
学位論文

口腔扁平上皮癌細胞に対するフッ化ピリミジン系経口抗癌剤 TS-1と放射線との併用効果の解析

川口 真一

キーワード：アポトーシス, TS-1, 放射線, 口腔癌

Analysis of Combined Effects of the Oral Fluoropyrimidine Anticancer Agent, TS-1 and Radiation on a Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line

Shinichi KAWAGUCHI

Background: TS-1 is a new oral anti-neoplastic agent which can inhibit cell growth and induce apoptosis in certain types of cancer cells including gastric carcinomas, colorectal carcinomas, and oral squamous cell carcinomas. However, the combined effects of TS-1 and radiation on oral squamous cell carcinomas have not yet been clarified.

Purpose: We evaluated anti-tumor effect of TS-1 in combination with radiation both *in vitro* and *in vivo* against a human oral squamous cell carcinoma cell line, and investigated the mechanism of apoptosis enhancing activity by the combination with TS-1 and radiation.

Materials and Methods: A human oral squamous cell carcinoma cell line, B88, was used *in vitro* and *in vivo* xenografts of nude mice. In *in vitro* analysis, attached cells were treated with TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h and then irradiated (3, 6, 9, 12, 15 Gy), or they were treated with TS-1 for 1 h after radiation. Cell survival was determined by MTT assay and clonogenic assay. In *in vivo* analysis, TS-1 (10 mg/kg) was administered orally 1 h before radiation (1.5 Gy), or 1 h after radiation for five consecutive days. Apoptotic cells were detected by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method. Phosphorylated-Akt/protein kinase B (PKB) was examined by Western blotting. Expressions of Rad50, Ku70, Ku80 and catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase in xenograft tumors were investigated by immunohistochemistry.

Results: TS-1 in combination with radiation has a remarkable effect on decreasing *in vitro* cell growth. *In vitro* clonogenic survival experiments demonstrated the dose enhancement ratio of 1.22 (radiation + TS-1), or 1.45 (TS-1 + radiation) in B88 cells. In addition, the combined treatment of TS-1 and radiation resulted in an increased DNA fragmentation by detecting Hoechst 33258 staining, and suppressing the activation of Akt/PKB. Moreover, apoptosis of the cells by combined treatment of TS-1 and radiation was associated with generation of reactive oxygen/nitrogen species and the activation of caspase-8, caspase-9 and caspase-3. The combination of TS-1 and radiation was more effective than either agent alone in *in vivo* nude mouse model. Moreover, TS-1 administration before radiation was more effective than TS-1 administration after radiation. Furthermore, the combination of TS-1 and radiation could induce apoptosis significantly than either agent alone.

Conclusions: These data demonstrate that the combination of TS-1 and fractionated radiotherapy is more effective against a human oral squamous cell carcinoma cell than either agent alone, and that TS-1 administration before radiation is more effective than after radiation, suggesting a potential clinical applicability of combination treatment of TS-1 and radiation in oral squamous cell carcinoma therapies.

緒 言

日々、医療技術が進歩しているにもかかわらず癌による死亡者数は1981年以来増加し続けており、2000年で約30万人弱が癌により死亡し、今もなお日本における死因のトップである¹⁾。また癌による死亡者のうち、口腔癌による死亡者数も同様の傾向で増加している。さらに東南アジアでは、いまだ癌の50%以上が口腔癌であり²⁾、国際的にみて口腔癌の制圧は重要な医療上の課題である。口腔癌の代表的な治療法は、2001年の統計においてわが国では手術療法が第一選択である³⁾。しかし、手術療法は初期病変には有効であるが、進展例や多発例に関しては高い治療効果を得ることは難しいのが現状であり、機能温存を考慮した場合、放射線治療（以下、RTと略記）、化学療法、または両者の併用療法が多用されている。具体的には、RTと5-フルオロウラシル（5-fluorouracil；以下、5-FUと略記）⁴⁾、RTとシスプラチン⁵⁻⁷⁾、RTとタキソテール^{8,9)}等が多施設で応用されているが、高い治療効果が報告されているものの、有害事象が問題となっている。高い治療効果が得られ、機能が温存され、さらに有害事象が軽減される治療法の開発が望まれるが、現在、これらの条件をすべて満たす治療法はなく、化学・放射線療法に、免疫療法¹⁰⁾や温熱療法¹¹⁾などを併用し、優れた治療法の開発が模索されているのが現状である。

近年、わが国において開発された新規フッ化ピリミジン系経口抗癌剤 TS-1 は、テガフル（tegafur；以下、FTと略記）¹²⁾、ギメラシル（gimeracil；以下、CDHPと略記）¹³⁾、オテラシル（potassium oxonate；以下、Oxoと略記）¹⁴⁾が1:0.4:1で配合されている^{15,16)}。CDHPは5-FU分解酵素ジヒドロピリミジン脱水素酵素（dihydropyrimidine dehydrogenase；以下、DPDと略記）の可逆的阻害剤¹⁷⁾、Oxoはリン酸化酵素の可逆的阻害剤¹⁴⁾である。なお、CDHPが含まれているために5-FU単独に比較して、TS-1は長時間、高い5-FUの血中濃度を保つことが可能であり、さらにOxoが含まれていることにより消化管毒性を軽減することが可能であることから、TS-1は抗癌効果を高める一方で有害事象を軽減させるように工夫された薬剤と言える。なおTS-1単剤での奏効率は前期第二相臨床試験では46.2%、後期第二相臨床試験では28.8%と報告され、他の抗癌剤に比較して非常に高い有効性が報告されている¹⁸⁾。ただしRTとの併用療法については詳細な報告がなされておらず、むしろ第一相臨床試験として臨床治験が先行しており、著

効例が報告される一方、死亡例の報告もあり、TS-1とRTとの併用療法を行うにあたって、その有効性だけでなく安全性についても検討が必要と考えられる。

TS-1と放射線照射（Irradiation；以下、IRと略記）との併用療法の抗腫瘍効果発現のメカニズムは、未だ不明である。これまでに、5-FUはフルオロデオキシウリジンに代謝され、細胞DNAの合成阻害とミスマッチDNA修復の異常を惹起¹⁹⁾することや、また、IRが、癌細胞DNAの二重鎖断裂と活性酸素種（Reactive oxygen speices；以下、ROSと略記）／活性窒素種（Reactive nitrogen speices；以下、RNSと略記）の産生を誘導し、細胞死を惹起することなどが知られている²⁰⁾。さらにフッ化ピリミジン系抗癌剤の放射線増感効果は古くから知られている²¹⁾。しかしながら、その放射線増感をきたす詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌に対するTS-1とIRの併用効果ならびにその抗腫瘍効果発現のメカニズムについて詳細に解析した。

実験材料ならびに実験方法

培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞における放射線とTS-1との併用効果の解析

1. 細胞および培養法

実験には本学第二口腔外科で分離・樹立されたB88細胞²²⁾を用いた。B88細胞は、舌に発生した中等度分化型扁平上皮癌より樹立した細胞株で、ヌードマウス背部皮下に移植すると未分化型扁平上皮癌を発生する。B88細胞は100 mm プラスチックペトリ皿（Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA）で、10%（容量/容量；以下、v/vと略記）牛胎児血清（fetal bovine serum 以下、FBSと略記；Moregate biotech, Bulimba QLD, Australia）、100 μg/ml streptomycin（ナカライテスク、京都）、100 U/ml penicillin（ナカライテスク）、0.25 μg/ml amphotericin B（ナカライテスク）を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地（Dulbecco's modified minimum essential medium；以下、DMEMと略記；Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA）を増殖培養液として用い、空気中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37℃にて培養した。

2. 細胞増殖能の検索

細胞の増殖能は、3-(3,4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide（以下、MTTと略記；Sigma Aldrich）法を用いて測定した²³⁾。すなわち、96

ウェルマイクロプレート (Becton Dickinson Co.) に 5×10^3 個の細胞を植え込んだ後、24時間培養し、細胞がプレート上に接着するのを待って、TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) 単独処理群、IR (15 Gy) 単独処理群および TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) +IR (15 Gy) 併用処理群に分けて実験を行った。なお、X線は、150 kVp, 5 mA にて発生させ、IR は厚さ 1 mm のアルミニウム板を濾過して行った。この場合、実験には X線照射装置 (MBR-1505R2, 日立メディコ, 東京) を用いて行った。TS-1 + IR 併用処理群においては、先に TS-1 で 1 時間処理後、0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に IR を行った群と、先に IR を行った後、0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に TS-1 で 1 時間処理を行った群を比較した。48 時間培養後、最終濃度が 1 mg/ml となるように MTT 溶液を加え 37°C, 4 時間反応させ形成された MTT formazan を 100 μl のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; 以下, DMSO と略記; Sigma Aldrich) で溶解し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用いて、OD540 nm にて吸光度を測定することにより生細胞数を評価した。

3. コロニー形成能の検索

コロニー形成能の検索には clonogenic survival analysis を用いた²⁴⁾。B88 細胞を 60 mm 径プラスチックペトリ皿 (Becton Dickinson Co.) 上でサブコンフルエントになるまで培養した。その後、IR 単独処理群では IR (3, 6, 9 Gy) を行った。また、TS-1 で処理した後、IR を行った処理群 (以下, TS-1 → IR と表記) においては 10% (v/v) FBS 添加 DMEM に TS-1 を含む溶液にて処理を行い、その 1 時間後に IR (0, 3, 6, 9 Gy) を行った。IR 後、TS-1 処理を行った処理群 (以下, IR → TS-1 と表記) においては、IR (0, 3, 6, 9 Gy) を行った 1 時間後に 10% (v/v) FBS 添加 DMEM に TS-1 を含む溶液にて処理を行った。その後、10% (v/v) FBS 添加 DMEM で 37°C, 9 日間培養を行った。形成されたコロニーを、カルノア溶液 (メタノール: 酢酸 = 3:1) で固定後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin; 以下, HE と略記, Mutou Chemicals, Tokyo) で染色し、染色されたコロニーを肉眼で算定した²⁵⁾。Surviving fraction (以下, SF と略記) は、コロニー数/播種細胞数 \times plating 効率より算定した²⁶⁾。実験は 3 回繰り返して、その平均値を clonogenic survival fraction とした。線量増強比 (dose enhancement ratio; 以下, DER と略記) は、IR 単独の SF が 0.1 の時の放射線量を TS-1 + IR 併用各群の SF が 0.1 の時の放射線量で除することにより算出した。

4. アポトーシス関連因子の活性化の検索

アポトーシスに関連する caspase-3, -8, -9 の活性は、colorimetric Assay キット (Bio Vision, Palo Alto, CA, USA) を用いて測定した²³⁾。

B88 細胞に対して TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) 処理、IR (15 Gy) 処理および TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) +IR (15 Gy) 併用処理を行い、72 時間培養した後、細胞を回収し、キットに付属する cell lysis buffer にて蛋白の抽出を行った。一穴あたり 100 μg の抽出蛋白を 96 穴マイクロプレート (Becton Dickinson Co.) に移し、caspase-3, -8, -9 の活性測定用基質 caspase-3, -8, -9 Substrate (最終濃度 50 mM) をそれぞれ添加した。37°C で 1 時間の反応後に caspase-3, -8, -9 により基質から遊離する p-nitroanilide の発色をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、吸光度 405 nm で測定した。

5. DNA 染色によるアポトーシスの検出 (ヘキスト 33258 染色法)

カバーガラス上に 5×10^4 個の細胞を播種し、24 時間培養を行い、 Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まない 0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline 以下, PBS (-) と略記) (pH 7.4) にて洗浄後、TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) を含む 10% FBS 添加 DMEM で 24 時間処理を行い、TS-1 処理開始 1 時間後に IR (0, 3, 6, 9 Gy) を行った。処理開始から 72 時間後に、カルノア溶液で固定を行い、PBS (-) にて洗浄した後、2 $\mu\text{g/ml}$ の DNA 結合性色素 Hoechst 33258/Hanks (Hanks' balanced salt solution; 以下, Hanks と略記) (pH 7.0) (和光純薬, 大阪) にて 30 分間染色した。再度 PBS (-) で洗浄し、落射型蛍光顕微鏡 Eclips E600 (日本光学, 東京) を用いて倍率 100 倍で検鏡し、一視野あたり 100 個の細胞中、DNA 断片化を伴うアポトーシス誘導細胞を算定して 10 視野の総細胞数中のアポトーシス誘導細胞数の割合を算出した。

6. ヌードマウス背部皮下における増殖能の検索

1×10^6 個の細胞は、0.1 ml の DMEM に浮遊させ、ヌードマウス (4 週齢, メス, Balb/cA Jcl-nu; 日本クレア, 東京) 背部皮下に移植した。TS-1 は、滅菌蒸留水で 0.5% (重量/容量; 以下, w/v と略記) の割合に sodium hydroxypropylmethyl cellulose (以下, HPMC と略記) (信越化学工業, 東京) で溶解した溶液で、1 mg/ml に調製した。実験には、TS-1 水溶液を 10 mg/kg/日、経口投与した。RT は 1.5 Gy/日 で連日、週 5 回で行った。その間、経時的に腫瘍の長径・短径ならびに体重を測定した。なお腫瘍体積は、 $0.4 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ にて算出した²⁷⁾。また、計測は腫瘍体積が約 40~50 mm^3 に達してから開始した。

なお、本研究において行われた動物実験は、徳島大学歯学部動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて行った。

7. DNA 断片化の検出 (TUNEL 法)

組織切片のアポトーシスはアポトーシス *in situ* 検出キット (和光純薬) を用いて検出した。すなわち、断裂

した DNA の 3'-OH 末端をターミナルトランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT) によりデオチン-dUTP で標識する TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法²⁸⁾ に準じて行った。ヌードマウスに TS-1 (10 mg/kg/日) を経口投与した実験群, IR (1.5 Gy/日: 5回/週) 実験群および TS-1 (10 mg/kg/日) +IR (1.5 Gy/日: 5回/週) 併用治療実験群において3週間治療を行った後, エーテル麻酔下に屠殺し, それぞれの背部皮下に発生した腫瘍を摘出した。その後, ホルマリン固定, パラフィン包埋後, 厚さ 4 μ m のパラフィン切片を作製した後, amino silanes (以下, APS と略記) (松浪硝子, 大阪) でコートされたスライドガラス上で, 脱パラフィン, 親水化を行いタンパク分解処理を施した。TdT 溶液にて 37°C, 10 分間反応させ 3% (v/v) 過酸化水素水を含む溶液にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化したのち, デオチン化 dUTP 標識抗体 (和光純薬) で 37°C 10 分間反応させ, 3'-diaminobenzidine (以下, DAB と略記) 溶液で発色させた。続いて, 0.2% (v/v) hematoxylin で対比染色を施し, 脱水, 透徹処理を行ったのち封入し検鏡した。

8. Western blot 法

培養細胞の蛋白標品は, 蛋白抽出用 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate; 以下, SDS と略記; 和光純薬), 1% (v/v) Triton X 100, 1% (w/v) sodium deoxycholate] で処理して, 調製した。蛋白濃度は, Bradford の方法²⁹⁾ に準じたマイクロアッセイ法 (Bio-Rad) により測定した。その後, 5% (v/v) β -mercaptoethanol (Sigma Aldrich) を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) に, 2% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) bromophenol blue (片山化学, 大阪), 10% (v/v) glycerol (和光純薬) を加えた loading buffer に混和して, 10% (w/v) acrylamide (和光純薬) の分離ゲルを用いて, Laemmli の方法³⁰⁾ に準じてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 以下, SDS-PAGE と略記) を行った。泳動標品は Towbin らの方法³¹⁾ に準じて polyvinylidene difluoride 膜 (以下, PVDF 膜と略記; Bio-Rad) に 100 V, 3 時間, 氷冷下にて電氣的に転写し, この PVDF 膜を 5% (w/v) skim milk (ナカライテスク) を含む トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline; 以下, TBS と略記) を用いて非特異的反応をブロッキングした。一次抗体として, TBS で 500 倍に希釈した抗ヒト Akt/PKB マウスモノクロナル抗体 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle UK), 抗ヒト p-Akt マウスモノクロナル抗体 (Novocastra Laboratories Ltd.) を用い, 2 次抗体として TBS で 1,000 倍希釈した horseradish peroxidase (以下, HRP と略記) 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)

を用いて反応させ, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham Pharmacia Biotech) にて検出した。

9. ROS/RNS 発現の検索 (Fluorescence microscopic method)

100 mm 径プラスチックペトリ皿にて培養した B88 細胞に, Leach³²⁾ らの方法に準じて, ジヒドロ-DCE (dichlorofluorescein) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (5 μ M) と fura2 (2 μ M) (同仁化学工業, 熊本) および 10 mM HEPES (pH 7.4) を添加して, 30 分間室温にて放置した。さらに 5 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ を PBS (-) に溶かした溶液と交換した後, TS-1 (50 μ g/ml) 処理, IR (15 Gy) および TS-1 (50 μ g/ml) +IR (15 Gy) の併用処理を行い, ROS/RNS 解析システム蛍光顕微鏡 IX71 (オリンパス, 東京) にて, 360 nm と 490 nm の励起光をプラスチックペトリ皿に交互に照射し, 視野中の任意の細胞をマークして, その細胞の DCF と Ca²⁺ に結合した fura2 の蛍光画像を 520 nm で交互に 30 秒間隔で経時的に収集した。さらに DCF と fura2 の励起による蛍光量の比 (DCF の蛍光量 / fura2 の蛍光量) の変化を経時的に定量することによって ROS/RNS の産生を測定した。

10. 免疫組織学的検索

ヌードマウス腫瘍細胞の phosphorylated-Akt (以下, p-Akt と略記), Rad50, Ku70, Ku80 および catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (以下, DNA-PKcs と略記) の発現はアビジン・デオチンペルオキシターゼ複合体法 (avidin biotin immunoperoxidase complex technique; 以下, ABC 法と略記) により検出した³³⁾。Rad50, Ku70, Ku80 および DNA-PKcs は放射線等により損傷した DNA 二重鎖の修復に関わるタンパクである³⁴⁻³⁶⁾。まず, ヌードマウス背部皮下腫瘍を切除後, ホルマリン固定し, パラフィンブロック作製後に厚さ 4 μ m のパラフィン切片を作成し, xylene (ナカライテスク), ethyl alcohol (和光純薬) による脱パラフィンを行った。内因性 peroxidase 活性を阻止するため, 0.3% (v/v) 過酸化水素水を含む methyl alcohol で処理し, PBS (-) で洗浄した後, 10 mM クエン酸ナトリウム (pH 6.0) 中にて 500 W 電子レンジを用い 10 分間沸騰させ, 室温で 20 分徐冷させた。その後, 100 倍に希釈した 1 次抗体 [抗ヒト p-Akt マウスモノクロナル抗体 (Novocastra Laboratories Ltd.), 抗ヒト Rad50 ウサギポリクロナル抗体 (Santa Cruz), 抗ヒト Ku70 マウスモノクロナル抗体 (Santa Cruz), 抗ヒト Ku80 ウサギポリクロナル抗体 (Santa Cruz), 抗ヒト DNA-PKcs ウサギポリクロナル抗体 (Santa Cruz) と 4°C にて一晩反応させた。次いで, ベクスタイン ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いデオチン化抗ウサギ抗体あるいはデオチン化抗マウス抗体を 2 次抗体として反応させ, DAB (Sigma Aldrich) を用いて発色させた後,

hematoxylin にて対比染色を行い観察した。

11. 統計的解析法

各々の実験データの解析および統計処理については, Stat View (Abacus Concept Inc., Grand Rapids, MI, USA) を用い, 実験データの有意差検定には Student の t 検定を, ノードマウス移植腫瘍体積の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

結 果

1. 細胞増殖能への影響

TS-1 で処理した後, IR を行った実験群 (TS-1 → IR) と IR 後, TS-1 処理を行った実験群 (IR → TS-1) の B88 の細胞増殖能に与える影響を検索した。図 1 A に示すように, 先に TS-1 で処理し, 0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に IR を行った実験群では IR 単独群に比較して, 有意に細胞増殖が抑制された (図 1 A)。一方, 先に IR を行い, 0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に TS-1 で処理を行った実験群では IR 単独群と比較して, IR 後 48 時間で TS-1 処理した実験群においてのみ細胞増殖抑制効果が有意に低下していた (図 1 B)。以上の実験結果より, 以後の TS-1 + IR 併用処理実験では, 最も細胞増殖抑制効果が高かった TS-1 処理後, 1 時間で IR を行うこととした。

2. コロニー形成への影響

B88 細胞を, IR 単独処理または IR → TS-1 あるいは TS-1 → IR 併用処理後 9 日目に形成されたコロニーを図 2 A に示す。IR 単独群に比較して, TS-1 処理を併用した処理群の方が形成されたコロニー数は減少した。また, IR → TS-1 処理群に比較して TS-1 → IR 処理群の方が形成されたコロニー数は減少した。次に TS-1 と IR の併用がコロニー形成に与える影響を検索するため, clonogenic survival curve を作製し, 解析した (図 2 B)。その結果, IR 単独処理群と比較した場合, TS-1 → IR あるいは IR → TS-1 処理群は各照射線量において SF は低値を示した。例えば, SF0.1 において TS-1 → IR 処理群の照射線量は 9.6 Gy であり, IR → TS-1 処理群での照射線量は 11.8 Gy で, その時の IR 単独処理群の照射線量は 14.3 Gy であることより, DER は TS-1 → IR 処理群では $14.3/9.6=1.48$, IR → TS-1 処理群では $14.3/11.8=1.21$ であった。すなわち, TS-1 は IR の効果を増強している可能性が示唆された。

3. アポトーシス関連因子の活性の検索

TS-1 と IR が, アポトーシス誘導経路において重要な役割を担っている caspase-8, -9, -3 活性に与える影響を検索した。図 3 に colorimetric assay の結果を示す。Caspase-3 は未処理対照に対して, TS-1 処理群, IR 群および TS-1 + IR 併用処理群で有意な活性の上昇が認められた (各々 $p < 0.01$)。Caspase-8, -9 では IR 群および

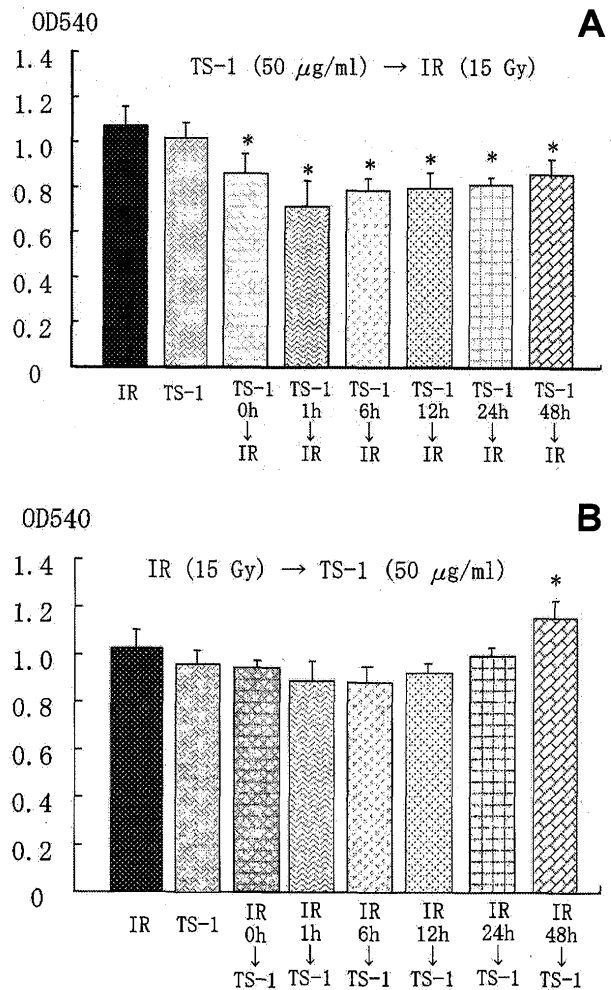


図 1 細胞増殖能への影響

A. B88細胞を TS-1 で処理した後, 0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に IR を行った場合の増殖能に与える影響を示す。IR 単独群に比較して, TS-1 処理後に IR を行った群では有意に細胞増殖が抑制された。(*: $p < 0.01$, Student's t-test)

B. B88細胞に IR を行い, 0, 1, 6, 12, 24, 48 時間後に TS-1 で処理を行った場合の増殖能に与える影響を示す。IR 単独群と比較して, IR 後 48 時間で TS-1 処理した群では, 有意な細胞増殖抑制効果の減弱が認められた。(*: $p < 0.01$, Student's t-test)

TS-1+IR 併用処理群で未処理対照に対して有意な活性の上昇が認められた (各々 $p < 0.01$)。

4. Hoechst33258 によるアポトーシスの検出

前実験により TS-1 と IR の併用が細胞増殖抑制を増強する可能性が示唆されたが, 細胞増殖抑制作用にアポトーシス誘導が関与するかどうかを検索した。

図 4 A に示すように未処理対照に比較して, TS-1 処理群, IR 群および TS-1 → IR 併用処理群ではアポトー

シスを示唆する DNA の断片化が多く観察され、特に TS-1 → IR 併用処理群では TS-1 単独処理群あるいは IR 単独処理群と比較して DNA の断片化が多く観察された。DNA 断片化が生じた細胞数を算定した結果を図 4 B に示す。未処理対照と比較して TS-1 単独処理群、IR 単独処理群および TS-1 → IR 併用処理群は DNA 断片化を生じた細胞数が有意に高値を示した。さらに、IR 単独処理群と TS-1 → IR 併用処理群を比較したところ、TS-1 → IR 併用処理群の方が DNA 断片化を生じた細胞数が有意に増加した。

5. ノードマウス移植腫瘍増殖能の検索

ノードマウスに対する TS-1 投与量と照射線量は、すでに報告されているデータに基づいて検討した³⁷⁻³⁹⁾。マウス実験系において TS-1 は 10~24 mg/kg/日 で使用されており^{37, 38)}、RT は 1.5 Gy/日 あるいは 2 Gy/日 で 5 日間、連日照射されている^{38, 39)}。本実験においては、TS-1 投与量は 5, 10, 15 mg/kg/日 として腫瘍増殖抑制効果と副作用について検討した。さらに照射線量は、1, 1.5, 2 Gy/日 として週 5 回照射した。TS-1 投与量が 10, 15 mg/kg/日 では、未処理対照と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果が得られたが、体重減少は認めなかった (図 5 A)。また、照射線量が、1, 1.5, 2 Gy/日 で週 5 回照射したすべてのマウスで未処理対照と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 5 B)。但し、照射線量 2 Gy/日 で照射実験を行った場合、マウスに著明な体重減少と皮膚炎の発症を認めた。以上の実験結果より、TS-1 + RT 併用処理実験群における実験条件を決定するため、副作用を認めない照射線量を 1.5 Gy/日、週 5 回照射として、更に TS-1 投与量について検討した。その結果、TS-1 (15 mg/kg/日) と RT (1.5 Gy/日) の組み合わせでは 3 週間の実験期間中に未処理対照と比較して著明な体重減少を認めた。併用実験群では、有意でかつ最大の腫瘍増殖抑制効果を認めた TS-1 投与量 (10 mg/kg/日) と RT 照射線量 (1.5 Gy/日) を用いて以下の実験を行った。

TS-1 投与と RT がノードマウス背部皮下腫瘍の増殖に与える影響を検索した。図 6 A に各群の腫瘍体積の平均値を示す。未処理対照と比較して、TS-1 治療群、RT 群および TS-1 + RT 併用治療群では有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された (各々 $p < 0.01$)。さらに、RT → TS-1 治療群と TS-1 → RT 治療群では、後者の腫瘍増殖の抑制効果が有意に高かった ($p < 0.01$)。なお、実験期間中、いずれの治療群においても、担癌ノードマウスの体重に有意差を認めなかった (図 6 B)。

6. ノードマウス移植腫瘍におけるアポトーシスの検索

前実験より *in vivo* においても、TS-1 と RT の併用治療はそれぞれ単独に比較して腫瘍増殖抑制作用が増強された。そこで、その腫瘍増殖抑制作用にアポトーシ

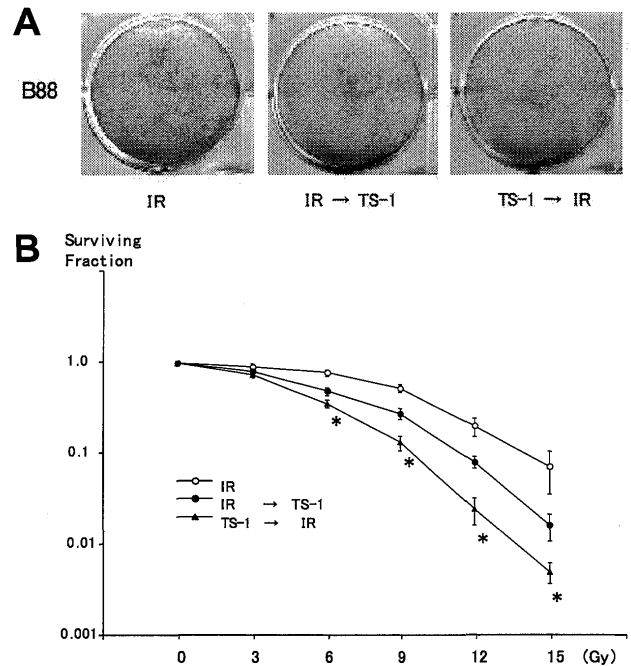


図 2 コロニー形成への影響

A. IR 単独処理に比較して、IR → TS-1 あるいは TS-1 → IR 併用処理後では、形成されたコロニー数は減少していた。

B. 平均コロニー数を播種細胞数と plating 効率との積にて割ることにより surviving fraction を求め、clonogenic survival curve を描いた。IR 単独処理群と比較した場合、TS-1 → IR あるいは IR → TS-1 併用処理群は各照射線量において SF は低値を示した。

(* : $p < 0.01$, Student's t-test)

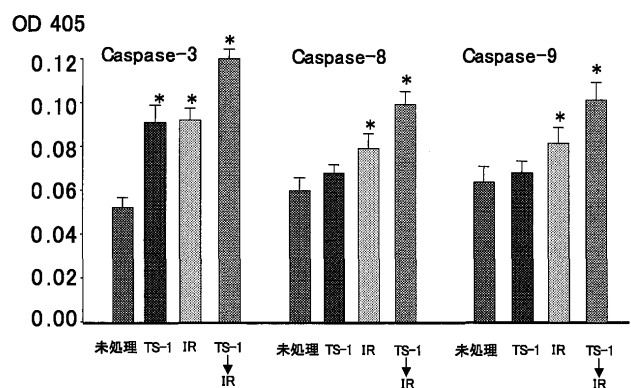


図 3 アポトーシス関連因子の活性の検索

TS-1 と IR がアポトーシス関連因子である caspase-3, -8, -9 の活性に与える影響を colorimetric assay で検索した結果を示す。Caspase-3 では TS-1 単独処理および IR 単独処理並びに TS-1 + IR 併用処理で有意な活性の上昇が認められた ($p < 0.01$)。また、caspase-8, -9 では、IR 単独処理および TS-1 + IR 併用処理で未処理対照に対して有意な活性の上昇が認められた ($p < 0.01$)。(* ; $p < 0.01$, Student's t-test)

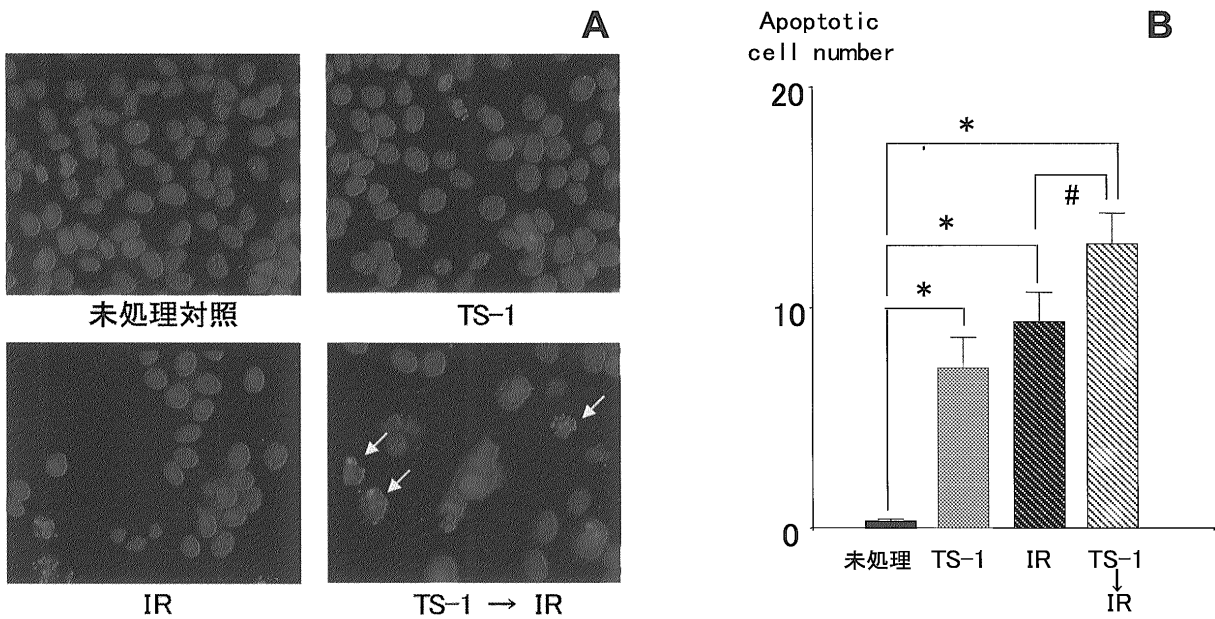


図4 TS-1とRTによるアポトーシス誘導の検索

A. B88細胞をTS-1単独処理或いはIR単独処理並びにTS-1+IR併用処理を行って、Hoechst33258染色を行った。未処理対照に比較して、TS-1単独処理群、IR単独処理群および併用処理群(TS-1→IR)ではアポトーシスを示唆するDNAの断片化が多く観察された(矢印)。

B. 10視野中のアポトーシス細胞数を算出した。未処理対照に比較して、すべての処理群でDNA断片化を生じた細胞数が有意に高値を示した。また、TS-1→IR併用処理群はTS-1およびIR処理群と比較してDNA断片化を生じた細胞数が有意に高値を示した。(*; $p < 0.01$, #; $p < 0.01$: Student's t-test)

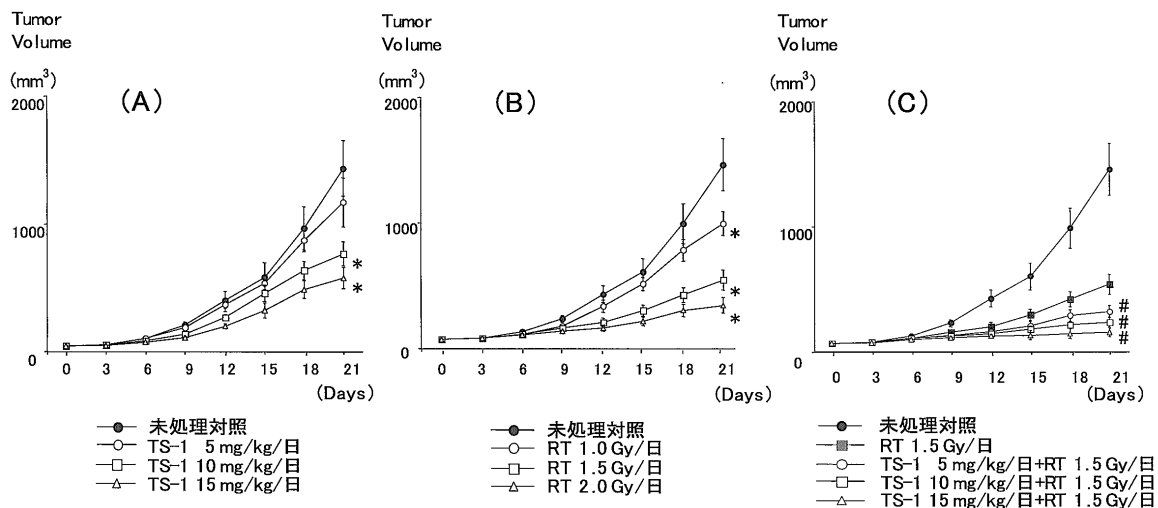


図5 ヌードマウス腫瘍に対するTS-1およびRTの併用

ヌードマウス腫瘍に対するTS-1投与量および照射線量を決定するために、(A) TS-1治療群 ($n = 4$), (B) RT群 ($n = 4$), (C) 併用治療群 ($n = 4$) に分け治療を行い、腫瘍体積を計測した。

(A) TS-1濃度10, 15 mg/kg/日では未処理対照に比較して有意な腫瘍体積の減少が認められた。

(B) 照射線量1, 1.5あるいは2 Gy/日、週5回照射した実験群では、未処理対照に比較して有意な腫瘍体積の減少が認められた。

(C) 照射線量1.5 Gy/日で照射し、TS-1投与量5, 10, 15 mg/kg/日の併用治療群では、未処理対照およびRT単独治療群と比較して有意な腫瘍体積の減少が認められた。

(#; $p < 0.01$, 未処理対照 vs TS-1→RT, Mann-Whitney U-test)

(*; $p < 0.01$, RT単独治療群 vs TS-1→RT, Mann-Whitney U-test)

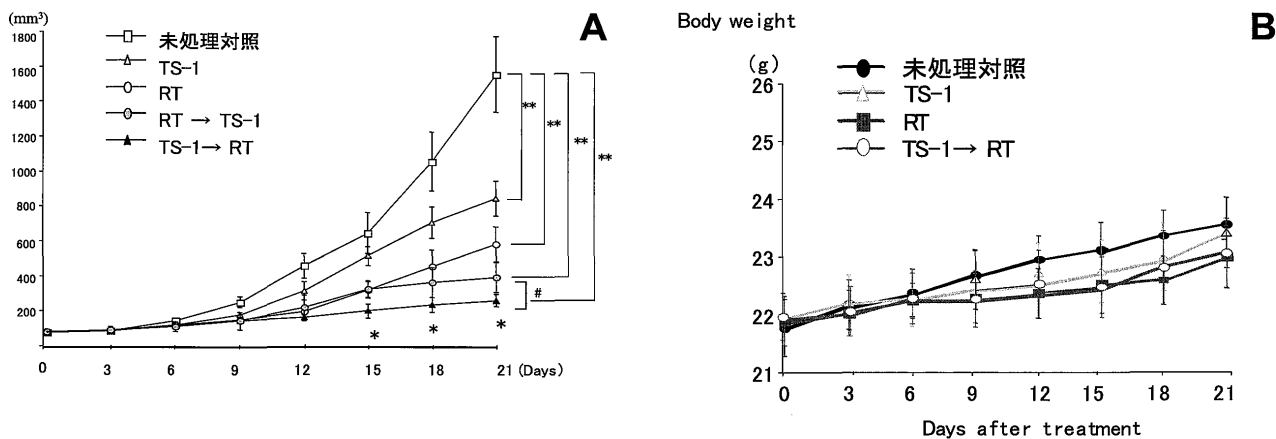


図6 ヌードマウス移植腫瘍増殖能の検索

A. 担癌ヌードマウスを未処理対照, TS-1 治療群 (10 mg/kg/日), RT 群 (1.5 Gy/日: 5回/週), RT → TS-1 併用治療群, TS-1 → RT 併用治療群の5群に分け, B88 細胞を背部皮下に移植し, 経時的に腫瘍体積および体重を計測した。(全ての実験群: n = 4, Bar: 標準偏差)

(*; p < 0.01, RT vs TS-1 → RT, Mann-Whitney U-test)

(#; p < 0.01, RT → TS-1 vs TS-1 → RT, Mann-Whitney U-test)

(**; p < 0.01, 未処理対照 vs TS-1, RT, RT → TS-1, TS-1 → RT, Mann-Whitney U-test)

B. ヌードマウスの体重変化。ヌードマウス体重の平均値 (n = 4), Bar: 標準偏差

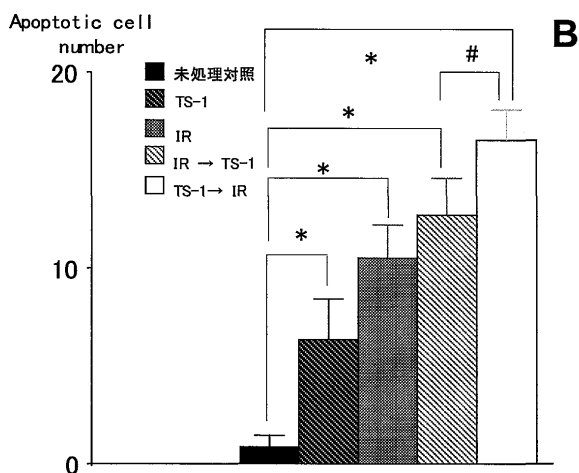
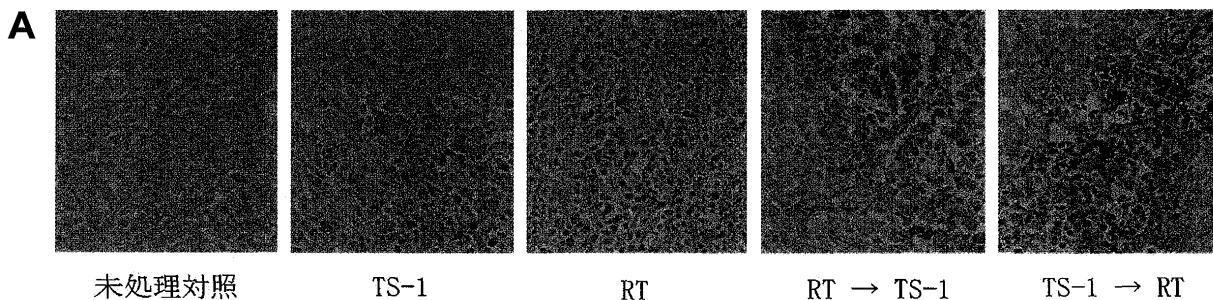


図7 ヌードマウス移植腫瘍におけるアポトーシスの検索

A. 担癌ヌードマウスを未処理対照, TS-1 (10 mg/kg/日) 治療群, RT (1.5 Gy/日: 5回/週) 群, RT → TS-1 併用治療群, TS-1 → RT 併用治療群の5群に分け, 切除した腫瘍組織を用いて TUNEL method によるアポトーシス誘導の検索を行った。未処理対照に比較して, TS-1 治療群, RT 群および TS-1+RT 併用治療群ではアポトーシスを示す TUNEL 陽性細胞数は増加し, 特に TS-1 → RT 併用治療群では大部分の細胞が TUNEL 陽性細胞となっていた。

B. 一視野中に占める TUNEL 陽性細胞数を算定した。未処理対照に比較して TS-1 治療群, RT 群および TS-1+RT 併用治療群で TUNEL 陽性細胞数は有意に増加していた (各々, p < 0.01)。RT → TS-1 併用治療群と TS-1 → RT 併用治療群では後者の TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた (p < 0.01)。

(*; p < 0.01, #; p < 0.01: Student's t-test)

スの関与があるか否かについて検索した。担癌ヌードマウスから切除した腫瘍組織を TUNEL 法で検索した結果、未処理対照に対して、TS-1 治療群、RT 群および TS-1 + RT 併用治療群で一視野中に観察されるアポトーシスを示唆する TUNEL 陽性細胞数は増加し、特に TS-1 → RT 併用治療群では大部分の細胞でアポトーシスを起こしていることが明らかになった (図 7 A)。次に一視野中に占める TUNEL 陽性細胞数を算定した (図 7 B)。未処理対照に比較して TS-1 治療群、RT 群および TS-1 + RT 併用治療群で TUNEL 陽性細胞数は有意に増加し (各々 $p < 0.01$)、RT → TS-1 併用治療群と TS-1 → RT 併用治療群では後者の TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた ($p < 0.01$)。すなわち、TS-1 と RT の併用治療は、アポトーシスの誘導を増強する可能性が示唆された。

7. TS-1 と IR 併用処理の ROS/RNS 産生への影響

IR により癌細胞死が惹起される際、ROS/RNS の産生が誘導され DNA 二重鎖断裂が生じると考えられている^{40, 41}。そこで、TS-1 と IR 併用処理の ROS/RNS 産生への影響を検索した。ROS/RNS の産生は TS-1 処理群および IR 処理群において処理開始直後から漸増しているが、TS-1 → IR 処理群では併用処理直後から急激に増加し始め、5 分経過してもさらに増加が認められた (図 8)。すなわち、TS-1 と IR を併用処理することにより、それぞれ単独処理に比較して ROS/RNS の産生の増強が示唆された。

8. TS-1 と IR 併用の Akt/PKB 発現への影響

効果的な癌細胞死を惹起させるためには、アポトーシスを含ま細胞死を増強するだけでなく、生存シグナルを抑制することが重要と考えられる。そこで、TS-1 と IR の併用処理が、生存シグナル Akt/PKB に与える影響を検索した⁴²。

Akt/PKB はリン酸化を受け p-Akt となりその作用を発現⁴³ するため、Akt/PKB がリン酸化された p-Akt の発現を経時的に Western blot 法にて検索した。その結果 TS-1 単独処理群では処理直後に比べ、24 時間後で p-Akt の発現レベルは低下していたが、IR 単独群では処理直後に比較して 12、24 時間後では発現レベルの増強が認められた。TS-1 → IR 処理群では処理直後に比較して 12、24 時間後 p-Akt の発現レベルは低下していた (図 9 A)。さらに、*in vivo* において、TS-1 単独および RT 単独あるいは併用治療を行ったヌードマウス背部皮下腫瘍に対して、免疫組織学的染色を行った結果、TS-1 → RT 治療群では、未処理対照、TS-1 治療群および RT 群に比較して p-Akt の発現が顕著に低下していた (図 9 B)。

9. TS-1 と RT 併用治療の DNA 修復関連因子への影響

DNA 修復に関連する蛋白の発現を免疫組織学的染色

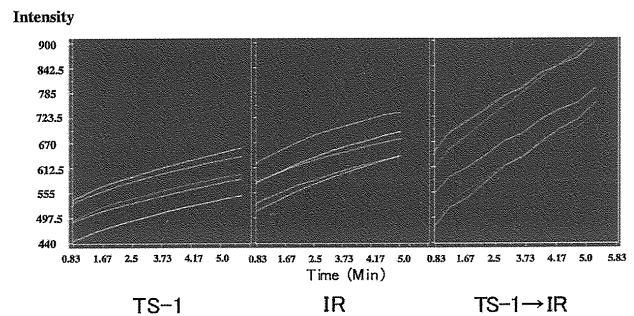


図 8 TS-1 と IR 併用処理の ROS/RNS 産生への影響

TS-1 および IR 処理および TS-1 → IR 併用処理後、経時的に ROS/RNS の産生を観察したところ、TS-1 → IR 処理群では他の 2 群に比較して、ROS/RNS の産生は処理開始直後から急激に増加し始め、5 分経過してもさらに増加が認められた。グラフの縦軸は蛍光量の比 (DCF の蛍光量 / *fura2* の蛍光量) を横軸は経過時間を示す。なお、グラフの曲線は、一視野中の任意の細胞 5 個をマークし、各細胞の蛍光量の比の変化を示したものである。

で検索を行った。その結果、未処理対照に比較して RT 群では、Ku80 および DNA-PKcs 発現の増強が見られた。また未処理対照に比較して TS-1 治療群では、Ku80 発現の減弱が認められた。さらに TS-1 + RT 併用治療群では、未処理対照、TS-1 治療群および RT 群に比較して Rad50, Ku70, Ku80 および DNA-PKcs 発現の顕著な低下が見られた。(図 10 A, B, C, D)。

考 察

口腔扁平上皮癌の治療においては、より高い生存率が求められるのと同時に、他の悪性腫瘍以上に高い機能温存ならびに形態の保持が求められる。この点から、口腔扁平上皮癌に対する放射線治療の役割は非常に重要である。また、抗癌剤との併用に関しては、1980年代から 1990年代前半の報告では否定的なものが多かったものの、近年、放射線治療単独に比較し、生存率が有意に改善するという報告は多く、今後、益々、化学放射線療法への役割は大きくなるものと思われる。しかし、化学放射線療法の有効性は認識されつつあるも、どの併用方式良いか、どの病期に行うべきか、手術との効果的な併用方法は何かなど、まだ多くの解決すべき問題点が残されている。今回、検討した TS-1 と IR の併用療法もすでにわが国において耳鼻咽喉科ならびに口腔外科が中心となり臨床試験が先行されており、進行癌に対して劇的な治療効果が報告され、その有効性が認識されつつある。しかしながら、現在、至適濃度等が検討されているところであり、併用方式等について、また、併用効果発現のメカニズムについて未だ詳細な報告はなされていない。そこで、本研究においては、フッ化ピリミジン系経口抗

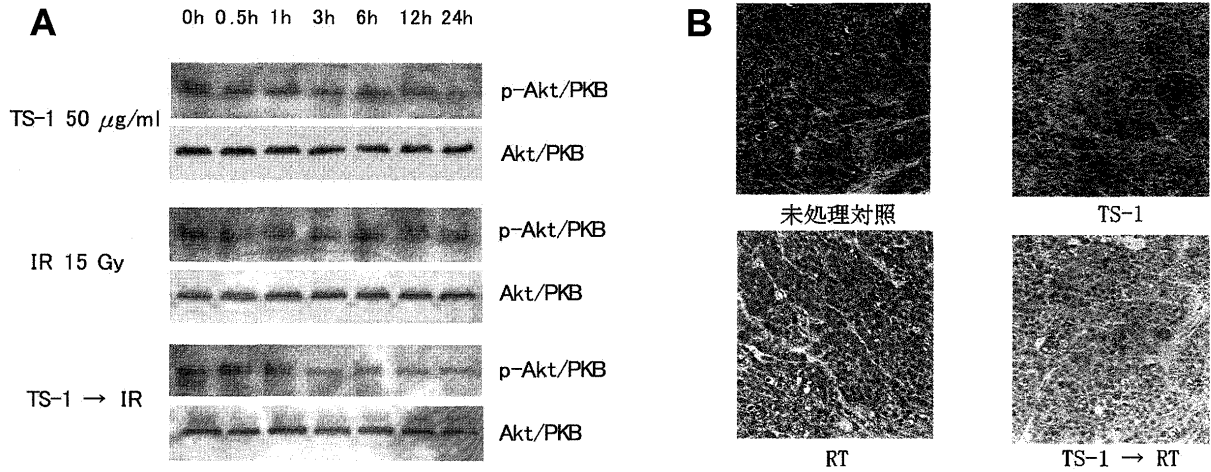


図9 TS-1 と IR 併用の Akt/PKB 発現への影響

A. p-Akt の発現 (Western blotting) TS-1 処理群および TS-1 → IR 併用処理群では経時的に p-Akt の発現が低下していた。IR 群では、経時的に p-Akt の発現はやや高くなっていった。各群での Akt/PKB の発現に経時的な変化は観察されなかった。

B. p-Akt の発現 (免疫組織学的染色)

未処理対照に比較して TS-1 → RT 併用治療単独群ではその発現が低下していた。

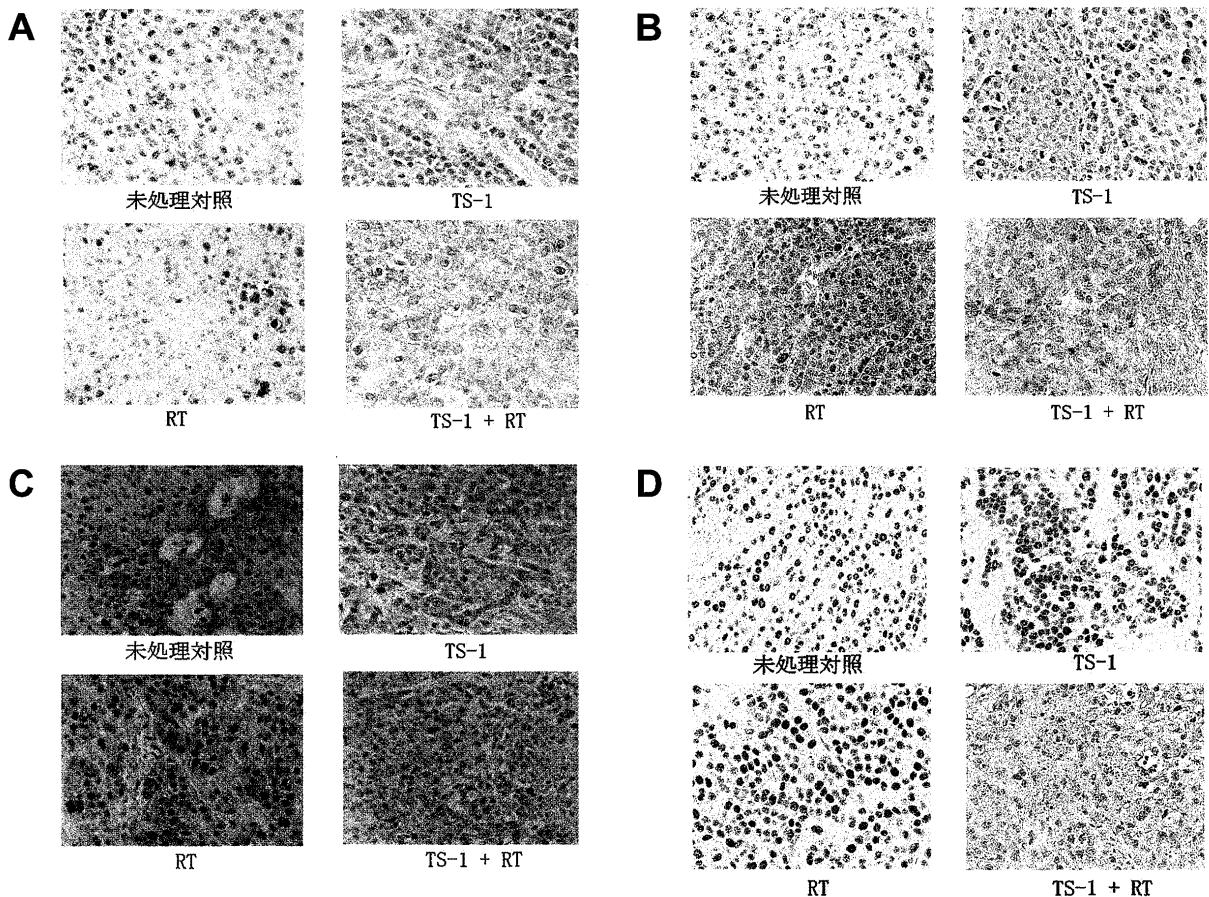


図10 TS-1 と RT 併用治療の DNA 修復関連因子への影響

担癌マウスを未処理対照, TS-1 治療群 (10 mg/kg/日), RT 群 (1.5 Gy/日: 5回/週), RT → TS-1 併用治療群, TS-1 → RT 併用治療群の 5 群に分け, 切除した腫瘍組織を用いて DNA 修復に関連する因子である Rad 50 (A), Ku70 (B), Ku80 (C) および DNA-PKcs (D) の発現を免疫組織学的染色で検索した。

Rad 50, Ku70 および DNA-PKcs の発現は, 未処理対照, TS-1 治療群および RT 群に比較して併用治療群において低下していた。また, Ku80 の発現は未処理対照および RT 群に比較して併用治療群において低下していた。

癌剤 TS-1 と IR との併用における抗腫瘍効果発現のメカニズムについて解析を行った。

まず、TS-1 と IR それぞれ、あるいは併用処理による口腔扁平上皮癌細胞 B88 の増殖に与える影響について検索を行ったところ、それぞれ容量依存性に増殖抑制効果を発現すること、さらに処理後48時間で約50%程度の増殖抑制効果を発現する TS-1 濃度 (50 $\mu\text{g/ml}$)、IR 線量 (15 Gy) を併用したところ、TS-1 処理を先行後、時間を変えて IR を行った群と IR を先行後、時間を変えて TS-1 処理を行った群との細胞の増殖能に大きな変化がみられた。また、*in vitro* だけでなく *in vivo* においても TS-1 単独治療、IR 単独治療に比較して TS-1 と IR の併用治療により、高い増殖抑制効果が得られるという知見を得た。さらに、TS-1 と IR を同時に処理するよりも、TS-1 処理後、1 時間で IR を行うレジメンが最も腫瘍の増殖を抑制した。これは、以下に述べる TS-1 の作用機構に関連があると考えられる。TS-1 は肝臓だけでなく、腫瘍細胞内でプロドラッグである FT が代謝を受け、5-FU に変換された後、さらにリン酸化を受けて最終的には 5-フルオロウリジン-5'-3'リン酸 (以下、FUTP と略記) となり、この FUTP が RNA に取り込まれて RNA の機能障害を引き起こし、抗腫瘍効果をもたらす^{19, 44-48)}。主に低容量の 5-FU は 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン-5'-1'リン酸 (以下、FdUM と略記) に変換され、還元型葉酸の 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (以下、5, 10- CH_2FH_4 と略記) およびチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase; 以下、TS と略記) とともに強固な三者共有結合体 (ternary complex) を形成する。TS は DNA 合成に不可欠なチミジン-5'-1'リン酸 (以下、dTMP と略記) の合成に関与する律速酵素であるために、この TS の作用が阻害されると dTMP の供給が断たれて DNA 合成が阻害され、抗腫瘍効果を発現する⁴⁹⁻⁵³⁾。TS-1 は上記の機構で抗腫瘍効果を発現すると考えられているため、TS-1 処理後に RNA および DNA 障害が惹起している時に IR を行えば、TS-1 による DNA 障害に加えて、IR による DNA 障害を期待することができるため、その効果が増強される可能性が考えられる。また、5-FU 分解酵素である DPD 活性および DNA 合成における律速酵素である TS 活性が異なる腫瘍細胞においては、抗腫瘍効果の発現の仕方に差異が生じる可能性がある。すなわち、DPD 活性、TS 活性が共に低い腫瘍においては、5-FU の分解が阻害され、かつ DNA 合成が阻害されるため、5-FU にとって感受性の高い腫瘍であるが、逆に DPD 活性、TS 活性が共に高い腫瘍は 5-FU 系抗腫瘍剤に耐性と考えられる。したがって DPD、TS をあらかじめ測定し、DPD、TS が低ければ TS-1 単独でも大きな効果が期待されるが、DPD、TS が高ければ別の治療法、例えば IR との併用等が有効な手段になる可能性が考えられる。また、IR 後48時間で TS-1 処理を行った実験群では細胞増殖抑制効果が IR 単独実験群に比べて有意に低

下していたが、これは IR を行うことにより G2/M 期への細胞の割合を上昇させること、ならびに TS-1 が S 期に細胞を停止させようとする作用⁵⁴⁾ が拮抗して生じた可能性が考えられる。すなわち、IR と TS-1 の作用点の違いがそれぞれの作用を拮抗させ、併用による細胞増殖抑制効果の減弱につながったと推察される。加えて、IR は転写因子である NF- κ B (nuclear factor kappa B) を活性化させアポトーシスを抑制する⁵⁵⁾ ということが知られており、IR 後48時間で TS-1 処理を行った場合には、IR による NF- κ B の活性化を介したアポトーシスの抑制効果が顕著となり細胞増殖抑制効果の減弱が生じた可能性も考えられる。

さらに、TS-1 と IR を併用した場合の増殖抑制作用がアポトーシスの増強によるものか否かは Hoechst33258 染色を用いて検索を行った。TS-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) と IR (15 Gy) を併用した場合、それぞれ単独処理に比較して、有意にアポトーシスを誘導していた。これらの結果から、TS-1 は IR による B88 細胞のアポトーシスによる細胞死を増強させている可能性が示唆された。

また、TS-1 と IR 併用のアポトーシス増強のメカニズムについても生化学的なレベルで検討を行った。アポトーシスの誘導には2つの大きな経路があり、一つはレセプターを介した経路、もう一つはミトコンドリアを介する経路である。両方の経路で caspase は重要な役割を担っている。Caspase-8 はデスレセプターから、caspase-9 はミトコンドリアからのチトクローム c の放出を受け、そのシグナルを下流にある caspase-3 に伝えアポトーシスを誘導している⁵⁶⁾。また、5-FU は、東らの報告⁵⁷⁾ により唾液腺癌細胞において FLIP 蛋白の発現を低下させ、5-FU による caspase-8 活性の上昇を引き起こすことが明らかにされている。そこで、TS-1、IR および両者の併用が caspase-3、-8、-9 の活性がどのような影響を及ぼしているのか検索した。図4に示すように、TS-1 は IR と併用することによって caspase-9 および caspase-8 の活性を上昇させ、さらに caspase-3 の活性を上昇させることにより、アポトーシスによる細胞死を増強していることが示唆された。つまり、TS-1 と IR の併用は、2つの独立した経路でアポトーシスの誘導を増強していると考えられた。TS-1 と IR と併用することによる caspase-3、-8、-9 の活性上昇のメカニズムとして、IR 単独処理で caspase-9 の活性が上昇することがすでに知られており⁵⁸⁾、5-FU が caspase-8 の活性を上昇させる⁵⁹⁾ こと、さらに Akt は caspase-9 を抑制することによりミトコンドリアから細胞質へのチトクローム c の放出とチトクローム c 放出以下の caspase の活性化を抑制するという2つの段階で caspase の活性化を抑制することが分かっている⁶⁰⁾。このため、両者の併用が Akt の発現を低下させる結果、caspase-9 の活性が上昇し、その下流にある caspase-3 の活性を増強させている可能性が示唆された。しかし、IR で caspase-8 の活性が上昇した

メカニズムについては不明である。

In vivo 担癌ヌードマウスモデルにおける抗腫瘍効果を図6 Aに示した。この結果が示すように、TS-1とRTの併用が、それぞれ単独に比較してより抗腫瘍効果が高かった。ヒト結腸癌細胞を用いた担癌ヌードマウスモデルにおいて、TS-1は抗腫瘍効果を持つことはすでに報告されている⁶¹⁾。また、5-FUとRTを用いた治療法は、5-FUが持つ放射線増感剤としての働きがあるために古くより、臨床的に用いられてきた⁶²⁻⁶⁴⁾。

前にも触れたが、5-FUはピリミジンの類似体であるため、DNA合成を阻害することが知られている⁴⁷⁾。また、IRを受けた細胞は5-FUの分解に遅れが生じているとの報告もみられる⁶⁵⁾。TS-1は、その成分としてFTを持ち、FTが5-FUに変換されるため、TS-1も5-FUと同様に放射線増感剤として働いていると考えられる。さらに、興味深い事に、IRの前にTS-1を投与すると、IRの後にTS-1を投与するよりも腫瘍増殖抑制効果が有意に高かった。また、IRの前にTS-1処理を行えば、IR後にTS-1処理を行うよりコロニー形成能の低下が見られることを、clonogenic assayの結果より得ている(図2 A, B)。つまり、IRの前にTS-1で処理することで、IR後にTS-1で処理するよりも、より効果的にコロニー形成能を抑制していることが示唆された。また、IRの前にTS-1で処理することにより、IR後にTS-1で処理するよりも有意にアポトーシスを誘導した(図7 A, B)。TS-1とRTを併用する治療において、TS-1が最高血中濃度(Cmax)に達するのに1時間を必要とするならば、RTの1時間前にTS-1を投与する方法が最も効果が高いと考えられる。以上から、TS-1は口腔扁平癌細胞B88において放射線増感作用を持つことが示唆された。

さらに、近年放射線増感の新しい概念として、生存シグナルおよびROS/RNS産生への影響²⁰⁾、DNA二重鎖断裂修復機構への影響³⁴⁻³⁶⁾が考えられる。そこで、それぞれについて検討を加えた。細胞の生死にはアポトーシスシグナルと生存シグナルのバランスが重要である。効果的な抗腫瘍効果を考えた場合、アポトーシスが促進されるだけでなく生存シグナルが抑制されることは癌細胞死を導く上で非常に重要となる。

アポトーシス制御機構の一つとしてキナーゼによる制御機構があり、Akt/PKBはPI3 kinaseの下流で活性化して細胞の生存を促進するセリン/スレオニンキナーゼ^{42, 43)}であり、caspaseの活性化を制御していることが明らかにされている⁶⁰⁾。生存シグナルの中心的役割をなすAkt/PKBの活性化型であるp-Aktについて検索を行ったところ、IR単独が処理開始後、12, 24時間でp-Aktの発現レベルを増加させる傾向にあるのに対し、TS-1とIRの併用では、IRによるp-Aktの発現レベルを抑え、処理開始後、12, 24時間でp-Aktの発現レベルを低下させていた(図9 A, B)。すなわち、TS-1とIRの併用は、生存シグナルであるAkt/PKBの活性化型のp-Aktの発現

を低下させ、さらにアポトーシスシグナルを増強させることによりアポトーシスの誘導を増強する方向へと導いていることが示唆された。

近年、放射線照射が癌細胞DNAの二重鎖断裂とROS/RNSの産生を誘導し、細胞死を惹起することが知られ、アポトーシス増強への関与が示唆されている^{66, 67)}。ROS/RNSの産生とTS-1とIRの併用との関連につき検索を行った結果、ROS/RNSの産生はTS-1とIRの併用処理によりそれぞれ単独処理に比較して増加していた(図8)。このため、B88細胞におけるアポトーシス誘導経路において、TS-1とIRの併用処理によるROS/RNS産生の増強がアポトーシスの誘導を増強していることが示唆された。

細胞においてDNAは決して安定な化合物ではなく、細胞内の反応性環境、毒物、紫外線や放射線などによって、絶えず損傷を受けている。DNAの損傷は細胞の老化や死などを引き起こす原因となる。このため、細胞内では損傷を受けたDNAを修復しようとする働きがみられる。例えば、放射線等によりDNA鎖の切断(一本鎖切断と二本鎖切断)とDNA塩基の変化修飾が生じるとRad50, Ku70, Ku80およびDNA-PKcsといった修復に関連する蛋白³⁴⁻³⁶⁾の発現が高まり、損傷を受けた部位の修復を行うことが近年明らかにされている^{68, 69)}。ヒト正常細胞においても日常的にこの修復作用が働き、細胞の生命を維持している。修復関連蛋白であるRad50, Ku70, Ku80およびDNA-PKcsはDNA二重鎖断裂を修復する際に重要な役割を演じている。

この修復機構に関与する因子につき、TS-1とIRの併用がどのように影響を与えているかについて検討した。TS-1とIRの併用により、それぞれ単独処理に比較して、上記の修復関連蛋白の発現が低下していた(図10 A, B, C, D)。すなわち、TS-1およびIRはそれぞれ単独でもDNAの障害を起こすが、TS-1とIRを併用することにより、DNA障害を生じさせ、さらにその修復機構に関与する修復関連蛋白の発現を低下させることにより細胞増殖を抑制していることが示唆された。

以上から、TS-1とRTの併用が著明な増殖抑制を示すメカニズムとして、アポトーシスの増強や生存シグナルの抑制、さらに二重鎖断裂修復機構抑制による放射線増感作用の増強が関与していることが示唆された。実際、臨床においてTS-1とRTの併用療法は劇的な治療効果を示しており、その効果は注目値する。TS-1は三剤の合剤であることから、それぞれが放射線増感剤としての未知のメカニズムが隠されているかも知れない。今後はそれぞれの成分とIRとの併用効果について検索を予定している。

結 語

In vitro でのTS-1とIRの併用は、

- 1) 同時またはTS-1を先行処理した場合にはIR単独処

理群に比較して有意な増殖抑制効果が得られたが、IRを先行した場合にはIR単独処理群に比較して有意な増殖抑制効果は認められず、特にIR後48時間でTS-1処理した群では、逆に有意な細胞増殖の促進が認められた。

- 2) 増殖抑制が生じている細胞では、アポトーシスの誘導が増強していることが示唆された。
- 3) IR単独の場合より有意にコロニー形成能を低下させることが示唆された。
- 4) アポトーシス関連因子である caspase-3, 8 および 9 活性を有意に上昇させることが示唆された。

in vivo での TS-1 と RT の併用は

- 1) 有意にアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を発現していることが示唆された。

以上の結果より、TS-1は放射線増感作用を有し、両者を併用することによりアポトーシスの誘導を増強し、より高い抗腫瘍効果を発現していることが示唆された。

さらに、その増感作用のメカニズムについてTS-1とIRの併用は

- 1) IRによるROS/RNSの産生誘導を増強させ、生存シグナルの一つであるAkt/PKBのIRによる活性化の抑制を認めた。
- 2) 損傷したDNA二重鎖の修復に関連する蛋白の発現を抑制し、修復機能の低下を来すことが示唆された。

以上の結果より、TS-1とIRの併用は

1. p-Aktを介した生存シグナルの抑制
2. Rad50, Ku70, Ku80ならびにDNA-PKcsを介したDNA二重鎖切断修復機構の抑制

以上が関与し、その結果放射線感受性を高め、アポトーシスの誘導を増強し、抗腫瘍効果を発現していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、終始御指導を賜った歯科放射線学講座 誉田栄一教授および口腔外科学第二講座 佐藤光信教授、本研究の実施に際し御指導を戴いた口腔外科学第二講座 原田耕志博士に心から謝意を表します。また、御高閲を戴いた長山 勝教授、ならびに研究の円滑な進展に特別の御配慮を戴いた歯科放射線学講座および口腔外科学第二講座の教室員の方々に深謝致します。

引用文献

- 1) Kuroishi T, Hirose K, Takezaki T, Tominaga S and Tajima K.: Cancer mortality in JAPAN (1950-2000). Gann Monograph on Cancer Research 51, 1-93 (2004)
- 2) Kuroishi T, Hirose K, Takezaki T, Tominaga S, Tajima K and Aoki K.: CANCER MORTALITY STATISTICS IN 30 COUNTRIES (1953-1997). Gann Monograph on Cancer Research 51, 165-229 (2004)

- 3) 海老原敏: 頭頸部癌取扱い規約 第3版. 東京, 金原出版, 2001, 85
- 4) Giralt JL, Gonzalez J, Campo JM, Maldonado J, Sanz X, Pamas J, Eraso A, Bescos S and Raspall G.: Preoperative induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy in advanced carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Cancer 89, 939-945 (2000)
- 5) Otman GJ, Cummings FJ, Glicksman AR, Doolittle CL and Leone LA.: Preoperative simultaneously administered cis-platinum plus radiation therapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Head Neck Surg 8, 159-164 (1986)
- 6) Dasmahapatra KS, Citrin P, Hill GJ, Yee R, Mohit-Tabatabai MA and Rush BF Jr: A prospective evaluation of 5-fluorouracil plus cisplatin in advanced squamous-cell cancer of the head and neck. J Clin Oncol 3, 1486-1489 (1985)
- 7) Zidan J, Kuten A, Rosenblatt E and Robinson E: Intensive chemotherapy using cisplatin and fluorouracil followed by radiotherapy in advanced head and neck cancer. Oral Oncol 33, 129-135 (1997)
- 8) Hesse K, Heinrich B, Zimmermann F, Kau R, Sommer G, Achterrath W, Molls M and Feldmann HJ: Combined radiochemotherapy with docetaxel in patients with unresectable locally advanced head and neck tumors. Strahlenther Onkol 176, 67-72 (2000)
- 9) Tishler RB, Norris CM Jr, Colevas AD, Lamb CC, Karp D, Busse PM, Nixon A, Frankenthaler R, Lake-Willcutt B, Costello R, Case M and Posner MR: A Phase I/II trial of concurrent docetaxel and radiation after induction chemotherapy in patients with poor prognosis squamous cell carcinoma of the head and neck Cancer 95, 1472-1481 (2002)
- 10) Okamoto M, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, Yoshida H, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M and Sato M: Enhancement of anti-tumor immunity by lipoteichoic acid-related molecule isolated from OK-432, a streptococcal agent, in athymic nude mice bearing human salivary adenocarcinoma: role of natural killer cells. Anticancer Res 22, 3229-3239 (2002)
- 11) Nagashima K, Takagi R and Hoshina H: Effect of local hyperthermia on metastases in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg 31, 84-89 (2002)
- 12) Giller SA, Zhuk RA and Lidak Miu: Analogs of pyrimidine nucleosides. I. N1-(alpha-furanidyl) derivatives of natural pyrimidine bases and their antimetabolites. Dokl Akad Nauk SSSR 176, 332-335 (1967)
- 13) Tatsumi K, Fukushima M, Shirasaka T and Fujii S:

- Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. *Jpn J Cancer Res* 78, 748-755 (1987)
- 14) Shirasaka T, Shimamoto Y and Fukushima M: Inhibition by oxonic acid of gastrointestinal toxicity of 5-fluorouracil without loss of its antitumor activity in rats. *Cancer Res* 53, 4004-4009 (1993)
 - 15) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Yamaguchi M, Kato T, Yonekura K and Fukushima M: Development of a novel form of an oral 5-fluorouracil derivative (S-1) directed to the potentiation of the tumor selective cytotoxicity of 5-fluorouracil by two biochemical modulators. *Anticancer Drugs* 7, 548-557 (1996)
 - 16) Shirasaka T, Nakano K, Takechi T, Satake H, Uchida J, Fujioka A, Saito H, Okabe H, Oyama K, Takeda S, Unemi N and Fukushima M: Antitumor activity of 1 M tegafur-0.4 M 5-chloro-2,4-dihydropyridine-1 M potassium oxonate (S-1) against human colon carcinoma orthotopically implanted into nude rats. *Cancer Res* 56, 2602-2606 (1996)
 - 17) Takiuchi H and Ajani JA :Uracil-tegafur in gastric carcinoma: a comprehensive review. *J Clin Oncol* 16, 2877-2885 (1998)
 - 18) Inuyama Y, Kida A, Tsukuda M, Kohno N and Satake B: Late phase II study of S-1 in patients with advanced head and neck cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 28, 1381-1390 (2001)
 - 19) Wilkinson DS and Pitot HC: Inhibition of ribosomal ribonucleic acid maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouracil and 5-fluorouridine. *J Biol Chem* 248, 63-68 (1973)
 - 20) Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP and Kwok TT: Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* 73, 2047-2058 (2003)
 - 21) Smalley SR, Kimler BF and Evans RG: 5-Fluorouracil modulation of radiosensitivity in cultured human carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20, 207-211 (1991)
 - 22) Supriatno, Harada K, Hoque MO, Bando T, Yoshida H and Sato M: Overexpression of p27 (Kip1) induces growth arrest and apoptosis in an oral cancer cell line. *Oral Oncol* 38, 730-736 (2002)
 - 23) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47, 943-946 (1987)
 - 24) Papadopoulou MV, Epperly MW, Shields DS and Bloomer WD: Radiosensitization and hypoxic cell toxicity of NLA-1 and NLA-2, two new bioreductive compounds. *Jpn J Cancer Res* 83, 410-414 (1992)
 - 25) Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M and Ikawa S: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 4, 839-843 (1998)
 - 26) Caudry M, Causse N, Trouette R, Recalchini L, Maire JP and Demeaux H: Radiotoxic model for three-dimensional treatment planning. Part 1: Theoretical basis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25, 907-919 (1993)
 - 27) Beseth BD, Cameron RB, Leland P, You L, Varricchio F, Kreitman RJ, Maki RA, Jablons DM, Husain SR and Puri RK: Interleukin-4 receptor cytotoxin as therapy for human malignant pleural mesothelioma xenografts. *Ann Thorac Surg* 78, 436-443 (2004)
 - 28) Umemura S, Yasuda M, Osamura RY, Kawarada Y, Sugiyama T and Tsutsumi Y: Enhancement of TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method using mung bean nuclease, a single-stranded DNA digestion enzyme. *J Histochem Cytochem* 44, 125-132 (1996)
 - 29) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254 (1976)
 - 30) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
 - 31) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)
 - 32) Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R and Mikkelsen RB: Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61, 3894-3901 (2001)
 - 33) 本望一昌, 櫻井信司, 弘中貢, 菊池みどり, 溝上昌代, 森永正二郎, 齊藤建: ホルマリン固定パラフィン包埋腎生検検体における酵素抗体法間接法の工夫. *病理と臨床* 19, 775-779 (2001)
 - 34) Bentley J, Diggle CP, Harnden P, Knowles MA and Kiltie AE: DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res* 32, 5249-5259 (2004)
 - 35) Ismail SM, Buchholz TA, Story M, Brock WA and Stevens CW: Radiosensitivity is predicted by DNA end-binding complex density, but not by nuclear levels of band components. *Radiother Oncol* 72, 325-332 (2004)
 - 36) Wechsler T, Chen BPC, Harper R, Morotomi-Yano K,

- Huang BCB, Meek K, Cleaver J.E, Chen D.J and Wabl M: DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1247-1252 (2004)
- 37) Fujiwara H, Terashima M, Irinoda T, Takagane A, Abe K, Nakaya T, Yonezawa H, Oyama K, Takahashi M, Saito K, Takechi T, Fukushima M and Shirasaka T: Superior antitumour activity of S-1 in tumours with a high dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Eur J Cancer* 39, 2387-2394 (2003)
- 38) Harada K, Kawaguchi S, Supriatno, Onoue T, Yoshida H and Sato M: Combined effects of the oral fluoropyrimidine anticancer agent, S-1 and radiation on human oral cancer cells. *Oral Oncol* 40, 713-719 (2004)
- 39) Amorino GP, Mohr PJ, Hercules SK, Pyo H and Choy H: Combined effects of the orally active cisplatin analog, JM216, and radiation in antitumor therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 46, 423-426 (2000)
- 40) Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP and Kwok TT: Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* 73, 2047-2058 (2003)
- 41) Mikkelsen RB and Wardman P: Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734-5754 (2003)
- 42) Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC and Izumo S: Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 22, 2799-809 (2002)
- 43) Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Rawlings DJ and Kawakami T: Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 279, 47720-47725 (2004)
- 44) Takiuchi H and Ajani JA: Uracil-tegafur in gastric carcinoma: a comprehensive review. *J Clin Oncol* 16, 2877-2885 (1998)
- 45) Wilkinson DS, Tlsty TD and Hanas RJ: The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. *Cancer Res* 35, 3014-3020 (1975)
- 46) Stolfi RL, Sawyer RC, Nayak R, Spiegelman S and Martin DS: Protection by testosterone from fluorouracil-induced toxicity without loss of anticancer activity against autochthonous murine breast tumors. *Cancer Res* 40, 2730-2735 (1980)
- 47) Carrico CK and Glazer RI: Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res* 39, 3694-3701 (1979)
- 48) Spiegelman S, Sawyer R, Nayak R, Ritzi E, Stolfi R and Martin D: Improving the anti-tumor activity of 5-fluorouracil by increasing its incorporation into RNA via metabolic modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4966-4970 (1980)
- 49) Hartman KU and Heiderberger C: Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase. *J Biol Chem* 236, 3006-3013 (1961)
- 50) Langenbach RJ, Danenberg PV and Heidelberger C: Thymidylate synthetase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridylylate. *Biochem Biophys Res Commun* 48, 1565-1571 (1972)
- 51) Santi DV and McHenry CS: 5-Fluoro-2'-deoxyuridylylate: covalent complex with thymidylate synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 1855-1857 (1972)
- 52) Spears CP, Shahinian AH, Moran RG, Heidelberger C and Corbett TH: in vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition of 5-fluorouracil-sensitive and -resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 42, 450-456 (1982)
- 53) Spears CP, Gustavsson BG, Mitchell MS, Spicer D, Berne M, Bernstein L and Danenberg PV: Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil. *Cancer Res* 44, 4144-4150 (1984)
- 54) Johnson K R, Wang L, Miller M C, Willingham M C and Fan W: 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells. *Clinical Cancer Res* 3, 1739-1745 (1997)
- 55) Barkett M and Gilmore T D: Control of apoptosis by Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924 (1999)
- 56) Thornberry NA and Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316 (1998)
- 57) Azuma M, Yamashita T, Aota K, Tamatani T and Sato M: 5-Fluorouracil suppression of NF-KappaB is mediated by the inhibition of IKappab kinase activity in human salivary gland cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 292-296 (2001)
- 58) Rocha S, Soengas MS, Lowe SW, Glanzmann C, Fabbro D, Winterhalter K, Bodis S and Pruschy M: Protein kinase C inhibitor and irradiation-induced apoptosis: Relevance of the cytochrome c-mediated caspase-9 death pathway. *Cell Growth Differ* 11, 491-499 (2000)
- 59) Yi TB and Yang LY: Caspase-8 in apoptosis of hepatoma cell induced by 5-fluorouracil. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2, 98-101(2003)
- 60) Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK and Hay N: Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing

- the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 19, 5800-5810 (1999)
- 61) Mori T, Fujiwara Y, Yano M, Tamura S, Yasuda T, Takiguchi S and Monden M : Experimental study to evaluate the usefulness of S-1 in a model of peritoneal dissemination of gastric cancer. *Gastric Cancer* 6, 13-18 (2003)
 - 62) Nakajima Y, Miyamoto T, Tanabe M, Watanabe I and Terasima T: Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with X-rays. *Cancer Res* 39, 3763-3767 (1979)
 - 63) Berry RJ: Effects of some metabolic inhibitors on x-ray dose-response curves for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated x-ray doses. *Br J Radiol* 39, 458-463 (1966)
 - 64) Lo TC, Wiley AL Jr, Ansfield FJ, Brandenburg JH, Davis HL Jr, Gollin FF, Johnson RO, Ramirez G and Vermund H: Combined radiation therapy and 5-fluorouracil for advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a randomized study. *Am J Roentgenol* 126, 229-235 (1976)
 - 65) Matsubara S: Fundamental remarks on combination radiotherapy with anti-neoplastic agents. *Jpn J Cancer Clin* 45, 271-273 (1999)
 - 66) Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP and Kwok TT: Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* 73, 2047-2058 (2003)
 - 67) Mikkelsen RB and Wardman P: Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734-5754 (2003)
 - 68) Bentley J, Diggle CP, Harnden P, Knowles MA and Kiltie AE: DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res* 32, 5249-5259 (2004)
 - 69) Ismail SM, Buchholz TA, Story M, Brock WA and Stevens CW: Radiosensitivity is predicted by DNA end-binding complex density, but not by nuclear levels of band components. *Radiother Oncol* 72, 325-332 (2004)