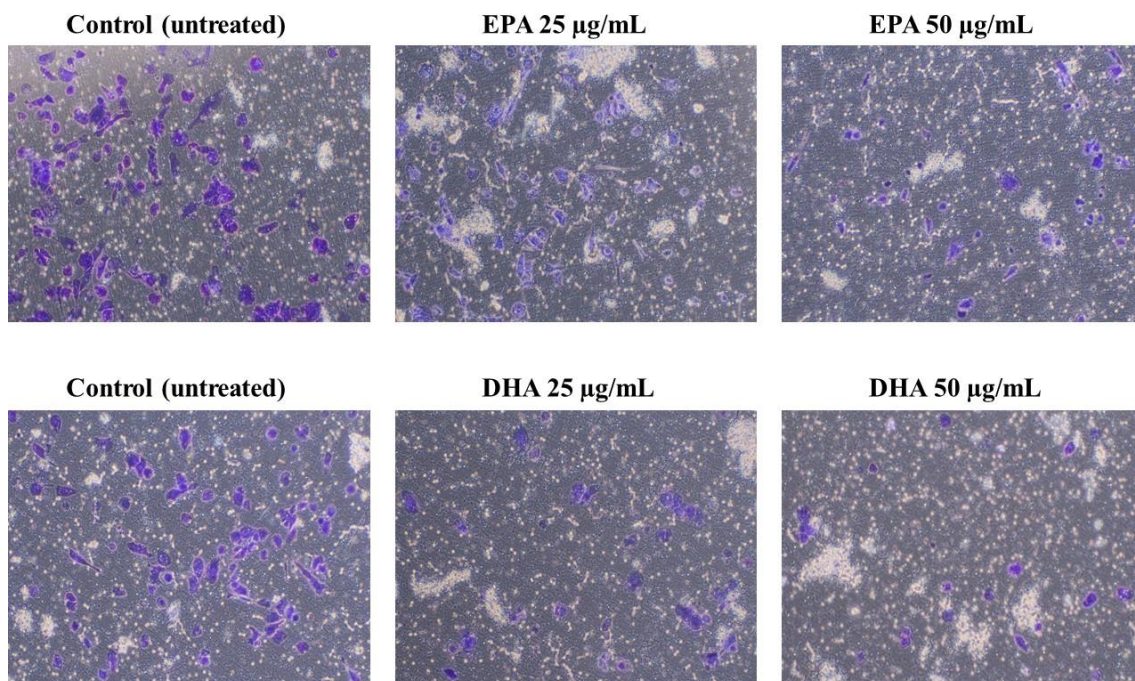


Figure 5. Photomicrographs of untreated and treated PC3 cells. Cell culture insert was coated Matrigel[®]. PC3 cells and EPA or DHA were placed in cell culture insert and incubated for 40 h. PC3 cells were stained with crystal violet.

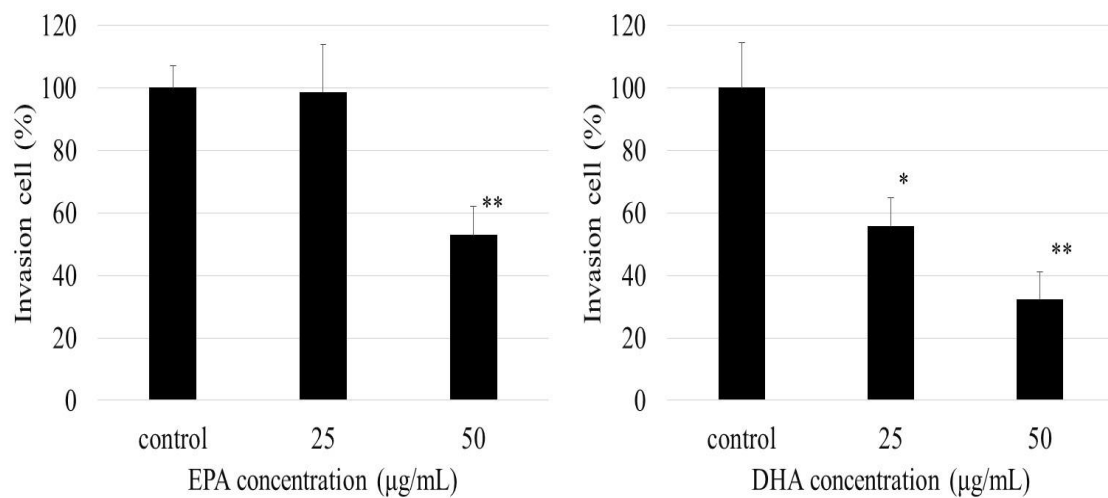


Figure 6. Effect of DHA (right panel) and EPA (left panel) on PC3 cell invasion. PC3 cells were seeded with Matrigel coating in the upper chamber and incubated with various concentrations of DHA or EPA (25 and 50 µg/mL) with 10 % FBS contained medium in lower chamber. After 40 h, the number of invading cells were counted. Data are presented as mean \pm S.E (n = 3). *P<0.05, **P<0.01 vs. control PC cells.

第四節 小括

本章では、EPA、DHA を PC3 細胞に添加することによって、その増殖、転移・浸潤能に影響を与えるか否かを検討した。まず、細胞増殖に対する EPA、DHA の効果を検討した。その結果、EPA、DHA 共に 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では無添加群と比較して顕著な差はなく、EPA、DHA 共に 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で有意に生細胞数を減少させた。また、EPA、DHA が 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではさらに強い生細胞数減少効果を認めた。EPA と DHA の減少を比較すると、生細胞数の減少に関しては今回設定した最高濃度である 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において EPA の効果が DHA の効果を上回った。次に EPA、DHA が増殖に影響しない濃度である 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて Migration assay と Invasion assay を行った。Migration assay では、EPA、DHA 共に同様の傾向で細胞の移動能を抑制した。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では共に有意差を認めることは出来なかったが、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では無添加群と比較して 50 %までその移動能を有意に抑制することが判明した。Invasion assay では、EPA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では無添加群と比較して差がなかったが、EPA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では浸潤能を無添加群と比較して 50 %前後まで有意に抑制した。一方、DHA では、より低濃度の 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても無添加群と比較して 60 %以下まで浸潤能を有意に抑制し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、無添加群と比較して 30 %前後まで浸潤能を有意に抑制した。Invasion assay の結果から、EPA と比較して DHA がより顕著に浸潤能を阻害することが明らかになった。EPA と DHA は共に単独で前立腺がん細胞株 PC3 細胞に対して増殖、転移・浸潤抑制効果を認めるが、両者の効果の差異についてはさらなる検討が必要である。

がん細胞の増殖はもちろんのこと、転移はがん患者の生命予後に大きく関与することは自明であり、その転移を抑制する可能性のある安価な治療法の探索

は非常に重要である。我が国においては EPA、DHA は処方薬として主に血中脂質改善を目的として処方される患者が多い。臨床試験において EPA 製剤を単回 2700mg 服用した場合には最大血中濃度で $150 \pm 60 \mu\text{g/mL}$ 前後まで上昇する(60)。また、DHA と EPA の合剤 4g/日を反復投与することで、EPA、DHA の血中濃度は $200 \mu\text{g/mL}$ 以上まで上昇する(61)。これらの情報から、今回設定した EPA、DHA の濃度設定は臨床的に十分到達可能な濃度である。しかし、転移・浸潤アッセイで用いた EPA、DHA の濃度は 25、 $50 \mu\text{g/mL}$ とさらに低く、EPA、DHA を製剤として服用した後の平均血中濃度推移からも大きく下回ることはない濃度である。この観点からも今回設定した EPA、DHA の濃度設定は生理的な範囲に収まる濃度設定である。

以上の結果から、EPA、DHA は単独かつ生理的な濃度範囲において PC3 細胞に対して濃度依存的な増殖、転移・浸潤抑制効果を持つことが明らかとなった。

第二章 n-3 系多価不飽和脂肪酸によるアンドロゲン非依存性前立腺細胞株に対する抗がん剤の効果と併用効果における増殖抑制効果

第一節 小緒言

第一章にて、EPA および DHA が PC3 細胞に対して濃度依存的な増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。しかし、EPA、DHA 単独または両者の併用で臨床的に必要十分ながんの治療効果を得ることができるか否かは不明である。そこで本章では、数種の作用機序の異なる抗がん剤と EPA、DHA を併用することによる相乗作用、相加作用、拮抗作用の有無を検討した。現在、CRPC の治療に使用できる抗がん剤はタキサン系抗がん薬を除けば、全て抗アンドロゲン作用に関与する内分泌療法薬である。本章で検討する併用効果の結果によっては、既存の抗がん剤と EPA、DHA を併用するといった新規治療戦略を提唱できる可能性がある。また、作用機序に関わらず、EPA、DHA の併用によって抗がん剤の効果が増強され、相乗、ないし相加効果を得るのであれば、根治に至らずとも腫瘍体積の減少などによる延命効果を期待することができる。

細胞の増殖は染色体 DNA の複製から一つの細胞が二つに増えるまでの一連の流れであり、この流れを細胞周期と言い、がんにおいてはこの制御系が働かずに細胞周期が乱れ、無制限に増殖している。現在、臨床で使用されている抗がん剤の多くは、細胞増殖を抑える効果を持つことが多く、細胞周期に影響を与えるものである。本章で用いた抗がん剤のうち四種類は、この効果を持つ。5-フルオロウラシル (5-FU) は、DNA の構成塩基であるチミンと代替して入り込み、DNA ポリメラーゼの伸長反応を停止させ、ドキソルビシン (DOX) は DNA の塩基対間に入り込むことで DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を阻害

し、エトポシド (ETP) は DNA の合成時に発生する超螺旋構造を開裂するトポイソメラーゼを阻害し、シクロフォスファミド (CPA) は DNA の塩基をメチル化することで DNA の合成を阻害する。細胞は分裂するときに二倍になった染色体 DNA を二つの細胞に分けて分裂が完了となる。パクリタキセル (PTX) は、染色体を二つの細胞へと分ける微小管の重合を過形成し、その脱重合を阻害することで有糸分裂を阻害する。これら五種の抗がん剤を用いて本章における実験を行った。これらの抗がん剤は本来、CRPC に適応がない薬剤である。PTX に関しては類縁の薬剤であるドセタキセルとカバジタキセルが適応を持つが PTX には適応はない。他の抗がん剤は泌尿器系のがんにおいて適応を持つもの (62)、また海外研究において CRPC に対してフェーズ 2 の臨床試験が行われたことがある抗がん剤を中心に選択している (63, 64, 65, 66)。本章では、まず初期の検討として、これら抗がん剤を PC3 細胞にそれぞれ単独で添加し、その抗がん剤が増殖抑制効果を示すのか否かを検討する。

次に抗がん剤と n-3 PUFA である EPA または DHA を併用した時の相乗、相加、拮抗効果を検討した。その判定には 1981 年に Chao-Chou 等が提唱したコンビネーションインデックス (CI) を用いた (67, 68, 69)。さらに、今回用いた抗がん剤の単独使用時の最大濃度で得られた結果と併用時の効果を比較することで併用時の効果が各抗がん剤単独かつ最大濃度使用時の効果を上回るか否かについても検討した。

第二節 実験方法

2-2-1 試薬

5-FU、CPA、DOX、ジメチルスルホキシド (DMSO)は Wako より購入した。PTX、ETP は Sigma Ardrich より購入した。LUNA II は LMS (東京, 日本)より購入した。

2-2-2 試薬調整

5-FU、PTX、ETP、5-FU、CPA は全て DMSO にて溶解した。ドキソルビシンは PBS にて溶解し-30 度以下で保管した。全ての抗がん剤は使用時に DMSO または PBS で溶解した。EPA, DHA の調整は第一章第二節 1-2-2 の方法を用いて行った。

2-2-3 抗がん剤単独における PC3 細胞の増殖への影響

3×10^5 cells/well にて PC3 細胞を 6 well-plate に播種し、CO₂ インキュベータにて 24 時間培養した。その後、五種の抗がん剤をそれぞれの濃度で添加した後、再度 24 時間培養を行った。24 時間後、セルカウンターである LUNA II を用いて生細胞数を計測した。

2-2-4 抗がん剤と EPA、DHA の併用による PC3 細胞の増殖への影響

1×10⁵ cells/well にて PC3 細胞を 24 well-plate に播種し、CO₂ インキュベータにて 24 時間培養した。その後、五種の抗がん剤と EPA、DHA をそれぞれの濃度で添加した後、再度 24 時間培養を行った。24 時間後、セルカウンターである LUNA II を用いて生細胞数を計測した。

2-2-5 抗がん剤と EPA、DHA の併用における相乗、相加、拮抗効果の判定

抗がん剤と EPA もしくは DHA を併用した時の濃度をそれぞれ、[D_{AD,EPA}]、[D_{AD,DHA}]、[D_{EPA,AD}]、[D_{DHA,AD}]とし、単独における抗がん剤、EPA、DHA の添加実験において、抗がん剤と EPA、DHA を併用した時と同じ効果を得る濃度をそれぞれ[D_{AD}]、[D_{EPA}]、[D_{DHA}]とし、以下の式を用いて CI を算出した。しかし、抗がん剤及び EPA、DHA との併用によって得られた細胞増殖抑制効果が、抗がん剤単独における効果を上回る場合、単独添加実験において用いた最高濃度を[D_{AD}]として使用した。CI = 1 を相加効果、CI < 1 を相乗効果、CI > 1 を拮抗効果として判定した。また、効果濃度の推定には R の drc パッケージを使用した。

$$\text{Combination Index} = \frac{[D_{AD,EPA}]}{[D_{AD}]} \left(\text{or } \frac{[D_{AD,DHA}]}{[D_{AD}]} \right) + \frac{[D_{EPA,AD}]}{[D_{EPA}]} \left(\text{or } \frac{[D_{DHA,AD}]}{[D_{DHA}]} \right)$$

2-2-6 抗がん剤単独、並びに EPA、DHA 併用における効果の判定

2-2-3 と 2-2-4 から得られた結果より 2-2-3 において本章で用いられた抗がん剤単独添加時の最大濃度で得られた細胞の生存率から 2-2-4 で得られた抗がん

剤と n-3 PUFA の併用時得られた結果の差を求めた。この差が 0 以下を－、0～5 を+、5～10 を++、10 以上を+++として表示した。

2-2-7 統計解析

全ての統計解析は R version 3.4.3 (R Core Team 2017) を用いて行い、Dunnett の検定にて有意差を判定した。また、多群間の比較には Tukey の検定にて有意差を判定した。

第三節 結果

2-3-1 抗がん剤単独における PC3 細胞の増殖への影響

CPA では PC3 細胞に対する効果が弱く、最大濃度である 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても有意な増殖抑制効果を示さなかった (Figure 7)。5-FU は、1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において濃度依存的な細胞数の減少を認めた (Figure 8)。DOX は、0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において濃度依存的な細胞数の減少を認めた (Figure 9)。ETP は、5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において濃度依存的な細胞数の減少を認めた (Figure 10)。PTX は、0.001~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において濃度依存的な細胞数の減少を認め、最小有効濃度は 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Figure 11)。

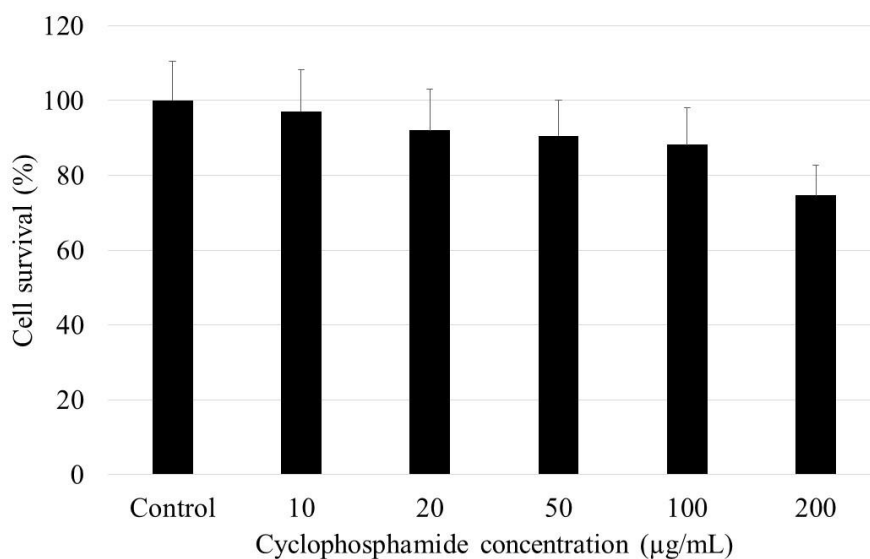


Figure 7. Effect of cyclophosphamide on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug concentrations, and the Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of cyclophosphamide (0

(control), 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added and incubated for an additional 24 h.

Data are presented as mean \pm S.E. (n=4).

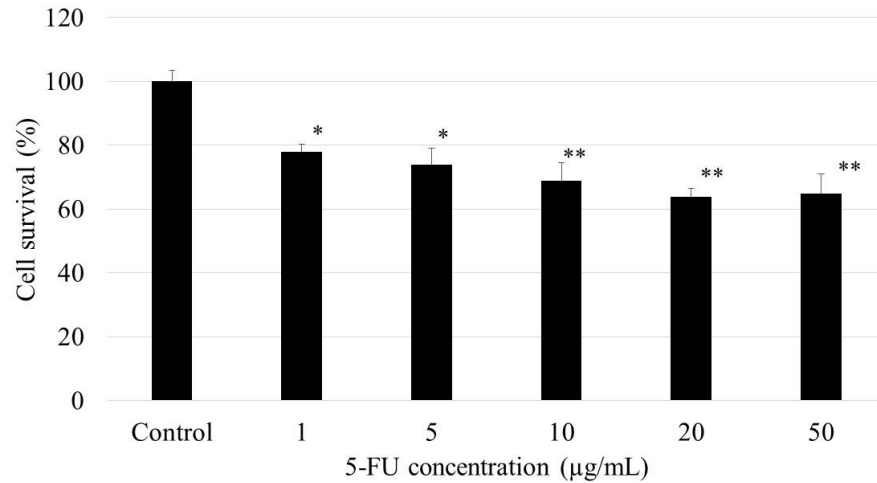


Figure 8. Effect of 5-FU on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug concentrations, and the Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of 5-FU (0 (control), 1, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4): *P<0.05, **P<0.01.

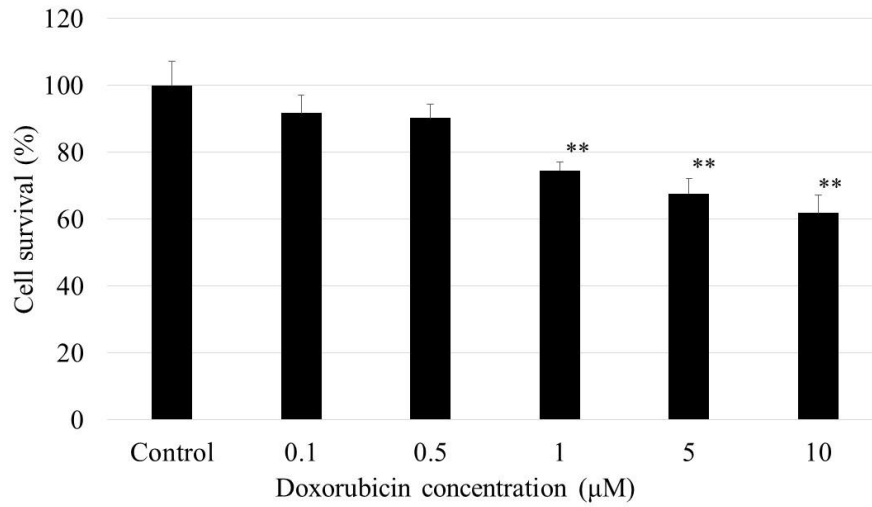


Figure 9. Effect of doxorubicin on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug concentrations, and the Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of doxorubicin (0 (control), 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µM) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4): **P<0.01.

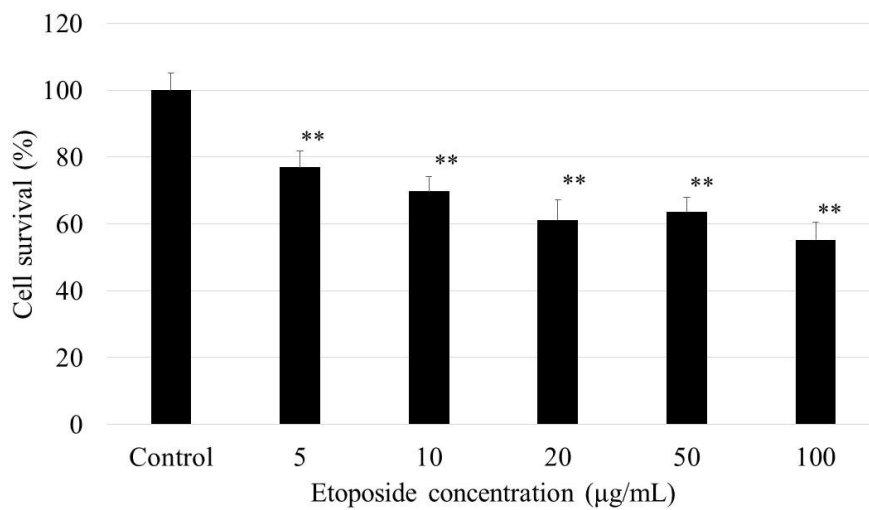


Figure 10. Effect of etoposide on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug concentrations, and the Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of etoposide (0 (control), 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4): **P<0.01.

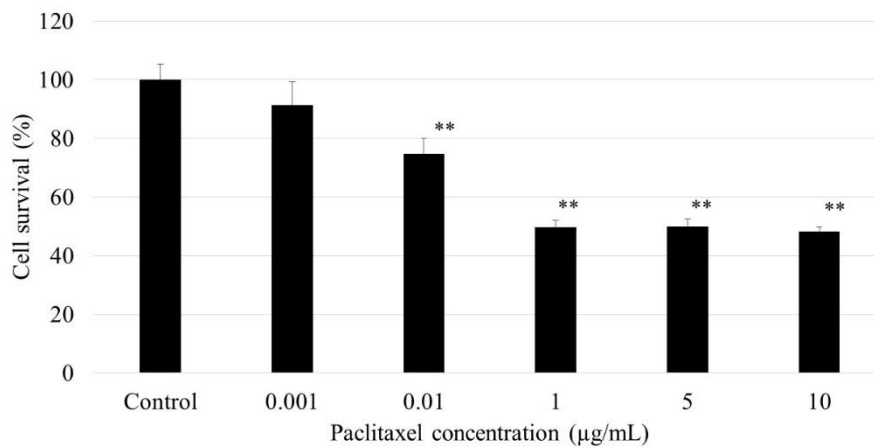


Figure 11. Effect of paclitaxel on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug concentrations, and the Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of paclitaxel (0 (control), 0.001, 0.01, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4): **P<0.01.

2-3-2 抗がん剤と EPA または DHA の併用による PC3 細胞の増殖への影響

CPA の濃度を 5、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA、DHA の濃度を 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として CPA と n-3 PUFA 全ての組み合わせで実験を行った結果、CPA の濃度に関わらず、EPA、DHA の 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において CPA 単独と比較して強い細胞増殖抑制が認められた (Figure 12)。5-FU の濃度を 1、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA、DHA の濃度を 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として 5-FU と n-3 PUFA 全ての組み合わせで実験を行った結果、DHA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 5-FU 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の組み合わせ以外において有意差を認めた。EPA、DHA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 5-FU 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の組み合わせにおいては強い細胞増殖抑制効果を認めた (Figure 13)。DOX の濃度を 1、5 μM 、EPA、DHA の濃度を 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として DOX と n-3 PUFA 全ての組み合わせで実験を行った結果、全ての組み合わせで有意差を認めた。そして、特に EPA、DHA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + DOX 5 μM の組み合わせにおいては、DOX 単独 10 μM の効果と比較してさらに強い細胞増殖抑制効果を認めた。ETP の濃度を 5、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA、DHA の濃度を 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として ETP と n-3 PUFA 全ての組み合わせで実験を行った結果、全ての組み合わせで有意差を認めた。EPA、DHA の濃度を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で併用すると、ETP の濃度が僅か 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であっても ETP 単独で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度時の作用と比較してさらに強い細胞増殖抑制効果を認めた (Figure 15)。PTX の濃度を 1、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA、DHA の濃度を 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として PTX と n-3 PUFA 全ての組み合わせで実験を行った結果、全ての組み合わせで有意差を認めた。PTX の濃度を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA、DHA の濃度を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で併用すると PTX 単独で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度時の作用と比較してさらに強い細胞増殖抑制効果を認めた (Figure 16)。

以上、検討してきた抗がん剤単独における PC3 細胞の増殖への影響と抗がん剤と EPA または DHA の併用による PC3 細胞の増殖への影響の結果を Table 1

にまとめて示した。抗がん剤単独における結果において各種抗がん剤の最大濃度添加時の生細胞数をさらに下回る抗がん作用を示した抗がん剤と EPA または DHA の併用時の結果には * を付記した。

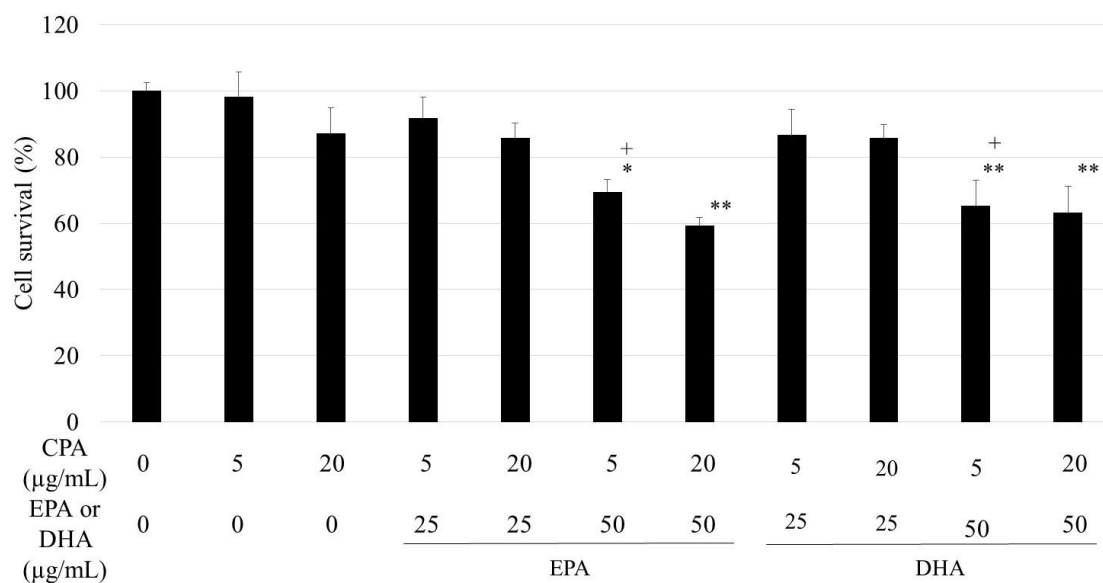


Figure 12. Effects of EPA or DHA and cyclophosphamide on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug and fish oil concentrations. The Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of cyclophosphamide (5, 20 µg/mL) and EPA (25, 50 µg/mL) or DHA (25, 50 µg/mL) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean ± S.E. (n=4) versus control PC3 cells: **P<0.01 vs Control. +P<0.05 vs CPA 5 µg/mL

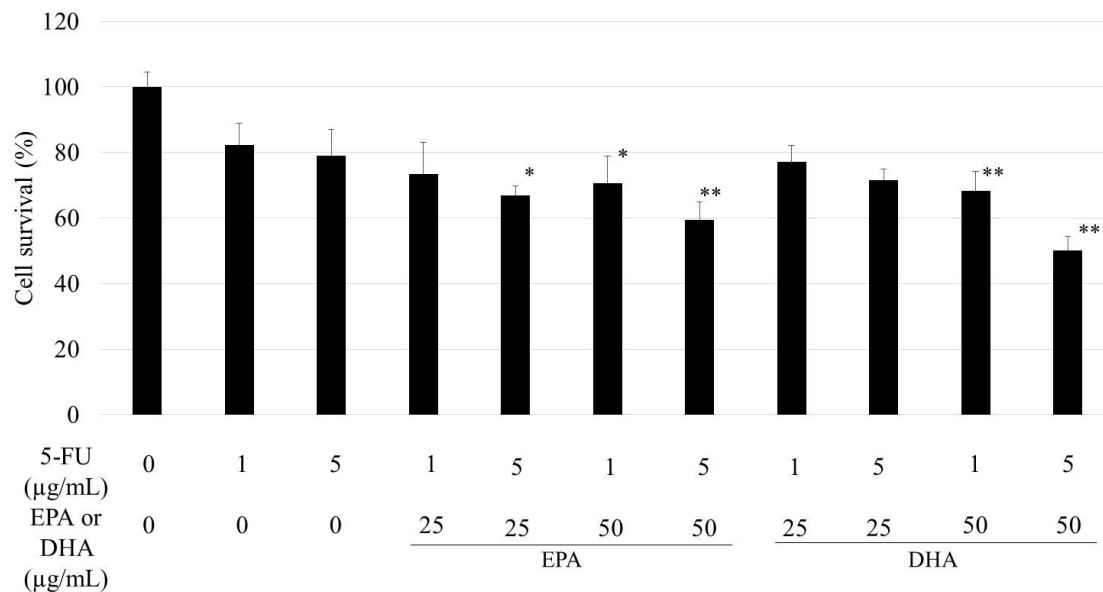


Figure 13. Effects of EPA or DHA and 5-FU on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug and fish oil concentrations. The Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of 5-FU (1, 5 µg/mL) and EPA (25, 50 µg/mL) or DHA (25, 50 µg/mL) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean ± S.E. (n=4) versus control PC3 cells: *P<0.05, **P<0.01.

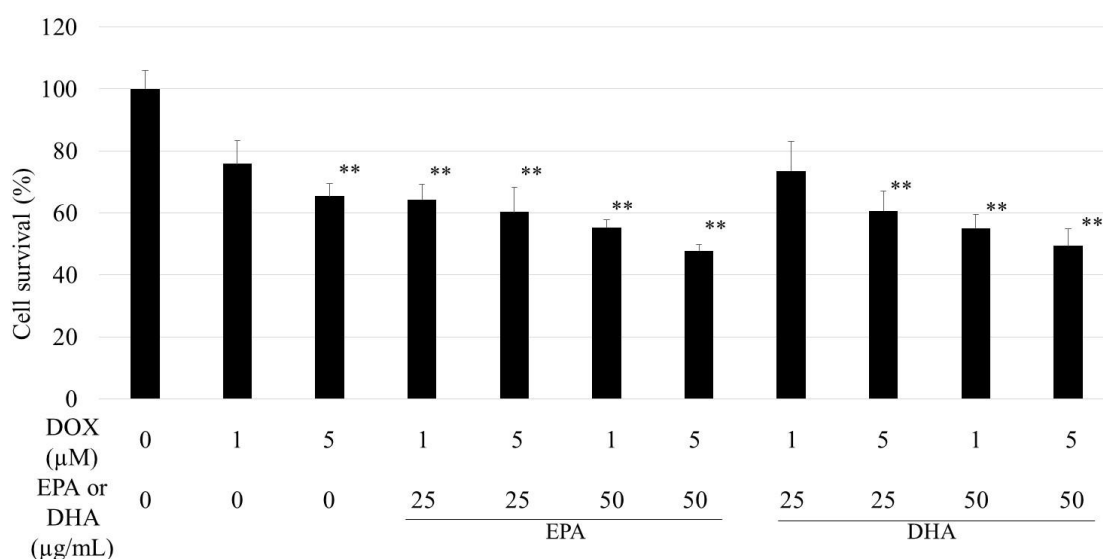


Figure 14. Effects of EPA or DHA and doxorubicin on PC3 cell proliferation. The X-axis

shows anticancer drug and fish oil concentrations. The Y-axis shows the percentage based on live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of doxorubicin (1, 5 μ M) and EPA (25, 50 μ g/mL) or DHA (25, 50 μ g/mL) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4) versus control PC3 cells: *P<0.05, **P<0.01 vs Control.

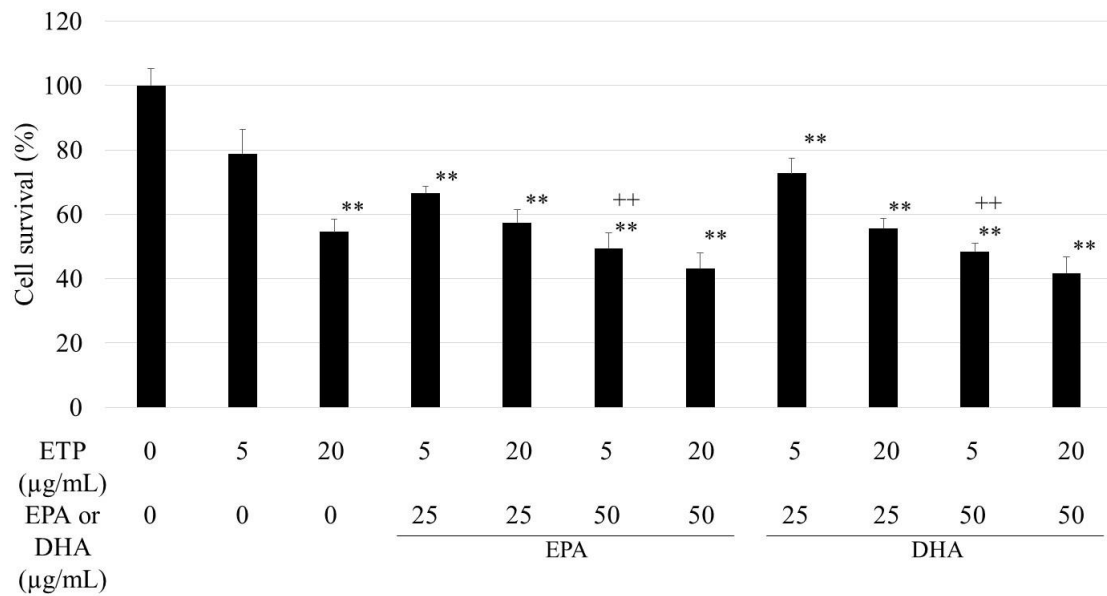


Figure 15. Effects of EPA or DHA and etoposide on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug and fish oil concentrations. The Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of etoposide (5, 20 μ g/mL) and EPA (25, 50 μ g/mL) or DHA (25, 50 μ g/mL) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4) versus control PC3 cells: *P<0.05, **P<0.01 vs Control, + P<0.05, ++P<0.01 vs ETP 5 μ g/mL.

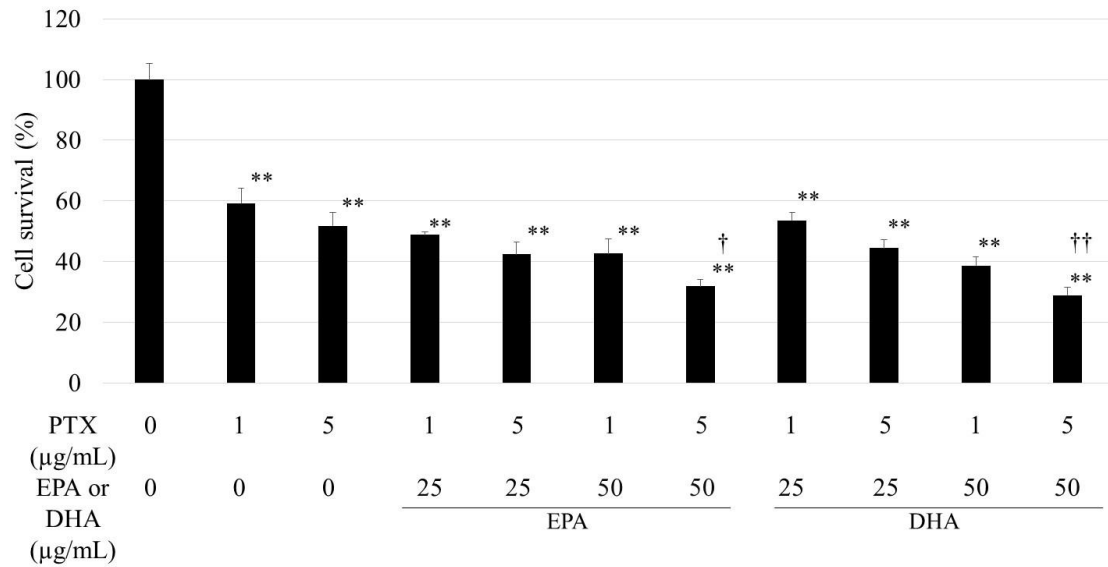


Figure 16. Effects of EPA or DHA and paclitaxel on PC3 cell proliferation. The X-axis shows anticancer drug and fish oil concentrations. The Y-axis shows the percentage based on the live cell number. After 24 h of cell seeding, various concentrations of paclitaxel (1, 5 µg/mL) and EPA (25, 50 µg/mL) or DHA (25, 50 µg/mL) were added and incubated for an additional 24 h. Data are presented as mean \pm S.E. (n=4) versus control PC3 cells: **P<0.01 vs Control. † P<0.05, † † P<0.01 vs PTX 5 µg/mL.

Table 1. Summary of results.

AD or n-3 PUFA	Unit	Cell proliferation (% of the control)							
		Single treatment		Combination treatment		EPA (µg/mL)		DHA (µg/mL)	
		Low	High	Low	High	50 (AD low)	50 (AD high)	50 (AD low)	50 (AD high)
		(Concentration)				25 (AD low)	25 (AD high)	25 (AD low)	25 (AD high)
5-FU	µg/mL	77.8 (1)	64.9 (50)	77.8 (1)	74.0 (5)	70.6 (1)	59.5 (5) *	68.2 (1)	50.2 (5) *
						73.4 (1)	66.8 (5)	77.0 (1)	71.6 (5)
Etoposide	µg/mL	76.9 (5)	55.3 (100)	76.9 (5)	61.2 (20)	49.5 (5) *	43.3 (20) *	48.4 (5) *	41.7 (20) *
						66.7 (5)	57.4 (20)	72.8 (5)	55.7 (20)
Doxorubicin	µM	91.7 (0.1)	61.8 (10)	74.6 (1)	67.7 (5)	55.3 (1) *	47.8 (5) *	55.1 (1) *	49.4 (5) *
						64.3 (1)	60.3 (5) *	73.5 (1)	60.6 (5) *
Cyclophosphamide	µg/mL	97.2 (10)	74.7 (200)	n.d (5)	92.0 (20)	69.5 (5) *	59.2 (20) *	65.5 (5) *	63.3 (20) *
						91.7 (5)	85.9 (20)	86.9 (5)	85.9 (20)
Paclitaxel	µg/mL	97.2 (0.001)	48.3 (10)	49.6 (1)	49.9 (5)	42.6 (1) *	31.9 (5) *	38.6 (1) *	29.0 (5) *
						42.3 (1) *	48.9 (5)	53.6 (1)	44.4 (5) *
EPA	µg/mL	98.9 (25)	4.6 (200)	98.9 (25)	87.2 (50)	98.9 (25)	87.2 (50)	DHA only	
DHA	µg/mL	102.8 (25)	27.1 (200)	102.8 (25)	84.8 (50)	EPA only		102.8 (25)	84.8 (50)

AD: anticancer drug. MIN: minimal concentration of AD or n-3 PUFAs. MAX: maximal concentration of AD or n-3 PUFAs. Low, High: the lower or higher concentrations of AD in the combination treatments, respectively. *: effects of the combination treatment were higher than the effects of single AD therapy at maximal concentration. The effects of the single treatment of EPA or DHA are shown in the lower position in the table.

2-3-3 抗がん剤と EPA、DHA の併用における相乗、相加、拮抗効果の判定

CIによる結果を Table 2 に示した。各種抗がん剤と EPA または DHA を併用した結果、DHA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 5-FU 1、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用時のみ拮抗効果を認めた (CI > 1.0) が、それ以外の併用時全てにおいて相乗効果 (CI < 1.0) を認めた。

Table 2. CI: Combination Index.

CI		5-FU		Cyclophosphamide		Doxorubicin		Etoposide		Paclitaxel	
		1 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	20 µg/mL	1 µM	5 µM	5 µg/mL	20 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL
EPA	25 µg/mL	0.38	0.68	0.58	0.5	0.39	0.69	0.48	0.41	0.51	0.73
	50 µg/mL	0.46	0.46	0.53	0.56	0.54	0.92	0.47	0.61	0.49	0.85
DHA	25 µg/mL	1.26	1.26	0.42	0.57	0.76	0.67	0.73	0.38	0.48	0.67
	50 µg/mL	0.76	0.46	0.49	0.49	0.49	0.86	0.41	0.51	0.41	0.76

Values of CI, <1, =1, >1 indicate a synergistic effect, an additive effect, and an antagonistic effect, respectively.

2-3-4 抗がん剤単独、並びに EPA、DHA 併用における効果の判定

抗がん剤単独添加実験において設定された最大濃度の結果と抗がん剤と EPA、DHA を併用した時に得られた結果の差を Table 3 に示した。EPA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用時では DOX または PTX との併用、DHA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用時では PTX との併用時のみ、これら抗がん剤の最大濃度使用時の細胞増殖抑制効果を上回った。一方、EPA または DHA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との併用においては一部の組み合わせを除いて、ほとんどの組み合わせで抗がん剤最大濃度使用時の効果を大きく上回るという結果を得た。

Table 3. Comparison with the inhibitory effects of the combination treatment and that of single AD therapy at maximal concentrations.

AD	Concentration of AD	EPA		DHA	
		25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
5-FU	High	-	++	-	+++
	low	-	-	-	-
Etoposide	High	-	+++	-	+++
	low	-	++	-	++
Doxorubicin	High	+	+++	+	+++
	low	-	++	-	++
Cyclophosphamide	High	-	+++	-	+++
	low	-	++	-	++
Paclitaxel	High	-	++	+	+++
	low	++	++	-	++

The levels of the advantage of the inhibitory effect of the combination treatment; less than 0%, 0 to 5%, 5 to 10% or more than 10% were described -, +, ++ or +++, respectively.

第四節 小括

第一章において、n-3 PUFA である EPA、DHA は PC3 細胞の増殖、転移・浸潤を抑制した。しかし、これらの結果から、ただちに臨床で EPA および DHA の単独または両者の併用にて、がんに対する効果が得られると結論付けることはできない。本章においては、まず抗がん剤単独によって PC3 細胞が濃度依存的に減少することを確認した。用いた五種類の抗がん剤のうち、5-FU、DOX、ETP、PTX の四種において実験で用いた濃度範囲内において有意に PC3 細胞の増殖を抑制した。特に PTX は PC3 細胞に対して 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という比較的 low 濃度においても高い増殖抑制効果を認めた。また、PTX は本来 CRPC に適応はないが同種同効薬であるカバジタキセル、ドセタキセルが CRPC に適応を持つことから、PTX についても CRPC に対して単独投与によって有効である可能性が示唆された。5-FU では設定した濃度範囲における全てにおいて有意差を認め、比較的 low 濃度から効果が現れるものの、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という高濃度においても低濃度と比較して強い増殖抑制効果を認めなかった。DOX は 1 μM 以上の濃度において濃度依存的に有意な増殖抑制効果を示した。ETP は 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で濃度依存的に生細胞数を減少させたが、5-FU と同様に高濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) においても顕著な抑制作用が見られなかった。CPA においては全ての濃度において有意差を認めることは出来ず、最大濃度であっても対照群と比較して細胞数の減少傾向が小さく、他の抗がん剤と比較して PC3 細胞に対する増殖抑制効果を期待できなかった。これらの結果から現在、前立腺がん治療に適応のない抗がん剤単独でも CPA 以外の四種類の抗がん剤に関してはその効果のある程度期待できるものと推察された。

併用実験においては n-3 PUFA と抗がん剤の濃度を各二通り設定し、一つの抗がん剤に対して 4 種類の組み合わせの下、実験を行った。第一章の結果を参考とし、n-3 PUFA である EPA、DHA の濃度は単独使用時では細胞増殖抑制効果の低い濃度を選択した。EPA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EPA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DHA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および DHA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、PC3 細胞の生細胞数をそれぞれ $98.9 \pm 5.7\%$ 、 $87.2 \pm 5.7\%$ 、 $102.8 \pm 2.5\%$ 、および $84.8 \pm 5.2\%$ に減少させた。よって、EPA、DHA は 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では抗がん作用はなく 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では極めて弱い抗がん作用を示すと考えられる。また、EPA、DHA の濃度は n-3 PUFA 製剤の内服でも容易に達する血中濃度でもある。また、臨床試験等に関する文献 (70, 71, 72, 73, 74) から、当研究の併用実験で用いた抗がん剤の濃度は、臨床で使用された場合の血中濃度と比較して 1/2~1/10 の低濃度と推測された。このような条件下で実験を行い、CI を用いて併用効果による相乗効果を確認した。その結果、DHA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 5-FU の併用時にのみ阻害効果を認めるものの、その他の併用時には全て相乗効果を認める結果になった。CI による検討から、EPA、DHA は各種抗がん剤とは別の作用機序によってがんに対して増殖抑制効果を持つ可能性がある。また併用治療によって、より強い効果を得るためには EPA、DHA の濃度、抗がん剤の濃度の設定が非常に重要である可能性が示唆された。また、今回設定した抗がん剤単独における細胞増殖抑制効果の最大濃度での結果と併用時の結果を比較すると、特に EPA、DHA を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で併用した場合に各抗がん剤単独における最大濃度の効果を上回る結果を得ている。以上のことから、これらの組み合わせによって抗がん剤の投与量の減少による患者への肉体的負荷、副作用の軽減に繋がる可能性が示唆された。また、副作用の軽減に伴うがん患者の QOL 向上のみならず副作用によって治療を断念せざるをえなか

った患者に対する新規治療戦略を提唱するための基礎検討となる可能性を示した。

第三章 アンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株における n-3 系多価不飽和脂肪酸が及ぼす抗がん機構の検討

第一節 小緒言

がん細胞の発生、増殖、転移のメカニズムは科学の進歩に伴い徐々に明らかになりつつある。昨今のがん治療に臨床で使用される、がんが持つ特定の機能を破壊させ得る分子標的薬は、これらメカニズムの解明に伴って開発されたものである。がんを実験レベルで発症させる方法は、放射線照射、薬物投与によって実験動物、細胞共に確立されている。また、細胞に関してはウィルスを感染させることで細胞の不死化、がん化を誘導できる。また、今回用いた PC3 細胞のようにがん患者から継代細胞として樹立することも可能である。このようにがんを発症させること、がん細胞株を樹立したりすることが出来る一方、がんを確実に治癒させる方法は確立されていない。

今回注目した n-3 PUFA は、第一章、第二章にて、PC3 細胞に対する抗がん効果を持つことを明らかにした。現在、前立腺がん細胞に対する n-3 PUFA の効果については種々の研究報告があるが、魚油由来の n-3 PUFA を多く摂取することで前立腺がんの発症頻度を抑制するという報告については必ずしも肯定的なものばかりではない (75, 76)。また、前立腺がん細胞のみならず、その他のがん細胞に対する n-3 PUFA の抗がん効果に関する研究は行われているものの、前章までに明らかになった結果に関する作用機序については明確になったとは言えない (77, 78)。本章では、その n-3 PUFA の効果の一端を明らかにするために実験を行った。

細胞には増殖するためのシグナルが存在する。細胞増殖には多数のシグナルが関与しており、これらの制御が利かなくなることが、がんの発生メカニズムの一端である。前立腺がんの増殖には AR の存在が非常に重要である。アンドロゲンは AR と結合して核内に移行し、その標的遺伝子の発現を調節する (45)。この AR が内分泌療法のターゲットとして効果がなくなるのが CRPC である。今回用いた PC3 細胞は AR が失活した前立腺がん細胞である (79, 80)。CRPC の増殖には、どのようなシグナルが関与しているのか。また、CRPC はどのようなシグナルによって細胞死に至るのか。これらの機序について検討する必要がある。

がん細胞の増殖には様々なタンパクが関与しており、非常に多くの増殖に関するパスウェイが存在する。一方で、n-3 PUFA が誘導する細胞死に関して Reactive oxygen species (ROS) などの酸化ストレスによって誘導される細胞死が示唆されている (19)。ROS はミトコンドリア等に存在するが、通常であれば細胞内の還元酵素によって無毒化される (81)。ROS による刺激は細胞を増殖、生存させる方向にシグナルを動かすこともあるが、過剰の ROS は細胞死へと向かわせる (82)。n-3 PUFA 刺激による ROS 過剰産生から至る細胞死は HepG2 でも確認されている。一方で n-3 PUFA は正常肝臓細胞には毒性を示さないことが報告されている (19)。また、これらの細胞以外でも DHA が ROS 産生を誘導することによって細胞死を起こすことが知られている (83)。

そこで本章では n-3 PUFA の抗がん作用機序の解明のため、はじめに EPA の至適濃度、至適作用時間の検討を実施し、次に抗体アレイによる網羅的なタンパクの解析を実施した。これらの得られた情報から EPA の作用機序を探索すると共に、他の先行研究から提唱されている ROS の影響を ROS の阻害剤である N-acetyl cysteine (NAC) を用いて明らかにすることを目的とした。

第二節 実験方法

3-2-1 試薬

DMEM、PBS を Gibco (New York, USA)より購入した。Can Get Signal を東洋紡 (大阪, 日本)より購入した。TGX プレキャストゲル、Immun-Blot PVDF membranes、Clarity western ECL substrate を Bio-Rad (California, U.S.A)より購入した。ブロックエースを KAC (京都, 日本)より購入した。全ての抗体を CST (Massachusetts, USA)より購入した。Mammalian protein extraction reagent (M-PER) を Thermo fisher scientific (Massachusetts, USA)より購入した。NAC を Wako より購入した。Human phospho-kinase array を R&D (Minnesota, USA)より購入した。Human apoptosis antibody array membrane を Abcam (Cambridge, UK)より購入した。

3-2-2 試薬調整

全ての抗体を Can Get Signal solution1/2 によって適当な濃度になるよう溶解した。EPA は Isopropanol に溶解した。Isopropanol に溶解させた EPA は -30°C 以下で保存した。その後 3% BSA 含有 DMEM 培地に溶解しソニケーションを行うことで完全に溶解させた。NAC は PBS を用いて目的濃度に溶解した。

3-2-3 細胞培養

PC3 細胞を 10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンの濃度になるよう調整した DMEM 培地で培養した。細胞は一日または、二

日おきに培地を交換し、60~70%コンフルエントに達したとき培地をアスピレータで除去し PBS で二回洗浄後、Trypsin 溶液を用いて継代した。培養は CO₂ インキュベータ内にて 5% CO₂、37°Cの条件下で細胞を培養した。

3-2-4 PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の効果

PC3 細胞を 3×10^5 cells/well となるよう 35mm Dish に必要枚数播種し、24 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行った。24 時間後 PBS で二回細胞を洗浄し、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養を行った。その後、PBS で二回洗浄し、無血清培地に交換し EPA を最終濃度 100、300、500 μ M となるように添加した。比較対象群には EPA を溶解するために用いた 3% BSA 含有 DMEM を添加した。さらに 24 時間培養を行い、Trypsin で剥離し、血球計算盤で細胞数を計測した。

3-2-5 PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の Time course

PC3 細胞を 3×10^5 cells/well となるよう Grid 付き 35mm Dish (Ibidi, Am Klopferspitz, Germany) に必要枚数播種し、24 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行った。24 時間後 PBS で二回細胞を洗浄し、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養を行った。その後、PBS で二回洗浄し、無血清培地に交換し EPA を最終濃度 500 μ M となるように添加した。添加直前を 0 hr とし、一時間毎に写真を撮影し、Grid 内の細胞数の変化を計測した。また、同様にして Vehicle として EPA の溶媒を添加した群を用意し、2, 5, 10, 24 時間で写真撮影を行った。

3-2-6 PC3 細胞のアポトーシスおよびリン酸化シグナルへ EPA が及ぼす影響

PC3 細胞を、10 % FBS DMEM を用いて 8×10^5 cells/well となるよう 60mm ディッシュで 24 時間培養した。その後、二回 PBS で洗浄し PC3 細胞を無血清培地に交換後、さらに再度 24 時間培養し PBS 洗浄後、EPA 500 μ M で刺激した。Human phospho-kinase array 及び Human apoptosis antibody array membrane を用いた。この実験は、各抗体アレイのプロトコールに従って行った。最終段階の化学発光検出は Lumi Cube で行い、Clarity western ECL substrate を発光基質として用いた。

3-2-7 ROS 存在下における EPA の細胞増殖に及ぼす影響

PC3 細胞を 3×10^5 cells/well となるよう 35mm Dish に必要枚数播種し、24 時間 CO₂ インキュベータにて培養を行った。24 時間後 PBS で二回細胞を洗浄し、無血清培地に交換後再度 24 時間培養を行った。その後、PBS で二回洗浄し、無血清培地に交換し NAC and/or EPA を最終濃度 5 mM, 500 μ M となるように添加した。再度 24 時間培養し、Trypsin で剥離し、血球計算盤で細胞数を計測した。

3-2-8 細胞増殖に関するタンパクのリン酸化に及ぼす EPA の効果

PC3 細胞を、10 % FBS DMEM を用いて 8×10^5 cells/well となるよう 60mm ディッシュで 24 時間培養した。その後、二回 PBS で洗浄し PC3 細胞を無血清培地に交換後、再度 24 時間培養し PBS 洗浄後、EPA 500 μ M または対照で刺激した。細胞溶解液である M-Per を添加し、5 分間氷上振盪を行った後、13000rpm

4℃で10分間遠心分離した。上清を回収し、2×Laemmli sample buffer で希釈し、タンパク質試料を100℃で煮沸した。タンパク質サンプルをTGXプレキャストゲルの各レーンにロードし、電気泳動を開始した(100V、0.3A)。電気泳動が完了した後、タンパク質サンプルをImmun-Blot PVDF membranes (100V、0.35A、1時間)に転写した。1時間後、メンブレンをブロックエースで1時間ブロッキングした後、抗体希釈液を室温で1時間反応させた。全ての洗浄は1%Tween20 TBSにて行い、Lumi Cube (Liponics, 東京, 日本) および Clarity western ECL substrate を用いて化学発光を検出した。

Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)抗体、Phospho- Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2)抗体を Can Get Signal solution1 によって1:1000で希釈した。Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2)抗体、Phospho-Proline-rich tyrosine kinase-2 (p-Pyk2)抗体を Can Get Signal solution1 によって1:500で希釈した。Anti-rabbit 抗体を Can Get Signal solution 2 によって1:1000で希釈した。

3-2-9 統計解析

全ての統計解析はR version 3.4.3 (R Core Team 2017) を用いて行い、対照群のある多群間比較はDunnettの検定にて有意差を判定した。二群間の比較はF検定で分散を確認し、分散応じたt検定で有意差を判定した。全ての二群間の多重比較はTukey-Kramerの検定にて有意差を判定した。

画像の解析および編集処理は全てImage Jを用いて行った。

第三節 結果

3-3-1 PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の効果

無血清状態と EPA が PC3 細胞に及ぼす影響について示した。24 時間 10 % FBS 含有 DMEM 培地で培養後、24 時間無血清培地に交換した結果、EPA の濃度依存的な細胞数の減少を認めた。EPA 100、300 μM では有意差を認めなかったが、500 μM (151 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の高濃度では有意に生細胞数を減少させた (Figure 17)。

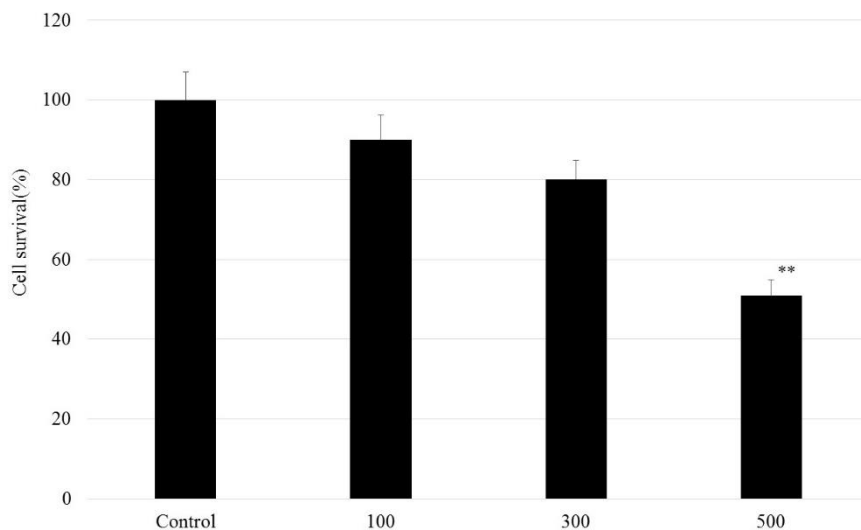


Figure 17. Effect of EPA on PC3 cell proliferation. After 24 h of culture in serum-free medium, various concentrations of EPA (0, 100, 300, and 500 μM) were added to the cultures. Data represent mean \pm S.E. (n = 3). **P < 0.01 vs. 0 μM .

3-3-2 PC3 細胞の細胞増殖に及ぼす EPA の Time course

Figure 17 と同条件において EPA がどのような経時的変化をもって PC3 細胞に影響を与えているかを示した。PC3 細胞に EPA 500 μ M を添加し、0~24 時間までの時間経過によって、0~2 時間までは細胞数の有意な変化はないが、3~12、24 時間において刺激 0 時間と比較して有意な差を認めた。また、EPA 溶解のために用いた溶媒 (Vehicle) を添加したところ、細胞数に有意な変化は認められなかった。また、コントロール群 (Vehicle 添加) と EPA 添加群の対応する時間において有意差検定を行ったところ、2 および 5 時間では有意差を認めることは出来なかったが、10、24 時間では有意に EPA 添加群の細胞生存率が低下した (Figure 18)。

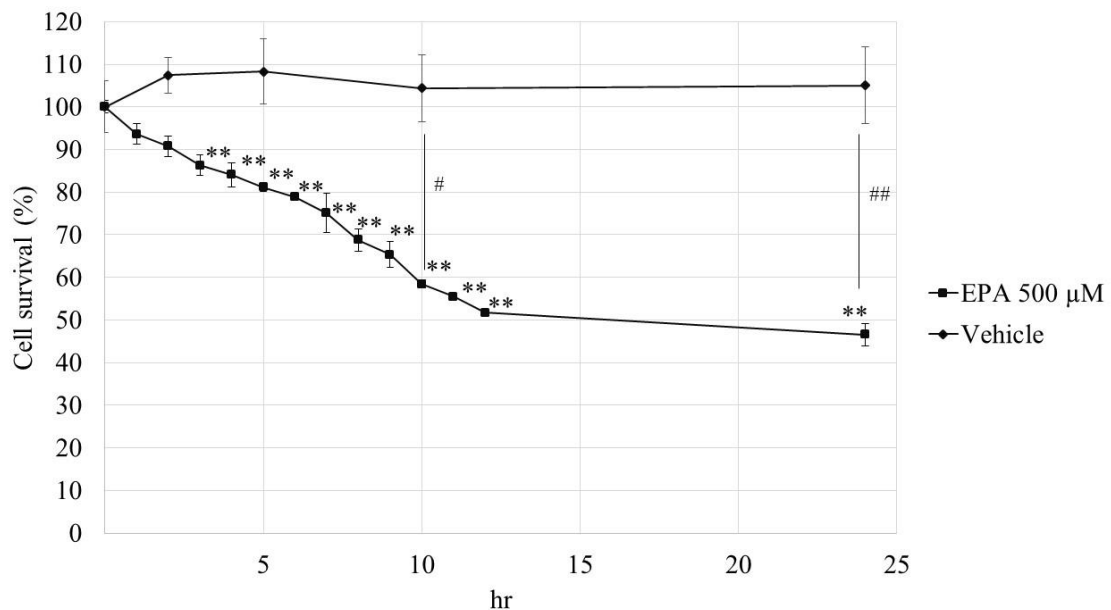


Figure 18. Effect of EPA on PC3 cell proliferation time course. After 24 h of cell seeding and serum starved for 24h. Concentration of EPA (500 μ M) or vehicle were added and incubated for an additional time (n=3). Mean \pm S.E. **P<0.01 vs 0 h. #P<0.05, ##P<0.01 vs vehicle.

3-3-3 PC3 細胞のアポトーシスおよびリン酸化シグナルへ EPA が及ぼす影響

Human apoptosis antibody array-membrane を用いた一回の実験結果をグラフに示した (Figure 19)。その結果をもとに Figure 19 においてコントロールと比較して増減が 20%以上あるものは可溶性腫瘍壊死因子レセプター2 (sTNF-R2)、Second mitochondria-derived activators of caspase (SMAC)、Survivin、Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1)、Caspase 8、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)、p53 であった。これらのうち sTNF-R2 と Bcl-2 のみが減少し、その他は増加した (Table 4)。

次に Human-Phospho kinase array kit を使用して同様の検討を行い (Expt 1, Expt 2)、その結果を併記した (Figure 20)。Figure 20 から増減において二回とも同一の傾向を示したものを抜き出し、それぞれをコントロールと比較した。その内、二回とも増減が 20%以上となったものが PYK2, Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), c-Jun, Ribosomal S6 kinases 1/2/3 (RSK1/2/3)の四種であり、これら全てで 20%以上の減少を示した (Table 5)。

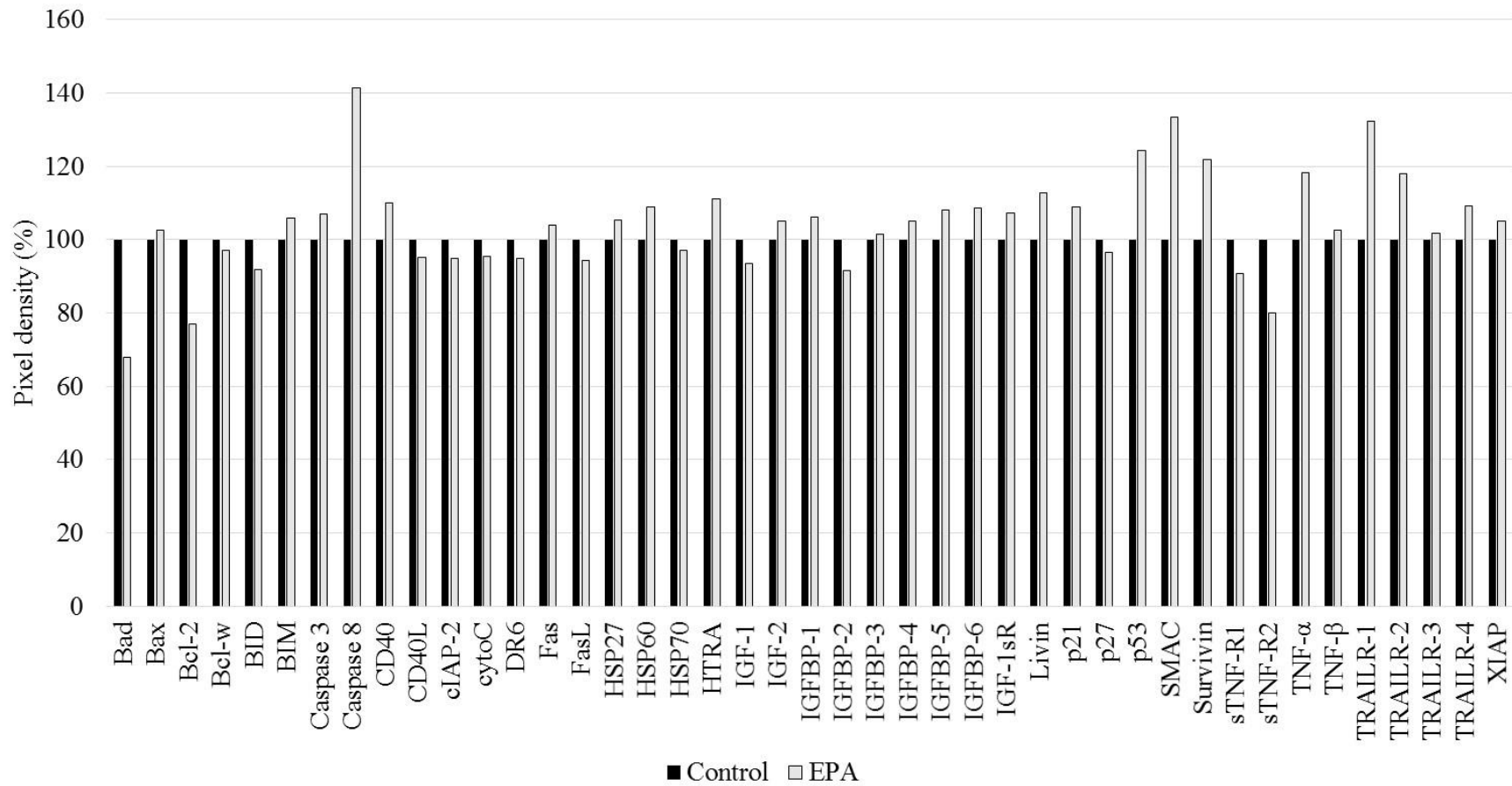


Figure 19. Results of the apoptosis antibody array. PC3 cells with or without EPA treatment were analyzed. The y axis shows the pixel density (%). The expression level of each protein in the control was adjusted to 100%.

Table 4. Differences in expression levels of various proteins relative to the control in PC3 cells treated with EPA.

Protein	Result
sTNF-R2	- ¹
SMAC	+ ²
Survivin	+
TRAIL-R1	+
Caspase 8	+
Bcl-2	-
p53	+

1, 2: Differences relative to the control are shown as $\pm > 20\%$.

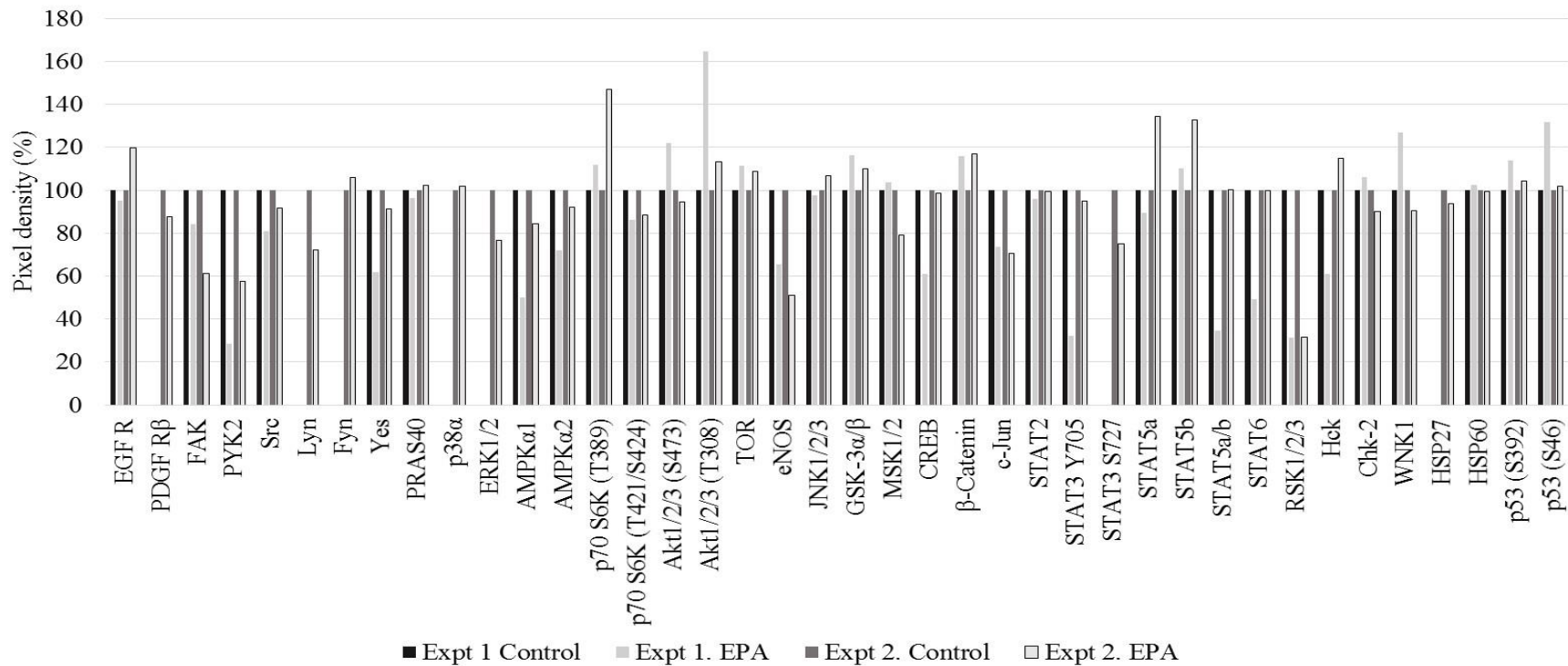


Figure 20. Results of two experiments using the human phosphokinase array. The y axis shows pixel density (%). For the control groups in experiments 1 and 2 (Expt1 Control and Expt2 Control, respectively), the expression level of each protein was adjusted to 100%. For the EPA-treated groups in experiments 1 and 2 (Expt1 EPA and Expt2 EPA, respectively), the expression level of each protein was determined relative to that in the corresponding control group.

Table 5. Differences in the expression levels of various proteins in EPA-treated PC3 cells relative to the control (related to Figure 20).

Protein	Expt 1.	Expt 2.
FAK	----- ²	----- ¹
PYK2	-----	-----
Src	-----	----- ³
Yes	-----	---
AMPK α 1	-----	-----
AMPK α 2	-----	---
p70 S6K (T389)	+++ ²	++++ ¹
p70 S6K (T421/S424)	----	----
Akt1/2/3 (T308)	++++	+++
TOR	+++	++ ³
eNOS	-----	-----
GSK-3 α/β	+++	++
β -Catenin	+++	+++
c-Jun	-----	-----
STAT5b	+++	++++
RSK1/2/3	-----	-----

1: Differences relative to the control are shown as $\pm\pm\pm > 20\%$. 2: Differences relative to the control are shown as $\pm\pm > 10\%$. 3: Differences relative to the control are shown as $\pm > 5\%$.

3-3-4 ROS inhibitor 存在下における EPA の細胞増殖に及ぼす影響

ROS inhibitor である NAC の存在が EPA の効果に対し影響を与える否かを示した。NAC 5 mM を添加した群では無添加群と比較して細胞数の変化がなかったが、EPA 500 μ M 添加群では、無添加群の約 60% に有意に減少した。一方、EPA 500 μ M と NAC 5 mM を同時添加した結果では、無添加群と比較して 90% 前後までの減少を示し、EPA の効果が減弱した。また、EPA 500 μ M 単独と、EPA 500 μ M と NAC 5 mM 併用群の比較検定では、二群に有意差を認められた。同様に NAC 5 mM 単独添加群と EPA 500 μ M 単独添加群の比較検定においても二群に有意差を認めた (Figure 21)。

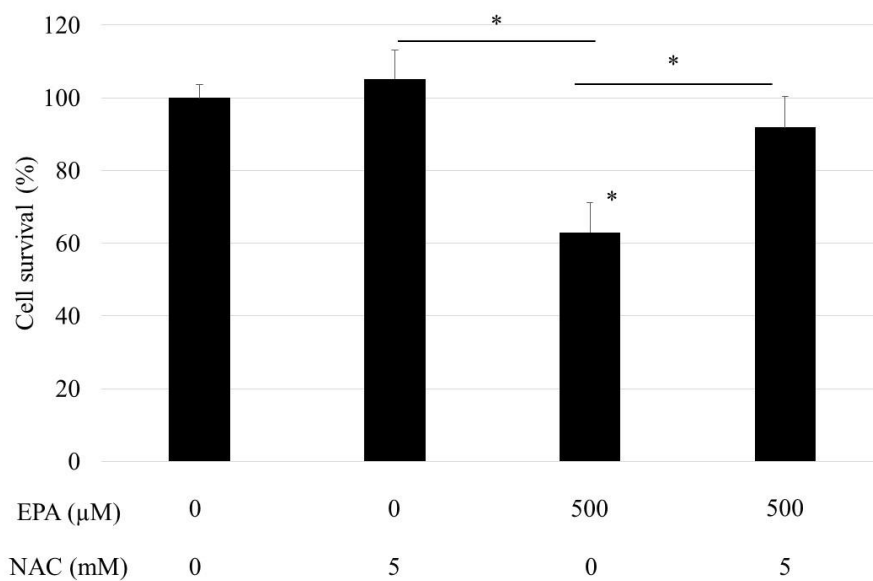


Figure 21. Effect of NAC on the anti-cancer effect of EPA against PC3 cells. After 24 h of culture in serum-free medium, cells were treated with EPA (500 μ M) or NAC or both. Data represent mean \pm S.E. (n = 3). *P < 0.05.

3-3-5 細胞増殖に関するタンパクのリン酸化に及ぼす EPA の効果

次に EPA が ERK の活性化にどのような影響を与えているのかを示した。PC3 細胞を EPA 500 μ M で刺激し、0.5、1、2、3、4 時間インキュベートした後、それぞれの刺激時間におけるコントロールと共に細胞ライセートを作成し、ウェスタンブロットによって ERK1/2、p-ERK1/2 のタンパクを検出した。ローディングコントロールには今回 β -actin を使用した。グラフは p-ERK1/2 / ERK1/2 の比で表され、0.5 と 3 時間以上の刺激では ERK の活性化はそれぞれのコントロール群と比較して有意差を認めなかった。一方、刺激 1 時間ではコントロール群の 70%前後まで低下、刺激 2 時間では 60%前後まで有意に低下した (Figure 22)。

次に EPA が Pyk2 の活性化に対してどのような影響を与えているかを検討した。PC3 細胞を EPA 500 μ M で刺激し、0.5、1、2、4 時間インキュベートした後、それぞれの刺激時間におけるコントロールと共に細胞ライセートを作成し、ウェスタンブロットによって Pyk2、p-Pyk2 (Y402) のタンパクを検出した。グラフは p-Pyk2/Pyk2 の比を示した。この結果、0.5、2 時間の刺激時間において有意に Pyk2 の活性化が抑制された (Figure 23)。

さらに NAC 添加によって、EPA による Pyk2 の活性化が EPA で変化するか否かについて検討した。PC3 細胞を NAC 5 mM 単独もしくは NAC 5 mM と EPA 500 μ M の併用、溶媒のみを添加したコントロール群に分け、2 時間インキュベートした後、細胞ライセートを作成し、ウェスタンブロットによって Pyk2、および p-Pyk2 (Y402) のタンパクを検出した。グラフは p-Pyk2/Pyk2 の比を示した。コントロール群と NAC 添加群では Pyk2 の活性化に大きな差を認めなかったが、NAC と EPA を同時添加した群では Pyk2 の活性化が抑制され

た。また、全群間を比較検定にかけたところ、NAC と EPA の同時添加群は他の二群との比較で有意に Pyk2 のリン酸化が抑制された (Figure 24)。

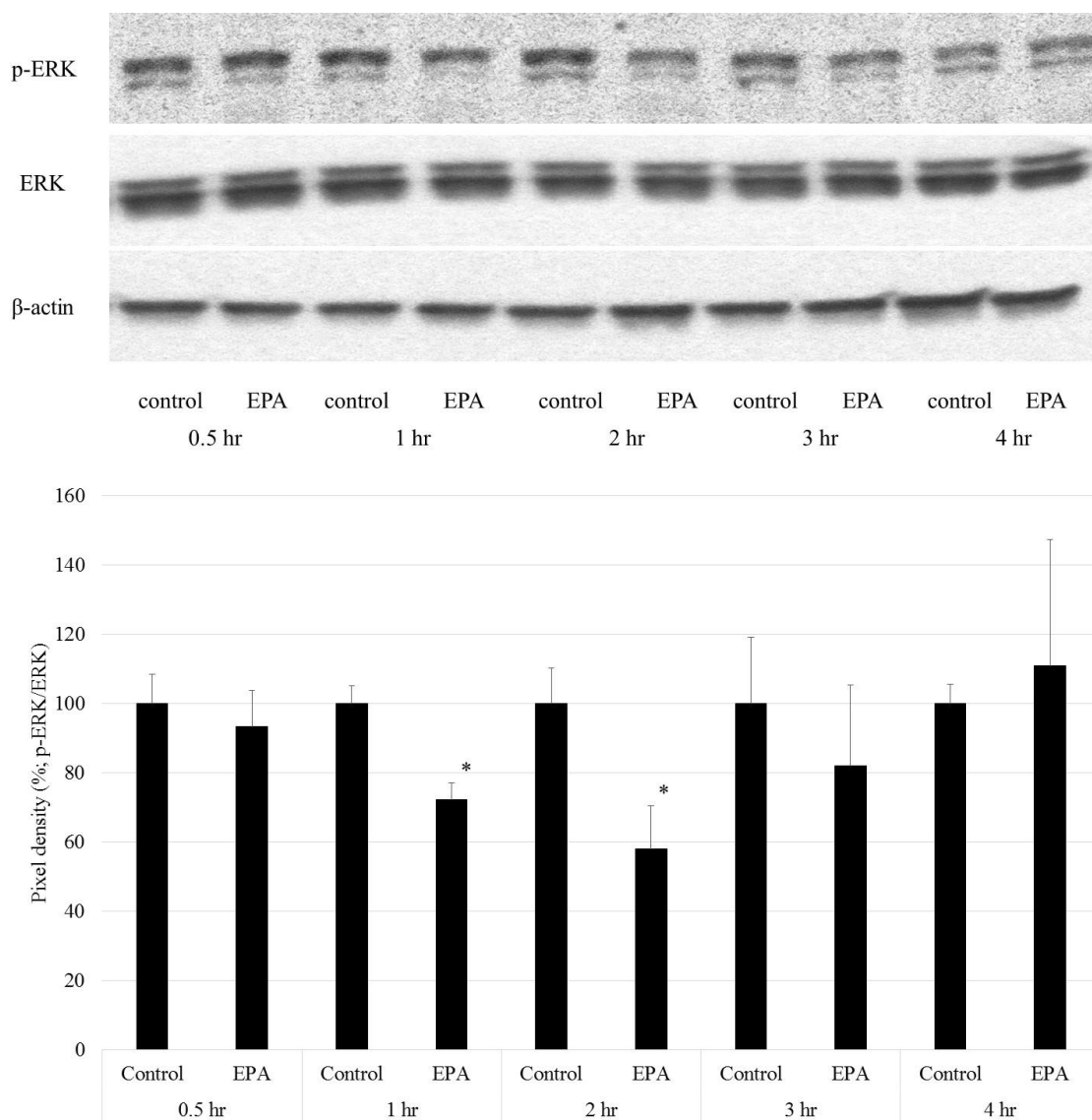


Figure 22. Effect of EPA on ERK1/2 phosphorylation. Upper panel: Representative results of western blot analysis. Lower panel: Pixel density of the control group at the indicated times was adjusted to 100%; relative pixel density of EPA-treated PC3 cells is shown. Data represent mean \pm S.E. (n = 3). *P < 0.05.

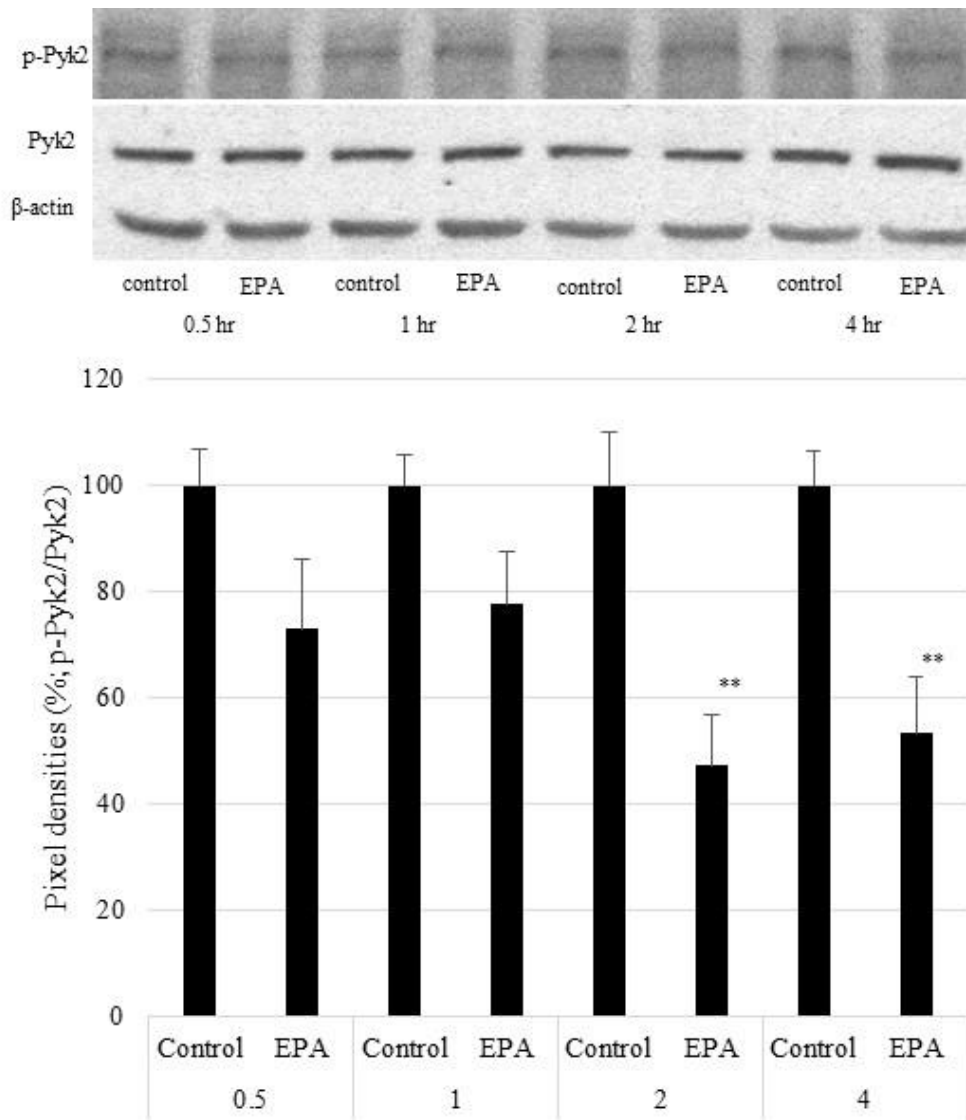


Figure 23. Effect of EPA on Pyk2 phosphorylation. Upper panel: Representative results of western blot analysis. Lower panel: Pixel density of the control group at the indicated times was adjusted to 100%; relative pixel density of EPA-treated PC3 cells is shown. Data represent mean + S.E. (n = 3). **P < 0.01.

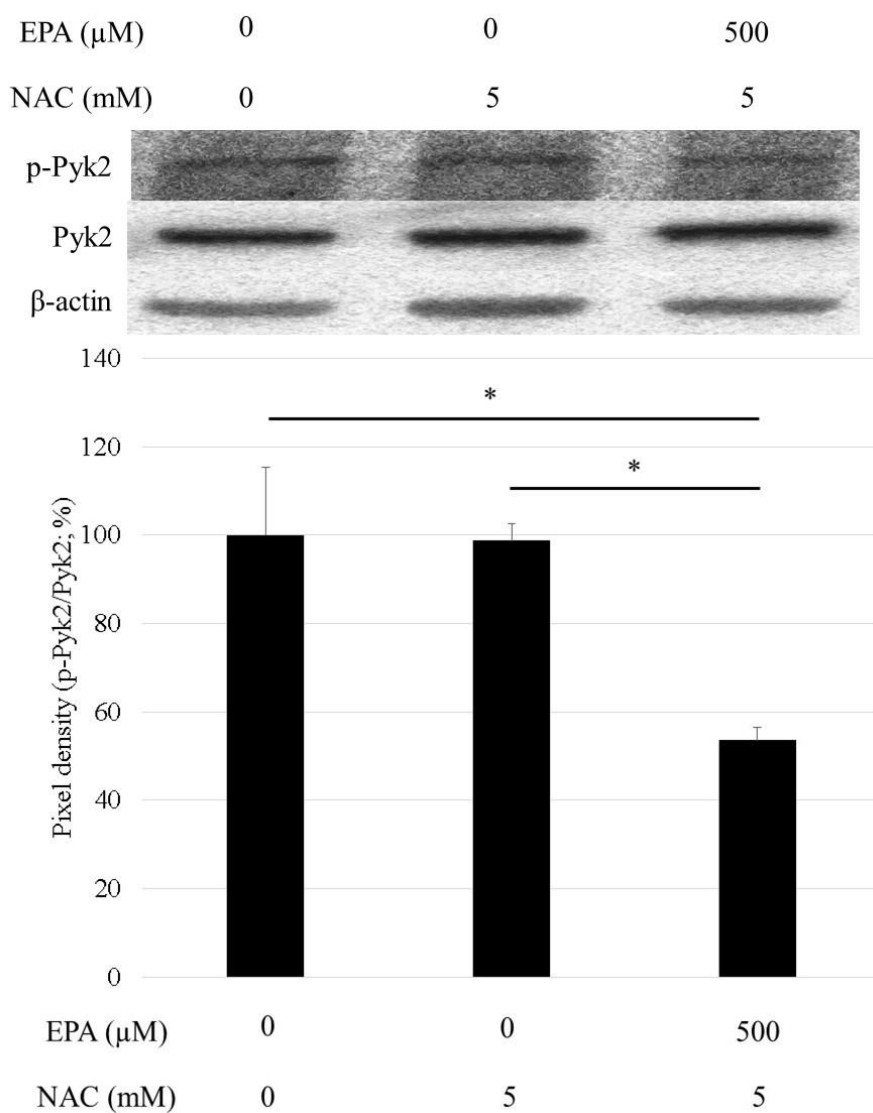


Figure 24. NAC did not affect the inhibitory effect of EPA on Pyk2 phosphorylation. After 24 h of culture in serum-free medium, PC3 cells were treated with EPA (500 μM) or NAC or both. Data represent mean + SEM (n = 3). *P < 0.05.

第四節 小括

本章においては抗体アレイによって複数の増殖に関与するタンパクのリン酸化、アポトーシスに関するタンパクを検出することによって、EPA がどのような作用機序で抗がん効果を発揮するのかを検討した。また文献的考察から、ROS の影響が予想されたため、その影響についても検討した。

まず、抗体アレイによる検討の前に条件検討を行った。PC3 細胞の細胞周期によって EPA の効果にばらつきが出ることを防ぐために 24 時間の無血清培地での培養を行うことで細胞周期を均一化した。その後、EPA 500 μM の濃度において、どのような時間経過で PC3 細胞を減少させているのかを確認した。この時間経過による細胞増殖の変化において、Vehicle となる溶媒添加群は細胞の増殖において時間経過で有意な差を認めなかった。この原因として細胞のコンタクトインヒビションなどから細胞数が一定のまま維持されている、または細胞の死滅と増殖の均衡が保たれているために細胞数が変化しないといった理由が考えられた。一方、EPA 添加群では添加開始後数時間以内に効果を示し、その増殖の抑制、ないし殺細胞効果を示しているものと推測された。この結果から EPA の濃度を 500 μM とし、有意差を認める直前の添加 2 時間後にタンパクのサンプルを作成し、抗体アレイ法によってアポトーシスに関与するタンパクが EPA によってどのように変化するかを確認した。

アポトーシスに関与するシグナルにおいて対照群と比較した際に 20%の差があったものの内、アポトーシスの誘導に働く TRAIL-R1、Caspase 8、p53 は増加し、sTNF-R2 は低下した。一方、アポトーシスを阻害する SMAC、Survivin は増加し、Bcl-2 は低下した。以上から EPA の添加によってカスパーゼの活性化を阻害する Survivin の活性化が示唆された。そのため、カスパーゼの関与す

るアポトーシス以外の経路による細胞死を誘導する ROS の関与を疑い、ROS を阻害する NAC を EPA と同時添加することによって、その効果の影響を検討した。その結果、NAC と EPA を同時添加することによって EPA の生細胞数減少効果を阻害することが判明した。これらの結果より、EPA が PC3 細胞に対して生細胞数減少効果を示すためには ROS の存在が非常に重要であることが判明した。EPA が、抗がん作用を示す際には ROS が重要な働きをしていることは肝臓がんで明らかになっていると同時に正常肝臓細胞には、EPA が毒性を示さないことが判明している (19)、同様に前立腺がん細胞であっても、ROS 産生が n-3 PUFA の作用に大きく関与していることが示唆されている(83)。

増殖に関与するシグナルの検討においては変化があったものは多数あるが、そのうち二回の結果とも同じ傾向にあり、かつ対照群と比較したときに差が 20 %以上あったものは Pyk2、eNOS、c-Jun、RSK1/2/3 であり、全て抑制傾向を示した。さらにウェスタンブロット法によって ERK のリン酸化が抑制されている可能性が示唆された。しかし、ERK のリン酸化の抑制は 0.5~4 時間において変動が見られた。そこで本研究では、より上流のシグナルタンパクの関与を疑い、抗体アレイによってリン酸化の抑制があったタンパクのうち、Pyk2 の抑制に着目し、その抑制を一般的なウェスタンブロット法で確認した。その結果、抗体アレイと同様の抑制傾向を認めた。さらに、NAC もしくは NAC と EPA を同時添加した結果、NAC 単独では Pyk2 活性化の抑制が確認されなかったが、NAC と EPA を同時添加した場合に Pyk2 活性化の抑制が確認された。このことから EPA の持つ Pyk2 抑制効果は少なくとも一部は ROS 産生を介するものではないと推測された。Pyk2 には先に発見された FAK があり、この FAK も抗体アレイによってリン酸化の抑制が示唆された。FAK は Pyk2 と高いタンパク組成の相同性が認められている (84)。この FAK はインテグリンと共に細胞

外マトリックスとの接着部位に局在しているが、一方、Pyk2は細胞内において一部インテグリンと共役するが、細胞膜に限局して存在するのではなく、細胞質にも存在が確認されている NRTK の一つである (85)。また、PC3 細胞にはインテグリンが数種存在し、リガンドとなる細胞外マトリックスと反応することが知られている (86)。細胞外マトリックスとの接着部位に限局する FAK の活性化が EPA によって抑制されることによって、細胞の移動能、細胞接着に影響を与えている可能性がある他、FAK の N 末端ドメインにはチロシンキナーゼに EGFR、c-Met、Src などの増殖に関与するタンパクをリン酸化するためのドメインも含まれている (87)。また、FAK はインテグリンと結合し、細胞内骨格に影響を与えている F-Actin のアンカーとなっているだけでなく、細胞の移動能に関与する Ras homolog gene family (Rho) キナーゼの活性化に関与している (88)。このように焦点接着に関与する NRTK である FAK の抑制は PC3 細胞の細胞増殖抑制メカニズム、転移・浸潤抑制メカニズムに深く関与していることが今回の検討によって推測された。

本来、Pyk2 は細胞内 Ca 濃度に依存して、その活性化が惹起されることが知られている NRTK である (89, 90)。n-3 PUFA のがん細胞への添加により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇することが知られており (19, 91)、また ROS 産生によって細胞内 Ca²⁺濃度が上昇することも実験的に確認されている (92, 93)。これらに反して、本研究では本来細胞内 Ca²⁺濃度上昇に伴い活性化する Pyk2 が抑制されていることが示唆された。Pyk2 は、ERK1/2、Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化から Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) の発現調節を行っていることが三種の乳がん細胞を用いた検討で確認されている (94)。さらにチロシンキナーゼ活性を持つ Pyk2 は Src を活性化し (95)、さらにその Src の下流には ERK が存在する (96, 84)。本研究によって ERK は 0.5~4 時間

でシグナルが推移することが確認されており、この Pyk2 から下るシグナルが抑制されたことによって細胞の増殖が停止したものと考えられる。さらに今回、Pyk2 のリン酸化抗体はチロシン 402 番のリン酸化を検出する抗体である。Pyk2 のこの部位は Src の活性化に必要なリン酸化ドメインであり (95)、Src の活性化抑制に繋がると考えられる。また、シグナル上流の活性化の変化が減弱するほど、下流のシグナルもそれに比例して減弱するのではなく、上流シグナルの刺激時間のずれによって生じるピーク強度の伝達効率の違いが下流のシグナルのピーク強度に影響を与えるという研究から (97)、この 0.5~4 時間までの ERK の強度のばらつきは EPA による直接作用ではなく、上流シグナルの影響を受けた、もしくは別経路からのシグナルによって活性化が維持されることなどにより生じたものと考えられた。Pyk2 は相同性のある FAK と同様に Rho キナーゼの活性化にも関与しており、その Rho キナーゼが活性化する Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK)、ミオシン軽鎖フォスファターゼ (MLCP) へとシグナルが伝達する (98)。これらのシグナルの不活化は細胞の形態変化に異常を来すことから、EPA は細胞増殖抑制のみならず、転移・浸潤抑制効果を示したものと考えられる。

本章の結果から EPA は ROS による細胞死を PC3 細胞に惹起し、Pyk2 の抑制から細胞増殖を抑制し、さらにその下流において細胞形態の異常を引き起こすことによって転移・浸潤能を抑制しているものと考えられた (Figure 25)。

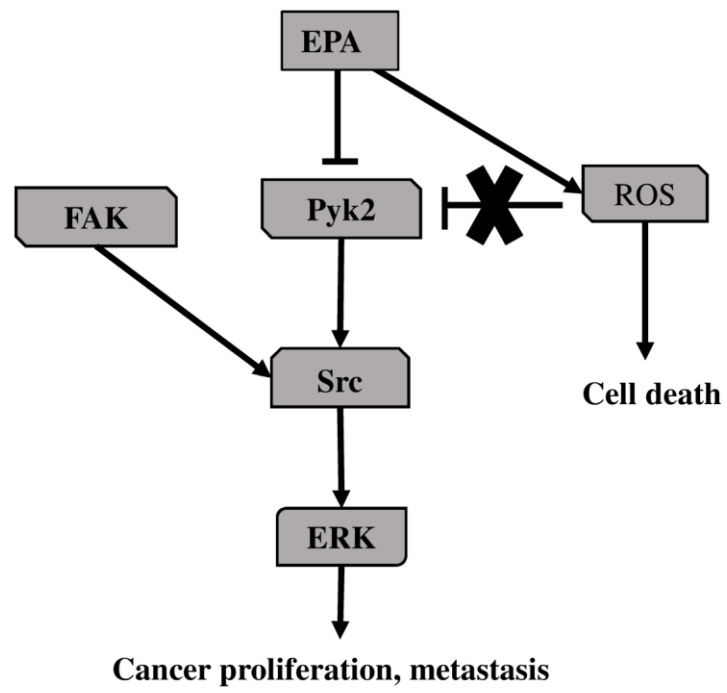


Figure 25. EPA-induced anti-cancer signaling in PC3 cells

結論

第一章より、n-3 PUFA である EPA および DHA は単独で PC3 細胞に対して増殖抑制効果と転移・浸潤抑制効果を示すことが明らかとなった。

第二章より、n-3 PUFA である EPA、DHA は 5-FU、CPA、Dox、ETP、PTX との併用において、ごく一部の組み合わせを除き、相乗効果を認めることが明らかとなった。また、併用によって抗がん剤を単独で添加するよりも抗がん剤の濃度を極めて低濃度にしても、その効果を上回ることが明らかとなった。

第三章より、n-3 PUFA である EPA は PC3 細胞内において ROS を産生することによって PC3 細胞に細胞死を誘導していること、Pyk2 を抑制することによって、その効果を表していることが明らかとなった。

謝辞

大学院入学に際し、ご尽力賜りました木村 昌行先生 日比野 康英教授
夏目 秀視教授 杉林 堅次教授に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました福島県立医科大学看護学部生命科学部門 太田 昌一郎教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学生理学講座 加園 恵三教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学有機薬化学講座 山ノ井 孝教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学病態解析学講座 小林 順教授に深甚なる謝意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬品作用学講座 岡崎 真理教授並びに城西大学薬剤作用解析学講座 小林 大介教授、城西大学衛生化学講座 工藤 なをみ教授、城西大学生体防御学日比野康英教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究及び実験の方向性につき、温かいご指導を賜りました城西大学生理学講座 大竹 一男准教授に深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導並びにご助言を賜りました城西大学臨床病理学講座 関谷 剛教授、渡辺 知恵准教授に深謝の意を表します。

引用文献

- 1 William S. Harris. Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *Journal of lipid research*. 30(6): 785-807, 1989.
- 2 Ikuo Ikeda, Jae-Young Cha, Teruyoshi Yanagita, Noriaki Nakatani, Kazuhiro Oogami, Katsumi Imaizumi, Kazunaga Yazawa. Effect of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 62(2): 675-680, 1998.
- 3 Ronald M. Krauss, Robert H. Eckel, Barbara Howard, Lawrence J. Appel, Stephen R. Daniels, Richard J. Deckelbaum, John W. Erdman, Penny Kris-Etherton, Ira J. Goldberg, Theodora A. Kotchen, Alice H. Lichtenstein, William E. Mitch, Rebecca Mullis, Killian Robinson, Judith Wylie-Rosett, Sachiko St. Jeor, John Suttie, Diane L. Tribble, Terry L. Bazzarre. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke*. 31(11): 2751-2766, 2000.
- 4 Raffaele De Caterina. N-3 fatty acids in cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*. 364(25): 2439-2450, 2011.
- 5 Francesco Paneni, Joshua A. Beckman, Mark A. Creager, Francesco Cosentino. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part 1. *European heart journal*. 34(31): 2436-2443, 2013.
- 6 Penny M. Kris-Etherton, William S. Harris, Lawrence J. Appel, Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 106(21): 2747-2757, 2002.
- 7 Masami Sato, Yukio Katsuki, Kaoru Fukuhara, Hiroyuki Kawano, Masahiro Mizota, Yoshimasa Hamada, Yasuyuki Kunihiro. Effect of highly purified ethyl all-cis-

- 5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E) on rabbit platelets. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 16(4): 362-367, 1993.
- 8 佐藤 正巳, 甲木 由紀夫, 兼広 秀生, 河野 浩之, 溝田 雅洋. 高コレステロール食飼育ウサギにおける動脈壁弾性と血管内皮依存性弛緩反応及び ethyl all-cis-5,8,11,14-icosapentaenoate(EPA-E)の影響. *日本薬理学雑誌*. 104(1): 31-38, 1994.
- 9 Yasuhiro Takenouchi, Kazuo Ohtake, Koji Nobe, Keizo Kasono. Eicosapentaenoic acids ethyl ester improves endothelial dysfunction in type2 diabetic mice. *Lipids in Health and Disease*. 17: 118-124, 2018.
- 10 Norie Sawada, Manami Inoue, Motoki Iwasaki, Shizuka Sasazuki, Taichi Shimazu, Taiki Yamaji, Ribeka Takachi, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Shoichiro Tsugane. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 142(7): 1468-1475, 2012.
- 11 Kristin Werner, Daniela Küllenberg de Gaudry, Lenka A. Taylor, Tobias Keck, Clemens Unger, Ulrich T. Hopt, Ulrich Massing. Dietary supplementation with n-3 fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: marine phospholipids versus fish oil – a randomized controlled double-blind trial. *Lipids in Health and Disease*. 16(1): 104-115, 2017.
- 12 Daryna S. Lavriv, Pedro M. Neves, Paula Ravasco. Should omega-3 fatty acids be used for adjuvant treatment of cancer cachexia? *Clinical nutrition ESPEN*. 25: 18-25, 2018.
- 13 Vanessa C. Vaughan, Melanie Sullivan-Gunn, Edward Hinch, Peter Martin, Paul A. Lewandowski. Eicosapentaenoic acid and oxypurinol in the treatment of muscle wasting in a mouse model of cancer cachexia. *Plos One*. 7(9): e45900, 2012.

- 14 Ramon Colomer, Jose M. Moreno-Nogueira, Pedoro P. Garcia-Luna, Pilar Garcia-Peris, Abelardo Garcia-de-Lorenzo, Antonio Zarazaga, Luis Quecedo, Juan del Llano, Luis Usan, Cesar Casmiro. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of literature. *The British journal of nutrition*. 97(5): 823-831, 2007.
- 15 Donatella D'Eliseo, Francesca Velotti. Omega-3 fatty acids and cancer cell cytotoxicity: implications for multi-targeted cancer therapy. *Journal of clinical medicine*. 5(2): doi: 10.3390/jcm5020015, 2016.
- 16 Mizanur Rahman, Jyothi M. Veigas, Paul J. Williams, Gabriel Fernades. DHA is a more potent inhibitor of breast cancer metastasis to bone and related osteolysis than EPA. *Breast cancer research and treatment*. 141(3): 341-352, 2013.
- 17 Julia B. Ewaschuk, Marnie Newell, Catherine J. Field. Docosahexaenoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER-breast cancer cell. *Lipids*. 47(11): 1019-1030, 2012.
- 18 Sailaja Polavarapu, Arul M. Mani, Naveen K. V. Gundala, Anasuya D. Hari, Siresha Bathina, Undurti N. Das. Effect of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on bleomycin-induced cytotoxic action on human neuroblastoma cells *in vitro*. *Plos One*. 9(12): e114766, 2014.
- 19 Yuanyuan Zhang, Lirong Han, Wentao Qi, Dai Cheng, Xiaolei Ma, Lihua Hoou, Xiaohong Cao, Chunling Wang. Eicosapentaenoic acid (EPA) induced apoptosis in HepG2 cells Ros-Ca²⁺-JNK mitochondrial pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 456(4): 926-932, 2015.
- 20 Ting Yang, Shi Fang, Hai-Xia Zhang, Li-Xiao Xu, Zhang-Qiang Zhang, Kai-Tao Yuan, Cong-Long Xue, Hong-Lan Yu, Sheng Zhang, Yu-Fei Li, Han-Ping Shi, Yan Zhang. N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer

- stem-like cells in vitro. *The Journal of nutritional biochemistry*. 24(5): 744-753, 2013.
- 21 Giada Gelsomino, Paola A. Corsetto, Ivana Campia, Gigliola Montorfano, Joanna Kopecka, Barbara Castella, Elena Gazzano, Dario Ghigo, Angela M. Rizzo Chiara Riganti. Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. *Molecular cancer*. 12:137-156, 2013.
- 22 Johannes F. Fahrman, W Elaine Hardman. Omega 3 fatty acids increase the chemosensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids in health and disease*. 12: 36-48, 2013.
- 23 厚生労働省大臣官房統計情報部. 平成 29 年(2017)人口動態統計月報年計(概数)の概況. 厚生労働省. 2018.
- 24 清水 憲二. ヒト癌における遺伝子異常の検索と遺伝子診断. *岡山医学会雑誌*. 114: 309-323, 2003.
- 25 高山 尚, 横田 淳. がん抑制遺伝子の変化. *最新医学* 47(3): 384-392, 1992.
- 26 寺田 雅昭. 序論: がんにおける複数遺伝子変化の臨床的意義. *最新医学* 47(3): 375-376, 1992.
- 27 勝木 元也. トランスジェニックマウスによる化学発がんの研究. *最新医学* 47(3): 404-410, 1992.
- 28 川崎 洋志, 下濱 俊, 西田 栄介. 神経系と MAP キナーゼスーパーファミリー. *最新医学*. 52(10): 2447-2451, 1997.
- 29 十島 二郎, 水野 健作. c-Met 受容体ファミリーと発生・分化制御. 51(11): 2211-2218, 1996.
- 30 佐方 功幸. Mos による卵成熟制御と細胞がん化. *最新医学*. 51(11): 2219-2225,

- 1996.
- 31 Asihis K. Basu. DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(4): doi: 10.3390/ijms19040970, 2018.
- 32 松井 博, 鈴木 和浩. 前立腺がんの疫学 – 罹患率・死亡率. *臨牀と研究*. 92(5): 533-537, 2015.
- 33 Global Burden of Disease Cancer Collaboration. 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 oncology*. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2706 2018.
- 34 Charles Huggins, Clarence V. Hodges. Studies on prostate cancer. 1. The Effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research*. 1: 293-297, 1941.
- 35 柴森 康介, 進藤 哲哉, 高柳 明夫, 北村 寛, 舛森 直哉. 進行性前立腺癌に対する内分泌単独療法による治療成績の検討. *泌尿器外科*. 30(6): 1019-1023, 2017.
- 36 古瀬 洋, 大園 誠一郎. ホルモン療法. *臨牀と研究*. 92(5): 573-576, 2015.
- 37 日本泌尿器外科学会編. 前立腺癌診療ガイドライン. メディカルレビュー社. 2016.
- 38 三宅 秀明, 藤澤 正人. LH-RH 誘導体. *日本臨牀*. 73(2): 313-316, 2015.
- 39 吾妻 慧一, 川上 和宣. 前立腺癌薬物治療における薬学的管理のポイント. *薬局*. 67(11): 3116-3122, 2016.
- 40 今本 敬, 市川 智彦. 5.前立腺癌. *泌尿器外科*. 30(特別): 149-173, 2017.
- 41 Oliver Sartor, Robert Coleman, Sten Nilsson, Daniel Heinrich, Svein I. Helle, Joe M

- O'Sullivan, Sophie D Fossa, Ales Chodacki, Pawef, Wiechno, John Logue, Anders Widmark, Dag Clement Johannessen, Peter Hoskin, Nicholas D. James, Ame Solberg, Isabel Syndikus, Nicholas J. Vogelzang, C Gillies O'Bryan-Tear, Minghua Shan, Oyvind S Bruland, Christopher Parker. Effect of radium-223 dichloride on symptomatic skeletal events in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases: results from a phase 3, double-blind, randomizes trial. *The Lancet. Oncology*. 15(7): 738-746, 2014.
- 42 Eric J. Small, Sandy Srinivas. The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer. *Cancer*. 76(8): 1428-1434, 1995.
- 43 溝上 敦, 泉 浩二, 並木 幹夫. 去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の発症メカニズム. *泌尿器外科*. 28(8): 1301-1303, 2015.
- 44 坂本 信一, 市川 智彦. 去勢(内分泌療法)抵抗性前立腺癌のメカニズム. *医学と薬学*. 72(1): 7-15, 2015.
- 45 溝上 敦, 泉 浩二, 並木 幹夫. CRPC 進行の機序を再考する. *泌尿器外科*. 28(1): 3-8, 2015.
- 46 宮地 禎幸. 前立腺がん用いる薬. *泌尿器ケア* 20(3): 241-249, 2015.
- 47 鈴木 和浩. 各種ガイドラインからみた CRPC の治療戦略. *泌尿器外科*. 28(1): 9-13, 2015.
- 48 Yuan-Qing Fu, Ju-Sheng Zheng, Bo Yang, Duo Li. Effect of individual omega-3 fatty acids on the risk of prostate cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of epidemiology*. 25(4): 261-274, 2015.
- 49 Ze liu, Mandi M. Hopkins, Zhihong Zhang, Chrystal B. Quisenberry, Louise C. Fix, Brianna M. Galvan, Kathryn E. Meier. Omega-3 fatty acids and other FFA4 agonist

- inhibit growth factor signaling in human prostate cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 352(2): 380-394, 2015.
- 50 Pinar O. Eser, John P. Vanden Heuvel, John Araujo, Jerry T. Thompson. Marine- and plant-derived ω -3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation. *Molecular and clinical oncology*. 1(3): 444-452, 2013.
- 51 M. Edward Kaighen, K. Shankar Narayan, Yasushi Ohnuki, John F. Lechner, Lawrence W. Johnes. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*. 17(1): 16-23, 1979.
- 52 山中 昇, 與田 順一. 癌転移の診断および治療の可能性. *耳鼻咽喉科展望*. 40(4): 386-394, 1997.
- 53 西村 理行, 波多 賢二, 田中 宗一, 森田 祥弘. 悪性腫瘍と骨病変(1)悪性腫瘍の骨転移の分子メカニズム. *The Bone*. 27(2): 205-209, 2013.
- 54 伊藤 和幸. 骨転移の分子メカニズム. *骨・関節・靭帯* 17(4): 317-322, 2004.
- 55 鷹橋 浩幸, 古里 文吾, 岡安 美央子. 前立腺癌の予後予測因子. *病理と臨床*. 30(9): 936-940, 2012.
- 56 玉田 勉, 木戸 歩, 山本 亮, 曾根 照喜, 伊東 克能. VI PI-RADS Section V 前立腺癌の病期診断. *インナービジョン* 31(6): 53-64, 2016.
- 57 Laura Munoz-Moreno, M. Isabel Arenas, Andrew V. Schally, Ana B. Fernandez-Martinez, Elias Zarka, Marta Gonzalez-Santander, Maria J. Carmera, Eva Vacas, Juan C. Prieto, Ana M. Bajo. Inhibitory effects of antagonists of growth hormone-releasing hormone on growth and invasiveness of PC3 human prostate cancer. *International journal of cancer*. 132(4): 755-765, 2013.
- 58 Jessica K. Simmons, Said M. Elshafae, Evan T. Keller, Laurie K. McCauley, Thomas J. Rosol. Review of animal models of prostate cancer bone metastasis. *Veterinary*

- sciences. 1: 16-39, 2014.
- 59 Joy C. Yang, Lanfang Bai, Stanley Yap, Allen C. Gao, Hsing-Jien Kung, Christopher P. Evans. Effect of the specific Src family kinase inhibitor saracatinib on osteolytic lesions using the PC-3 bone model. *Molecular cancer therapeutics*. 9(6): 1629-1637, 2010.
- 60 医薬品インタビューフォーム エパデールカプセル. 持田製薬株式会社. 2017年2月改定.
- 61 医薬品インタビューフォーム ロトリガ. 武田薬品工業株式会社. 2018年6月改定.
- 62 筧 善行. 泌尿器がんに適応のある化学療法薬の分類: 作用機序と由来物質の視点. *泌尿器 Care & Cure Uro-Lo*. 21(3): 309-309, 2016.
- 63 Damian A. Laber, Min-Bin Chen, Michael Jaglal, Ankia Patel, Nathan Visweshwar. Phase 2 study of cyclophosphamide, etoposide, and estramustine in patients with castration-resistant prostate cancer. *Clinical genitourinary cancer*. doi: 10.1016/j.clgc.2018.06.007, 2018.
- 64 Axel Heidenreich, Frank Sommer, Carsten H. Ohlmann, Andres J. Schrader, Peter Olbert, Josachim Goecke, Udo H. Engelmann. Prospective randomized phase 2 trial of pegylated doxorubicin in the management of symptomatic hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer*. 101(5): 948-956, 2004.
- 65 Yu-Ning Wong, Judith Manola, Gary R. Hudes, Bruce J. Roth, Judd W. Moul, Andrea M. Barsevick, Richard M. Scher, Michael J. Volk, David J. Vaughn, Stephen D. Williams, Michael J. Fisch, David Cella, Michael A. Carducci, George Wilding. Phase 2 study of weekly paclitaxel plus estramustine in metastatic hormone-refractory prostate carcinoma: ECOG-ACRIN cancer research group (E1898) trial. *Clinical*

- genitourinary cancer.16(2): e315-e322, 2018.
- 66 Masayuki Takahashi, Rumi Kawabata, Akira Kawano, Yoshihide Murakami, Yasushi Sutou, Tohru Inai, Seiji Akazawa, Takumi Hamao, Hideki Hayashi, Tomoya Fukawa, Masahiko Takemura, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa Yamaguchi, Hirofumi Izaki, Tomoharu Fukumori, Hiroomi Kanayama. Substitution of anti-androgens and tegafur-uracil combination therapy for castration-resistant prostate cancer: results of a multi-center randomized phase 2 study. *International journal of oncology*. 43(3): 713-720, 2013.
- 67 Ting-Chao Chou, Paul Talalay. Analysis of combined drug effects: anew look at a very old problem. *Trends in pharmacological sciences*. 4: 450-454, 1983.
- 68 Ting-Chao Chou. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*. 70(2): 440-446, 2010.
- 69 Ting-Chao Chou. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*. 58(3): 621-681, 2006.
- 70 William P. Petros, Gloria Broadwater, Donald Berry, Roy B. Jones, James J. Vredenburgh, Colleen J. Gilbert, John P. Gibbs, O. Michael Colvin, William P. Peters. Association of high-dose cyclophosphamide, cisplatin, and carmustine pharmacokinetics with survival, toxicity, and dosing weight in patients with primary breast cancer. *Clinical cancer research*. 8(3): 698-705, 2002.
- 71 Tomohide Tamura, Yasutsuna Sasaki, Yutaka Nishiwaki, Nagahiro Saijo. Phase 1 study of paclitaxel by three-hour infusion: hypotension just after infusion is one of the major dose-limiting toxicities. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 86: 1203-1209, 1995.

- 72 Joseph Kattan, Jean-Pierre Droz, Patrick Couvreur, Jean-Pierre Marino, Arnaud Boutan-Laroza, Philippe Rougier, Philippe Brault, Henri Vranckx, Jean-Marc Grognet, Xavier Morge, Helene Sancho-Garnier. Phase 1 clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Investigational new drugs*. *Investigational new drugs*. 10(3): 191-199, 1992.
- 73 Saby George, Robert Dreicer, Jessie J. L. Au, Tong Shen, Brian I. Rini, Susan Roman, Matthew M. Cooney, Tarek Mekhail, Paul Elson, Guillaume M. Wientjes, Ram Ganapathi, Ronald M. Bukowski. Phase 1/2 trial of 5-fluorouracil and noncytotoxic dose level of suramin in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clinical genitourinary cancer*. 6(2): 79-85, 2008.
- 74 Solomon Zimm, Stephen M. Cleary, William E. Lucas, Regis J. Weiss, Maurie Markman, Paul A. Andrews, Mark A. Schiefer, Sinil Kim, Carol Horton, Stephen B. Howell. Phase 1/Pharmacokinetic study of intraperitoneal cisplatin and etoposide. *Cancer research*. 47: 1712-1716, 1987.
- 75 Monique Aucoin, Kieran Cooley, Christopher Knee, Heidi Fritz, Lynda G. Balneaves, Rodney Breau, Dean Fergusson, Becky Skidmore, Raimond Wong Dugald Seely. Fish-derived omega-3 fatty acids and prostate cancer: a systematic review. *Integrative cancer therapies*. 16(1): 32-62, 2017.
- 76 Marie-Hélène Guertin, Karine Robitaille, Jean-François Pelletier, Thierry Duchesne, Pierre Julien, Josée Savard¹, Isabelle Bairati, Vincent Fradet. Effects of concentrated long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation before radical prostatectomy on prostate cancer proliferation, inflammation, and quality of life: study protocol for a phase II b, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

- BMC cancer. 18(1): doi: 10.1186/s12885-017-3979-9, 2018.
- 77 Zhennan Gu, Kai Shan, Haiqin Chen, Yong Q. Chen. N-3 polyunsaturated fatty acids and their role in cancer chemoprevention. *Current pharmacology reports*. 1(5): 283-294, 2015.
- 78 Paola Antonia Corsetto, Irma Colombo, Joanna Kopecka, Angela Maria Rizzo, Chiara Riganti. ω -3 long chain polyunsaturated fatty acids as sensitizing agents and multidrug resistance revertants in cancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 18(12): doi: 10.3390/ijms18122770, 2017.
- 79 Wayne D. Tilley, Jacqueline M. Bentel, James O. Aspinall, Rosemary E. Hall, David J. Horsfall. Evidence for a novel mechanism of androgen resistance in the human prostate cancer cell line, PC3. *Steroids*. 60(1): 180-186, 1995.
- 80 Alexande Chlenski, Koh-ichi Nakashiro, Kathleen V. Ketels, Galina I. Korovaitseva, Ryoichi Oyasu. Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 47(1): 66-75, 2001.
- 81 Victor J. Thannickal, Barry L. Fanburg. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 279(6): L1005-L1028, 2000.
- 82 Jennifer N. Moloney, Thomas G. Cotter, ROS signaling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*. 80: 50-64, 2018.
- 83 Soyeon Shin, Kaipeng Jing, Soyeon Jeong, Nayeong Kim, Kyoung-Sub Song, Jun-Young Heo, Ji-Hoon Park, Kang-Sik Seo, Jeongsu Han, Jong-Il Park, Gi-Ryang Kweon, Seung-Kiel Park, Tong Wu, Byung-Doo Hwang, Kyu Lim. The omega-3 polyunsturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing

- mutant p53. *BioMed research international*. doi: 10.1155/2013/568671, 2013.
- 84 Hava Avraham, Shin-Young Park, Karin Schinkmann, Shalom Avraham. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cellular signalling*. 12(3): 123-133, 2000.
- 85 佐々木 輝捷, 青砥 宏, 佐々木 洋子, 石埜 正穂. 非受容体型チロシンキナーゼ CAK β /PYK2. *蛋白質 核酸 酵素*. 44(2): 112-122, 1999.
- 86 Maylein C. Juan-Rivera, Magaly Martinez-Ferrer. Integrin inhibitors in prostate cancer. *Cancers*. 10(2): doi: 10.3390/cancers10020044, 2018.
- 87 Brian Y. Lee, Paul Timpson, Lisa G. Horvath, Roger J. Daly. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 146: 132-149, 2015.
- 88 Nichol L.G Miller, Elizabeth G. Kleinschmidt, David D. Schlaepfer. RhoGEFs in cell motility: Novel links between Rgnef and focal adhesion kinase. *Current molecular medicine*. 14(2): 221-234, 2014.
- 89 Enrique Rozengurt. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of cellular physiology*. 213(3): 589-602, 2007.
- 90 Iwona Hirschler-Laszkiwicz, Shu-jen Chen, Lei Bao, JuFang Wang, Xue-Qian Zhang, Santhanam Shanmughapriya, Kerry Keefer, Muniswamy Madesh, Joseph Y. Cheung Barbara A. Miller. The human ion channel TRPM2 modulates neuroblastoma cell survival and mitochondrial function through Pyk2, CREB and MCU Activation. *American journal of physiology. Cell physiology*. doi: 10.1152/ajpcell.00098.2018, 2018.
- 91 Caroline H. Jakobsen, Gro L. Størvold, Hilde Bremseth, Turid Follestad, Kristin Sand, Merete Mack, Karina S. Olsen, Anne G. Lundemo, Jens G. Iversen, Hans E. Krokan, Svanhild A. Schönberg. DHA induces ER stress and growth arrest in human

- colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *Journal of lipid research*. 49(10): 2089-2100, 2008.
- 92 Nadine Hempel, Mohamed Trebak. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. *Cell calcium*. 63: 70-96, 2017.
- 93 Shinichiro Yamamoto, Shunichi Shimizu, Shigeki Kiyonaka, Nobuaki Takahashi, Teruaki Wajima, Yuji Hara, Takaharu Negoro, Toshihito Hiroi Yuji KIuchi, Takaharu Okada, Shuji Kaneko, Ingo Lange, Andrea Fleig, Reinhold Penner, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Yasuo Mori. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature medicine*. 14(7): 738-747, 2008.
- 94 Michael Selitrennik, Sima Lev. PYK2 integrates growth factor and cytokine receptors signaling and potentiates breast cancer invasion via a positive feedback loop. *Oncotarget*. 8(26): 22214-22226, 2015.
- 95 Ming Zhao, Darren Finaly, Irina Zharkikh, Kristiina Vuori. Novel role of Src in priming Pyk2 phosphorylation. *PloS one*. 11(2): e0149231, 2016.
- 96 Chris K. Sun, Kwan Man, Kevin T. Ng, Joanna W. Ho, Zophia X. Lim, Qiao Cheng, Chung-Mau Lo, Ronnie T. Poon, Sheung-Tat Fan. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation. *Carcinogenesis*. 29(11): 2096-2105, 2008.
- 97 Yu Toyoshima, Hiroaki Kakuda, Kazuhiro A. Fujita, Shinsuke Uda, Shinya Kuroda. Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signalling. *Nature communications*. 3: doi: 10.1038/ncomms1745, 2012.
- 98 Ryan D. Mills, Mitsuo Mita, Michael P. Walsh. A role for the Ca^{2+} -dependent

tyrosine kinase Pyk2 in tonic depolarization-induced vascular smooth muscle contraction. *Journal of muscle research and cell motility*. 36(6): 479-489, 2015.