Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Synergistic anti-tumor effect of ionomycin and cisplatin against renal cell carcinoma in vitro and in vivo

岡本，雅之

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2001-07-11
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2558
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002558

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【１４５】

氏　名・（本　籍）　岡本　雅之　（大阪府）

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医学）

学　位　記　番　号　　博ろ第１８０９号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第２項該当

学位授与の　日　付　　平成１３年７月１１日

【学位論文題目】

SYNERGISTIC ANTITUMOR EFFECT OF IONOMYCIN AND CISPLATIN AGAINST RENAL CELL CARCINOMA IN VITRO AND IN VIVO

（腎細胞癌に対するイオノマイシンおよび
シスプラチンの相乗的抗腫瘍効果）

審　査　委　員

主査　教授　守殿　貞夫

教授　黒田　嘉和　　教授　前田　盛

【目的】腎細胞癌は現有の抗癌剤に対し抵抗性であるため、転移を有する腎細胞癌の予後は近年の手術療法や免疫療法の進歩にもかかわらず極めて不良である。したがって予後を改善するための新しい化学療法が求められており、その一つとしてアポトーシスを誘導する薬剤の応用が考えられる。これらの薬剤は従来の抗癌剤と異った経路で癌細胞を死に至らしめるため新しい治療法となる可能性がある。

Ca^{2+}の細胞膜の透過性を高める物質(calcium ionophore)による細胞内Ca^{2+}レベルの持続的上昇はアポトーシスを引き起こすことが知られており、ある種の腫瘍細胞においては抗癌剤と併用することにより相乗的な抗腫瘍効果が得られることが報告されている。

今回我々は、抗癌剤抵抗性克服の試みとして、calcium ionophoreであるイオノマイシン(Ionomycin)を既存の抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)と併用することにより抗腫瘍効果が増強されるか否かにつき、ヒト腎細胞癌細胞株(ACHN)を用いて検討した。

【方法】まずIonomycinとCDDPのin vitroでのヒト腎細胞癌細胞株(ACHN)に対する細胞増殖抑制効果をMTT法を用いて測定した。この時のDNA断片化の程度を知るため、アガロースゲル電気泳動法を用いDNAラダーの検出を行った。またフローサイトメーター（EPICS ELITE）を用いて相対的なDNA量を測定することによりこれら薬剤の細胞周期に与える影響を調べた。さらにWestern blotting法を用いて、アポトーシス関連遺伝子であるBcl-2、Bax蛋白の発現が上記薬剤の処理によりどう変化するかを検討した。最後にIonomycinとCDDP併用療法のin vivoでの抗腫瘍効果をヌードマウスの皮下腫瘍モデルを用い検討した。

【結果】低濃度のIonomycin、CDDPの単独投与ではヒト腎細胞癌細胞株の細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、これらの併用により有意に細胞増殖が抑制された。DNAラダーの検出ではIonomycin、CDDPの単独投与ではわずかにしか核の断片化を認めなかったが、併用群でより明瞭な核の断片化が観察された。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、sub-G1期の細胞分画が併用群で有意な増加を認めており、この細胞増殖の抑制はG1期の細胞がアポトーシスに陥ったためと思われた。Western blotting法の結果、Bcl-2の発現レベルはIonomycin、CDDPの単独および併用群で差を認めなかったが、Baxは併用群で有意な発現の亢進を認めた。ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいては、Ionomycin、CDDPともいずれも単独で腫瘍の増殖を抑制したが、併用群においては相乗的な抗腫瘍効果が認められた。

【考察】Ionomycinは細胞内のfree Ca^{2+}の濃度を上昇させることにより内因性Ca^{2+}／Mg^{2+}に依存したエンドヌクレアーゼを活性化させ、アポトーシスによる細胞死を誘導する。今回in vitroの細胞増殖に関する実験系においてIonomycin、CDDPの相乗的な抗腫瘍効果が確認され、腎細胞癌の抗癌剤抵抗性機構を打破する可能性が示唆された。DNAラダーの検出およびフローサイトメトリーによる解析の結果、この殺細胞効果はアポトーシスによることが示された。以前我々は膀胱癌細胞株において、Ionomycinを投与した際Bcl-2の発現が減弱する一方、Baxの発現が亢進しBcl-2/Baxの比率が減少することによりアポトーシスを誘導することを報告した。今回の腎細胞癌細胞株ではIonomycin投与によりBcl-2の発現レベルに差を認めなかったが、Baxは併用群で有意な発現の亢進を認め、これが相乗的な抗腫瘍効果に関っている可能性が示唆された。最後に、in vivoの実験系においてIonomycin、CDDP併用療法の治療効果を検討した。全身的な副作用を避けるため、Ionomycinは腫瘍内投与としたが、明らかな副作用を認めなかった。併用群にて相乗的な抗腫瘍効果が観察されることから、抗癌剤とアポトーシスを誘導する薬剤の併用はin vitroの実験系の結果と同様、腎細胞癌の抗癌剤抵抗性機構を打破する可能性が示唆された。

【結論】腎細胞癌に対してIonomycinとCDDPは相乗的な抗腫瘍効果を示した。この抗腫瘍効果はアポトーシスを介するものと考えられ、その1つの仮説としてBaxの発現の亢進が挙げられる。Ionomycinは抗癌剤抵抗性である腎細胞癌患者の治療に応用できる可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1812号	氏　名	岡本雅之
論文題目	Synergistic anti-tumor effect of ionomycin and cisplatin against renal cell carcinoma in vitro and in vivo 腎細胞癌に対するイオノマイシンおよびシスプラチンの相乗的抗腫瘍効果		
審査委員	主　査　守殿貞夫 副　査　黒田嘉和 副　査　前田　盛		
審査終了日	平成13年6月25日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【目的】腎細胞癌は現有の抗癌剤に対し抵抗性であるため、転移を有する腎細胞癌の予後は極めて不良である。したがって新しい化学療法が求められており、その一つとしてアポトーシスを誘導する薬剤の応用が考えれらる。これらの薬剤は従来の抗癌剤と異った経路で癌細胞を死にいたらしめるため新しい治療法となる可能性がある。

Ca^{2+}の細胞膜の透過性を高める物質(calcium ionophore)による細胞内Ca^{2+}レベルの持続的上昇はアポトーシスを引き起こすことが知られており、抗癌剤と併用することにより相乗的な抗腫瘍効果が得られることが報告されている。

今回我々は、calcium ionophoreであるイオノマイシン(Ionomycin)を既存の抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)と併用することによりヒト腎細胞癌細胞株(ACHN)に対する抗腫瘍効果が増強されるか否かにつき、初めて検討した。

【方法】まずIonomycinとCDDPのin vitroでのヒト腎細胞癌細胞株(ACHN)に対する細胞増殖抑制効果をMTT法を用いて測定した。この時のDNA断片化の程度を知るため、アガロースゲル電気泳動法を用いDNAラダーの検出を行った。またフローサイトメーター（EPICS ELITE）を用いてこれら薬剤の細胞周期に与える影響を調べた。さらにWestern blotting法を用いて、アポトーシス関連遺伝子であるBcl-2、Bax蛋白の発現が上記薬剤の処理によりどう変化するかを検討した。最後にIonomycinとCDDP併用療法のin vivoでの抗腫瘍効果をヌードマウスの皮下腫瘍モデルを用い検討した。

【結果】低濃度のIonomycin、CDDPの単独投与ではヒト腎細胞癌細胞株の細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、これらの併用により有意に細胞増殖が抑制された。DNAラダーの検出ではIonomycin、CDDPの単独投与ではわずかにしか核の断片化を認めなかったが、併用群でより明瞭な核の断片化が観察された。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、併用群においてsub-G1期細胞分画の増加（これはG1期の細胞がアポトーシスに陥ったためと思われる）が認められた。Western blotting法の結果、Bcl-2の発現レベルはIonomycin、CDDPの単独および併用群で差を認めなかったが、Baxは併用群で有意な発現の亢進を認めた。

ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいては、Ionomycin、CDDPともいずれも単独で腫瘍の増殖を抑制したが、併用群においては相乗的な抗腫瘍効果が認められた。

【考察】Ionomycinは細胞内のfree Ca^{2+}の濃度を上昇させることにより内因性 Ca^{2+}／Mg^{2+}に依存したエンドヌクレアーゼを活性化させ、アポトーシスによる細胞死を誘導する。今回in vitroの細胞増殖に関する実験系においてIonomycin、CDDPの相乗的な抗腫瘍効果が確認された。DNAラダーの検出およびフローサイトメトリーによる解析の結果、この殺細胞効果はアポトーシスによることが示された。以前我々は膀胱癌細胞株において、Ionomycinを投与した際Bcl-2の発現が減弱する一方、Baxの発現が亢進しBcl-2/Baxの比率が減少することによりアポトーシスを誘導することを報告した。今回の腎細胞癌細胞株ではIonomycin投与によりBcl-2の発現レベルに差を認めなかったが、Baxは併用群で有意な発現の亢進を認め、これが相乗的な抗腫瘍効果に関っている可能性が示唆された。最後に、in vivoの実験系においてIonomycin、CDDP併用療法の治療効果を検討したところ、併用群にて相乗的な抗腫瘍効果が観察され、抗癌剤とアポトーシスを誘導する薬剤の併用はin vitroの実験系の結果と同様、腎細胞癌の抗癌剤耐性機構を打破する可能性が示唆された。

本研究は腎細胞癌に対し、calcium ionophoreであるイオノマイシン(Ionomycin)と既存の抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)の併用療法の有用性につき基礎的検討を加えたものであるが、従来ほとんど行われなかったアポトーシス誘導剤と抗癌剤の併用について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると思われる。