



Title	抗がん剤の副作用と耐性化に着目したcyclooxygenase阻害薬の効果の検証
Author(s)	岡本, 敬介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14408号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14408
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84557
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Okamoto.pdf



博士学位論文

抗がん剤の副作用と耐性化に着目した
cyclooxygenase 阻害薬の効果の検証

岡本 敬介

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

2021年3月

目次

略語表.....	4
序論.....	6
第一章 CIN を増強させない NSAIDs の探索	8
第一節 緒言	8
第二節 実験材料及び方法	9
第一項 メタアナリシス	9
第二項 試薬	9
第三項 使用細胞	10
第四項 使用動物	10
第五項 CDDP・NSAIDs 投与方法と各種検体の採取方法.....	10
第六項 血清クレアチニン値測定.....	11
第七項 mRNA 量測定	11
第八項 細胞生存率評価	14
第九項 スーパーオキシド除去能評価	14
第十項 統計解析	14
第三節 実験結果.....	16
第一項 候補論文のスクリーニング	16
第二項 メタアナリシス	17
第三項 公表バイアスの評価.....	17
第四項 サブグループ解析.....	18
第五項 CDDP が NRK-52E 細胞へ及ぼす影響	18
第六項 NSAIDs が CDDP の細胞障害に及ぼす影響.....	20
第七項 NSAIDs が酸化ストレスマーカーに及ぼす影響.....	21
第八項 NSAIDs がオートファジーマーカーに及ぼす影響	24
第九項 セレコキシブとフルルビプロフェンが CIN に及ぼす影響.....	25

第四節 考察	28
第二章 CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs の探索	31
第一節 緒言	31
第二節 実験材料及び方法	32
第一項 試薬	32
第二項 使用細胞	32
第三項 CDDP 耐性株の樹立	32
第四項 細胞生存率評価	32
第五項 mRNA 量測定	32
第六項 シスチン取り込み量測定	33
第七項 xCT 一過性過剰発現	33
第八項 xCT ノックダウン	34
第九項 Sphere Formation Assay	34
第十項 統計解析	35
第三節 実験結果	36
第一項 CDDP 耐性ヒト肺がん細胞株の樹立	36
第二項 CDDP 耐性肺がん細胞の特性	36
第三項 xCT 過剰発現が SBC-3 細胞の CDDP 抵抗性に及ぼす影響	39
第四項 xCT ノックダウンが A549 細胞の CDDP 抵抗性に及ぼす影響	40
第五項 NSAIDs 単剤が肺がん細胞の細胞生存率に及ぼす影響	41
第六項 CDDP の肺がん細胞に対する殺細胞効果に及ぼす NSAIDs の影響	43
第七項 セレコキシブが CDDP の抵抗性に及ぼす影響	44
第八項 NSAIDs 単剤がスフェロイドに及ぼす影響	45
第九項 CDDP のスフェロイドに対する効果に及ぼす NSAIDs の影響	47
第十項 単剤でスフェロイドに作用した NSAIDs が CDDP の効果に及ぼす影響	48
第四節 考察	51
第三章 CDDP-NSAIDs の治療効果・副作用の同時評価	55

第一節 緒言	55
第二節 実験材料及び方法	56
第一項 試薬	56
第二項 使用細胞	56
第三項 使用動物	56
第四項 Xenograft モデル	56
第五項 CDDP・NSAIDs 投与方法と各検体の採取方法	56
第六項 mRNA 量測定	57
第七項 統計解析	57
第三節 実験結果	58
第一項 セレコキシブ・ジクロフェナクが CDDP の抗腫瘍効果に及ぼす影響	58
第二項 腫瘍における xCT 発現の評価	60
第三項 セレコキシブ・ジクロフェナクが CIN に及ぼす影響	60
第四節 考察	62
総括	64
参考文献	66
謝辞	73

略語表

4F2hc	4F2 cell-surface antigen heavy chain
95%CI	95% confidence interval
ATG	Autophagy related gene
B2M	Beta-2 microglobulin
BCRP	Breast cancer resistance protein
CD	Cluster of differentiation
CD44v9	Cluster of differentiation 44 variant 9
CDDP	Cisplatin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Chi ²	Cochran Q test
CIN	Cisplatin-induced nephrotoxicity
COX	Cyclooxygenase
CrCl	Creatinine clearance
CSCs	Cancer stem cells
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTR	Copper transporter
df	degrees of freedom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT	Glucose transporter
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HO-1	Heme oxygenase 1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IC ₅₀	Concentration of 50% inhibition for cell viability
KIM-1	Kidney injury marker 1
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MDR	Multidrug resistance protein

Mg	Magnesium
M-H	Mantel-Haenszel
MPEC	2-methyl-6-p-methoxyphenylethynyl-imidazopyrazinone
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NRF2	NF-E2-related factor 2
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OAT	Organic anion transporter
OCT	Organic cation transporter
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
OCTN	Carnitine/organic cation transporter
OR	Odds ratio
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEPT	Peptide transporter
QOL	Quality of life
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
SCr	Serum creatinine
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein
SGLT	Sodium glucose cotransporter
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SOD	Superoxide dismutase
SOX2	Sex determining region Y-box 2
SPF	Specific pathogen free
TAE	Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid
TBP	TATA-binding protein
URAT	Urate transporter
WHO	World Health Organization
xCT	Cystine/glutamate transporter

序論

本邦において、がんは 2.6 人に 1 人が罹患し、3.7 人に 1 人ががんにより死亡することが報告されている^{1,2)}。その中でも、肺がんはがん死亡率の 1/4 以上を占めており、部位別死亡率の 1 位となっている。がんの治療方法には手術療法、放射線療法、抗がん剤を用いた薬物療法があり、特に薬物療法は手術療法や放射線療法と組み合わせる場合があることから、がん治療において重要な役割を担っている。薬物療法に用いられる抗がん剤の種類として、細胞障害性抗がん薬、分子標的薬、ホルモン療法薬などがあり、がん腫や治療目的に応じて適切な薬剤の選択が求められる。一方で、薬物療法により臓器障害、骨髄抑制、神経毒性など、種々の副作用が生じる事があり、患者の **quality of life (QOL)** を低下させることから、副作用を予防・軽減しつつ、最適な薬物療法を実施することが重要となる。

抗がん剤である **cisplatin (cis-dichloro-diammine platinum; CDDP)** は細胞障害性抗がん薬に分類される白金製剤であり、肺がん、胃がん、頭頸部がんなど、様々ながん腫に対して使用されるキードラッグである³⁾。CDDP は DNA への結合と DNA 鎖内、及び鎖間架橋の形成により、DNA 合成を阻害することで抗腫瘍効果を示す^{4,5)}。また、活性酸素種 (**reactive oxygen species; ROS**) の産生が抗腫瘍効果の機序に関与することも報告されている⁶⁾。現在、多くの分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が開発され、薬物療法のレジメンも複雑化しているにも関わらず、本邦で 1984 年に販売が開始された CDDP が未だファーストラインとして使用されることが多いことから、CDDP は薬物療法において重要な抗がん剤である⁷⁾。一方で、CDDP による重大な副作用の 1 つとして CDDP 起因性腎障害 (**CDDP-induced nephrotoxicity; CIN**) があり、約 30% の頻度で出現する⁸⁾。CIN は投与量依存的・蓄積的に出現し^{4,8)}、酸化ストレス、ミトコンドリア障害、DNA 損傷、タンパク質合成阻害などの関与が報告されている⁹⁻¹¹⁾。CIN は用量制限毒性であり⁴⁾、薬物療法の減量・中断の原因となることから CIN の予防は重要であり、臨床ではハイドレーション法による予防が行われている¹²⁾。また、当研究室はこれまでに、マグネシウム (**Mg**) の前投与が CIN を予防することを後ろ向き観察研究で見出し¹³⁾、その機序として、CDDP を基質とするトランスポーターである **organic cation transporter 2 (OCT2)**、**copper transporter 1 (CTR1)**、**multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1)** の発現変動とそれに伴う腎臓内プラチナ蓄積量の減少であることを基礎研究で明らかとしている^{14,15)}。

がんの浸潤や転移に伴い痛みが生じるがん疼痛は、がん患者の 30-70% で出現することが報告されている¹⁶⁾。痛みの性質として体性痛、内臓痛、神経障害性疼痛に分類され、痛みのパターンとして持続痛、突出痛に分けられる。がん疼痛により、がん患者の **QOL** が著しく低下することから、痛みの除去が必須となる。临床上、がん疼痛には世界保健機関 (**World Health Organization; WHO**) 方式三段階除痛ラダーなどの概略的な指針に従い、患者ごとに痛みの程度に応じた治療薬の選択が行われる。非ステロイド性抗炎症薬の総称

である non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) は cyclooxygenase (COX) 阻害作用を示す抗炎症薬である¹⁷⁾。COX には 2 種のアイソフォームがあり、COX-1 は生体内で恒常的に発現しており、COX-2 は炎症時に発現が誘導される¹⁸⁾。NSAIDs は COX を非選択的、または COX-2 を選択的に阻害するが¹⁹⁾、COX-1 の強い阻害により、胃腸障害が生じる。ガイドラインにおいて、軽度のがん疼痛に対し NSAIDs の投与が推奨されていることから²⁰⁾、抗がん剤と NSAIDs はがん薬物療法において併用される組み合わせである。

これまでに、一部の NSAIDs は COX 依存・非依存的にがん細胞の生存率を低下させること^{21, 22)}、がん幹細胞 (cancer stem cells; CSCs) に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されており²³⁾、臨床研究においても NSAIDs の抗腫瘍効果の検証が行われていることから²⁴⁾、CDDP と NSAIDs の組み合わせにより、CDDP の抗腫瘍効果を高めることが期待できる。しかしながら、当研究室が行った Mg が CIN に及ぼす影響を評価した後ろ向き観察研究のセカンダリーエンドポイントにおいて、NSAIDs の併用が CIN のリスク因子となることを明らかとしている¹³⁾。したがって、CDDP の抗腫瘍効果の増強を期待した NSAIDs の併用投与には CIN が問題となる。一方で、本結果はセカンダリーエンドポイントでの評価であり、併用された NSAIDs の種類が不明であることから、NSAIDs の中でも CDDP 投与患者に安全に投与できるものが存在する可能性があり、NSAIDs と CIN との関連についてさらなる検討が必要である。

本研究では、CDDP を用いたがん薬物療法の最適化を目的とし、CIN を増強させない NSAIDs 及び CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs を探索し、効果を検証することとした。

第一章 CIN を増強させない NSAIDs の探索

第一節 緒言

当研究室はこれまでに、NSAIDs の併用が CIN のリスク因子となることを後ろ向き観察研究で明らかとしている¹³⁾。また、いくつかの臨床研究でも同様の報告がなされている^{25, 26)}。CIN 発現により、腎排泄を主とする医薬品の血中濃度が上昇することで、副作用が生じやすくなることが予測される。さらに、CDDP が投与された患者において、NSAIDs の使用に制限がかかることで、がん疼痛に対して使用できる医薬品の選択肢が減少し、痛みのコントロールが不良となる可能性が考えられる。したがって、CIN と NSAIDs との関連性について検証することは临床上重要な問題である。

しかしながら、当研究室の結果を含め、CIN と NSAIDs との関連を報告している論文は、全てが後ろ向き観察研究かつセカンダリーエンドポイントでの評価であり、プライマリーエンドポイントで評価された報告はない。セカンダリーエンドポイントでの検討では、研究デザインが最適化されておらず、症例群と対照群との間に患者背景のばらつきや患者数の偏りが存在する場合があります、エビデンスレベルとしては低いのが現状である。したがって、NSAIDs と CIN との関連についてさらなる検討が必要であると考えられる。

複数の異なる臨床研究の結果を統計的に統合する手法としてメタアナリシスがある。メタアナリシスを行うことで、母集団のサンプルサイズが増加することにより統計学的検出力が高まること、及び複数の研究で得られた効果が一致しない場合に不確実性を解決することができるため、メタアナリシスのエビデンスレベルは高く設定されている。このことから、既に報告されている NSAIDs と CIN との関連を示した複数の論文を用い、メタアナリシスを実施することで、真に NSAIDs の併用が CIN にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることができるのではないかと考えた。

本章では、メタアナリシスにより NSAIDs が CIN のリスク因子となるかを評価するとともに、基礎研究で詳細な解析を行うこととした。

第二節 実験材料及び方法

第一項 メタアナリシス

1) 1次スクリーニング

文献データベースとして PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Google Scholar (<https://scholar.google.co.jp/>)、Web of Science (<http://www.webofknowledge.com/wos>) を使用し、それぞれ“Cisplatin nephrotoxicity risk”、“Cisplatin nephrotoxicity NSAIDs retrospective univariate”、“Cisplatin nephrotoxicity risk” の検索ワードを用いた。2018年12月20日を最終検索日とし、NSAIDs と CIN との関連を報告している臨床研究、及び言語が英語の論文を抽出した。

2) 2次スクリーニング

選択基準を (1) フルテキストの論文、(2) NSAIDs を服用している患者数の記載がある、(3) CIN 群・非 CIN 群に 1 人以上 NSAIDs 服用患者がいる、除外基準を (1) NSAIDs 以外の抗炎症薬が組み合わされている、(2) データベースを用いた探索研究の報告、として論文を精査した。

3) データの抽出

2次スクリーニング後の論文から筆頭著者の名前、出版年、国名、研究デザイン、プライマリーエンドポイントとセカンダリーエンドポイント、CDDP 投与量、薬物療法施行コース数、CIN の定義、CIN 発症率、NSAIDs 服用率のデータを抽出した。

4) Forest plot

メタアナリシスはガイドラインである MOOSE に準拠して行った²⁷⁾。統計解析には Review Manager 5.3 (The Cochrane Collaboration, Copenhagen, Denmark) と R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。エンドポイントは NSAIDs 服用・非服用における CIN 発症率と設定し、データはオッズ比 (odds ratio; OR) と 95%信頼区間 (95% confidence interval; 95%CI) で表した。Forest plot は fixed-effects model と Mantel-Haenszel 法 (M-H) で作製し、Z 値が $P < 0.05$ で有意差ありとした。論文間の異質性は Cochran Q test (Chi^2) と I^2 値を用い、 Chi^2 は $P < 0.1$ 、 I^2 値は $> 50\%$ で高い異質性を含むとした。公表バイアスの評価は視覚的に線形性を評価する funnel plot、線形回帰による Egger's test²⁸⁾、順位相関による Begg's test を行い²⁹⁾、funnel plot が非線形、Egger's test と Begg's test は $P < 0.1$ で公表バイアスを含むとした。サブグループ解析は少なくとも各サブグループに 3 報以上の報告が含まれるときに行い、fixed-effects model と random-effects model で評価した。

第二項 試薬

CDDP、ジクロフェナクナトリウム、フルフェナム酸、メフェナム酸、ピロキシカムは富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。アスピリン、フルルビブ

ロフェン、イブプロフェン、インドメタシンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。セレコキシブ、エトドラク、ケトロラクトロメタミン、ロルノキシカム、メロキシカム、オキサプロジン、ロフェコキシブは東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。ナプロキセンは Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。ザルトプロフェンは Combi-Blocks (San Diego, CA, USA) から購入した。その他の試薬は特に断らない限り特級もしくはは生化学用、分子生物学用のものを用いた。

第三項 使用細胞

ラット正常腎上皮細胞株である NRK-52E 細胞 (JCRB 細胞バンク、Osaka, Japan) を用いた。10% fetal bovine serum (FBS; Cytiva, Tokyo, Japan) と 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を培養液として用い、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で培養した。

第四項 使用動物

Wistar 雄性ラットを 6 週齢で日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より購入し、7 週齢の時点で実験に用いた。全てのラットの飼育は気温 23 ± 2°C、湿度 60 ± 10% で管理された北海道大学薬学部動物舎で行われ、新鮮水道水及び Rodent LabDiet EQ 5L37 (PMI Nutrition International, St. Louis, MO, USA) を自由飲水・摂食させた。本研究における全ての動物実験は「国立大学法人北海道大学 動物実験に関する規定」に則り実施した。

第五項 CDDP・NSAIDs 投与方法と各種検体の採取方法

生理食塩水に溶解した CDDP (5 mg/kg, 2 mg/mL) あるいは生理食塩水を day 1 に腹腔内投与し、メチルセルロース (富士フィルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) で懸濁したセレコキシブ (30 mg/kg/day, 30 mg/mL)、フルルビプロフェン (10 mg/kg/day, 10 mg/mL) あるいはメチルセルロースを day 1-4 に経口投与を行った。本検討では (1) コントロール群: 生理食塩水 + メチルセルロース、(2) CDDP 群: CDDP + メチルセルロース、(3) CDDP + セレコキシブ群: CDDP + セレコキシブ、(4) CDDP + フルルビプロフェン群: CDDP + フルルビプロフェンの 4 群に分けて評価した。

体重測定は day 1 と day 5 に行い、腎臓サンプルは day 5 に摘出した後に生理食塩水で洗浄した。また、血液サンプルは尾静脈より採血し、微量のヘパリンナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) と混和し、遠心分離 (1,200 × g, 20 分、4°C) 後に上清を回収した。各種サンプルは測定に用いるまで -80°C で保管した。なお、血清クレアチニン (SCr) 値を経時的に測定した予備検討において、day 5 で CDDP による腎障害が強く認められたことから day 5 での腎臓摘出とした。

第六項 血清クレアチニン値測定

SCr 値の測定にはラボアッセイ クレアチニン (富士フィルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) を用いた。50 μ L の血液サンプルに 300 μ L の除タンパク試薬を加え、室温で 10 分間静置した後に遠心分離 (1,400 \times g, 10 分、25°C) を行った。上清 100 μ L に 50 μ L のピクリン酸試薬と 50 μ L の 0.75 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、30°C で 20 分間静置し、520 nm における吸光度を測定した。検量線用試料にはクレアチニン標準液を用いた。

第七項 mRNA 量測定

1) Total RNA の抽出

Total RNA の抽出には ISOGEN II (ニッポンジーン、Tokyo, Japan) を用いた。細胞サンプルは 6 well プレート (Corning, Corning, NY, USA) に 3.0×10^5 cells/well で播種し、72 時間後に培養液を除去し、800 μ L の ISOGEN II を添加して回収した。腎臓サンプルはスライサー (夏目製作所、Tokyo, Japan) を用いて皮質のみを剥離し、800 μ L の ISOGEN II 内でホモジネートした。ISOGEN II 溶液に nuclease-free water を 320 μ L 加えて激しく混和し、室温で 15 分間静置した後に遠心分離 (16,000 \times g, 15 分、4°C) を行った。上清 700 μ L に 700 μ L のイソプロパノールを加えて転倒混和し、室温で 10 分間静置した後に遠心分離 (12,000 \times g, 10 分、4°C) を行った。上清除去後、500 μ L の 75% エタノールを加えて遠心分離 (8,000 \times g, 3 分、4°C) を行う工程を 2 回行った。上清除去後、nuclease-free water で RNA を溶解し、NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて RNA 濃度を測定した。

2) DNase 処理

DNase 処理は腎臓サンプルから抽出した total RNA に RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて行った。Table 1 に示す反応液を調製し、室温で 15 分間静置した後に EDTA (25 mM, pH 8.0) を 3 μ L 加え、65°C で 10 分間インキュベートした。その後、NanoDrop 2000c を用いて RNA 濃度を測定した。

Table 1. Composition of reaction solution for DNase.

Component	Volume
Buffer RDD	3 μ L
RNase free DNase I	3 μ L
RNA (6 μ g)	Variable
Nuclease-free water	Variable
Total volume	30 μ L

3) 逆転写反応

逆転写反応は ReverTra Ace (東洋紡、Osaka, Japan) を用いて行った。Table 2 に示す反応液を調製し、30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、99°C で 5 分間インキュベートした。

Table 2. Composition of reaction solution for reverse transcription.

Component	Volume
5 × RT buffer	6 μL
dNTPs Mixture (10 mM each)	3 μL
Random primer (80 pmol/μL)	1.5 μL
ReverTra Ace	1.5 μL
RNA (3 μg)	Variable
Nuclease-free water	Variable
Total volume	30 μL

4) RT-PCR

RT-PCRはKAPATaq EXtra kit (日本ジェネティクス、Tokyo, Japan) を用いて行った。Table 3 に示す反応液を調製し、Chart 1 に示す条件で反応を行った。反応には T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用した。Table 4 に使用した primer の塩基配列を示す。PCR 産物と Gel Loading Dye, Purple (6 ×; BioLabs, Tokyo, Japan) を混合し、TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM 酢酸、1 mM EDTA) 中で 1.2% アガロースゲル (ニッポンジーン、Tokyo, Japan) にアプライし、MARINE23ST (富士フィルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) を用いて電気泳動を行った。泳動後、ゲルを臭化エチジウム溶液 (ナカライテスク、Kyoto, Japan) で染色し、LAS-1000 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いてバンドを観察した。また、バンドの定量化には ImageJ analysis software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いた。

Table 3. Composition of reaction solution for RT-PCR.

Component	Volume
cDNA (1 μg/10 μL)	0.5 μL
Nuclease-free water	6.05 μL
5 × KAPATaq EXtra Buffer	2 μL
25 mM MgCl ₂ solution	0.6 μL
Primer mixture (5 μM each)	0.6 μL
KAPA dNTP Mix (10 mM each)	0.2 μL
KAPATaq EXtra DNA Polymerase (5 U/μL)	0.05 μL
Total volume	10 μL

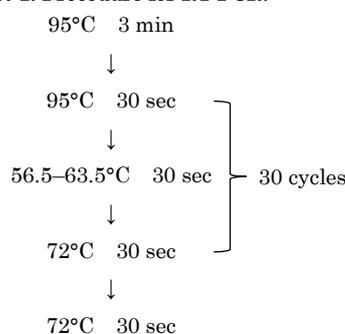
Chart 1. Procedure for RT-PCR.

Table 4. Primer sequences for RT-PCR.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
rMate1	5'-gtttcatcaacaccgagca-3'	5'-acccatcacccaagatgta-3'
rMdr1a	5'-gcaggttggtggacagatt-3'	5'-ggagcgaattccatggata-3'
rMrp2	5'-tgateggttcgtgaagagct-3'	5'-acgcacattccaacacaaa-3'
rMrp4	5'-ggacactgaactagcagaatc-3'	5'-tgtattaactcgtcagttctcg-3'
rSgl2	5'-cgggtactcaggtctcttcg-3'	5'-gacaatggtaagccccagaa-3'
rPept2	5'-ccgttgagttgggaatate-3'	5'-tagtagccatgacggagaag-3'
rOctn1	5'-tgatgtctgtgatgtgtgg-3'	5'-atatactccgaggcagggttc-3'
rOctn2	5'-aacaatggcaaatccaaagc-3'	5'-catccgtgagcatgtgagac-3'
rUrat1	5'-tcccactgtgatcaggatga-3'	5'-aatgcagctaggccgcttaac-3'
rBcrp	5'-gtttggactcaagcacagca-3'	5'-tgagttccagaagccagt-3'
rGlut1	5'-ccaccacactcaccacactc-3'	5'-cacaaggccaacaggttc-3'
rGlut2	5'-ctgtgctgcttggagaaa-3'	5'-tggccaatctcaagaaaac-3'
rGlut9	5'-tgagcttctggaaaggaga-3'	5'-atggttgaaggcttctctg-3'
rOat1	5'-gtggttctccctactgct-3'	5'-attcgggttgccttctgtg-3'
rOat3	5'-caacagcaccagagacacca-3'	5'-gactgaaggcagcaccagag-3'
rOct1	5'-tggccgtaagctctgtctc-3'	5'-tcaaggtatagccggacacc-3'
rOct2	5'-gcaagcagaccgtccgctaag-3'	5'-cagaccgtgcaagctacagctc-3'
rCtr1	5'-ggagaaatggctggagctttt-3'	5'-cgggctatcttgagctctca-3'
rKim-1	5'-acctctactccaacaccagaac-3'	5'-ggcttctcaagggtattctac-3'
rActin	5'-ctatcgcaatgagcgggttc-3'	5'-gaggtcttacggatgtcaacg-3'

5) real-time PCR

real-time PCR は KAPA SYBR Fast qPCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて行った。Table 5 に示す反応液を調製し、Chart 2 に示す条件で反応を行った。反応には Mx3000p (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用した。Table 6 に使用した primer の塩基配列を示す。

Table 5. Composition of reaction solution for real-time PCR.

Component	Volume
cDNA (1 µg/10 µL)	1 µL
Nuclease-free water	2.8 µL
qPCR MasterMix	5 µL
Primer mixture (4 µM each)	1 µL
ROX Low	0.2 µL
Total volume	10 µL

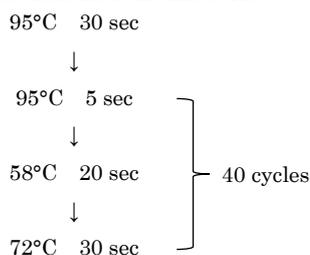
Chart 2. Procedure for real-time PCR.

Table 6. Primer sequences for real-time PCR.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
rClusterin	5'-gagaggctgaccagcagtagca-3'	5'-tgaggtagccagctgggaca-3'
rHo-1	5'-ctttcagaagggtcaggtgc-3'	5'-tgcttggttcgctctatctcc-3'
rSod1	5'-tgcaggacctcattttaatcct-3'	5'-tccagcattccagctctttgta-3'
rNrf2	5'-tcagcgacagaaggattatgag-3'	5'-ggcatcttggttgggaatgtg-3'
rAtg5	5'-catgtgtgaaggaagctgacg-3'	5'-aaggccgttcagttgtggtc-3'
rAtg7	5'-aatggcgttagcccagattg-3'	5'-agcctttggggccatacacc-3'
rLc 3	5'-agcgatacaagggtgagaagc-3'	5'-ggcttggttagcattgagctg-3'
rBeclin 1	5'-gttgcgctgtactgttctgg-3'	5'-actgcctccagtgctctcaate-3'
rActin	5'-ctatcgcaatgagcgggttc-3'	5'-gaggtcttacggatgtaaacg-3'

第八項 細胞生存率評価

細胞生存率は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用いた MTT assay により評価した。細胞を 96 well プレート (Corning, Corning, NY, USA) に 5,000 cells/well で播種し、24 時間培養した。その後、CDDP 及び NSAIDs を添加し、48 時間培養した。なお、添加後の培養液中の最終 dimethyl sulfoxide (DMSO) 濃度は 0.1%とした。培養後、phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で MTT (同仁化学研究所、Kumamoto, Japan) を 0.5%の濃度になるよう溶解し、各 well に 1/10 倍量添加し、37°C で 4 時間インキュベートした。反応後に培養液を吸引除去し、DMSO を各 well に 75 μ L 添加して細胞を溶解し、主波長 540 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。50%細胞増殖阻止濃度 (concentration of 50% inhibition for cell viability; IC₅₀) は SigmaPlot 14 (HULINKS Inc., Tokyo, Japan) を用いて算出した。

第九項 スーパーオキシド除去能評価

スーパーオキシド除去能は 2-methyl-6-p-methoxyphenylethynyl-imidazopyrazinone (MPEC; ATTO, Tokyo, Japan) を用いて評価した。Table 7 に示す反応液を調製し、384 well ホワイトプレート (Corning, Corning, NY, USA) で発光強度を測定した。

Table 7. Composition of reaction solution for superoxide scavenging assay.

Component	Volume
Sample (solved in DMSO)	1.67 μ L
KH ₂ PO ₄ buffer	28.33 μ L
Xanthine oxidase solution (0.1 units/mL)	10 μ L
Hypoxanthine solution (720 μ M)	8.33 μ L
MPEC (300 μ M)	1.67 μ L
Total volume	50 μ L

第十項 統計解析

統計解析は unpaired Student's t-test、Tukey's post-hoc test、Dunnnett's test、Pearson's correlation coefficient のうち適したものを用い、P < 0.05 を有意とした。統計

解析は SigmaPlot 14 を用いて行った。

第三節 実験結果

第一項 候補論文のスクリーニング

1次スクリーニングの結果、PubMed から 212 報、Google Scholar から 429 報、Web of Science から 294 報の論文が抽出され、2次スクリーニングにより最終的に 7 報の論文が候補として抽出された^{13, 25, 26, 30-33} (Figure 1)。Table 8 に候補論文のデータをまとめた。全ての論文が後ろ向き観察研究であり、NSAIDs の併用と CIN との関連はセカンダリーエンドポイントで評価していた。

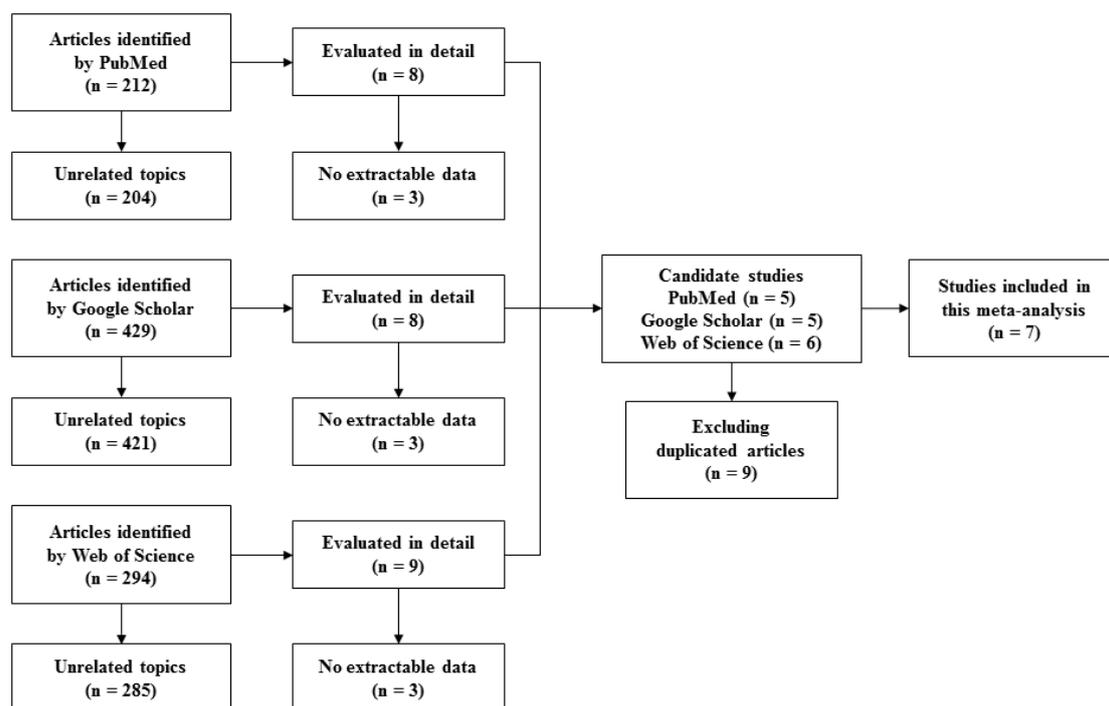


Figure 1. Flow diagram of the study selection.

Table 8. Characteristics of eligible studies.

Study (Year)	Primary endpoint	CDDP dose (mg/m ²)	Evaluation period	CIN definition
Almanric K <i>et al.</i> (2017)	Search for risk factor of CIN	No notation	1 course	Grade 2 or 3 of SCr elevation in CTCAE version 4.03
Kidera Y <i>et al.</i> (2014)	The effect of Mg on CIN	60–105	1 course	Grade 2 or more of SCr elevation in CTCAE version 4.0
Mohri J <i>et al.</i> (2018)	Search for risk factor of CIN	40.5–75.2	3 courses	60 ml/min or less of CrCl in courses
Saito Y <i>et al.</i> (2017)	The effect of Mg on CIN	75	All courses	Grade 2 or more of SCr elevation in CTCAE version 4.0
Sato K <i>et al.</i> (2016)	Search for risk factor of CIN	40–80	1–6 courses	A decrease in eGFR > 25%, an increase in SCr level of > 0.3 mg/dl or ≥ 1.5 times
Yamaguchi T <i>et al.</i> (2017)	The effect of short hydration and Mg on CIN	52.7–83.1	1 course	Grade 1 or more of SCr elevation in CTCAE version 4.0
Yoshida T <i>et al.</i> (2014)	The effect of Mg on CIN	60–80	All courses	Grade 2 or more of SCr elevation in CTCAE version 4.0

Mg: Magnesium; SCr: serum creatinine; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; eGFR: estimated glomerular filtration rate; CrCl: creatinine clearance.

第二項 メタアナリシス

抽出された論文を用いて Forrest plot を作製した (Figure 2)。OR が 1.88、95%CI が 1.44–2.45、Z 値が $P < 0.05$ であったことから、本検討のメタアナリシスにより、NSAIDs の併用は CIN のリスク因子となることが明らかとなった。また、CIN 発症率は 29.5%、NSAIDs 服用率は 25.1%であった。Chi² は $P = 0.1$ 、I² 値は 44%であり、高い異質性は認められなかった。

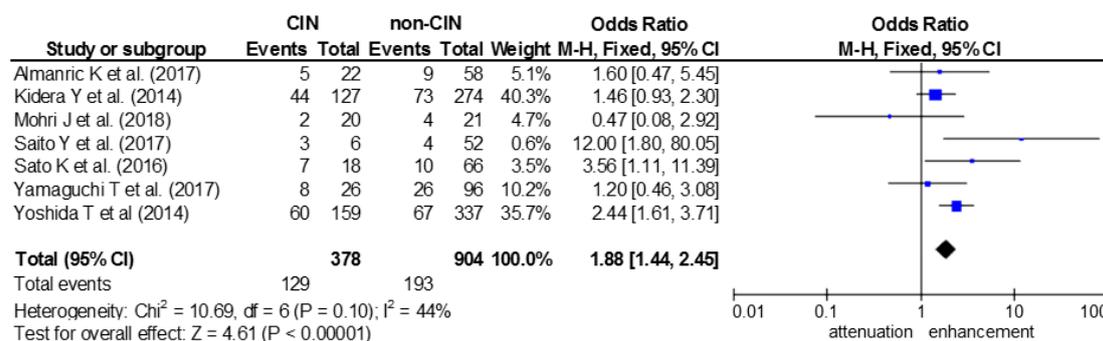


Figure 2. Forest plot of the meta-analysis.

Events group included patients that received NSAIDs with CDDP. Chi² and I² indicate heterogeneity. df: degrees of freedom; Z: statistically significant.

第三項 公表バイアスの評価

抽出された論文を用いて funnel plot を作製し、各論文は線形に分布していることを確認した (Figure 3)。また、Egger’s test は $P = 0.9338$ 、Begg’s test は $P = 0.8806$ であった。これらの結果より、今回の候補論文間で公表バイアスが含まれている可能性は低いことが示された。

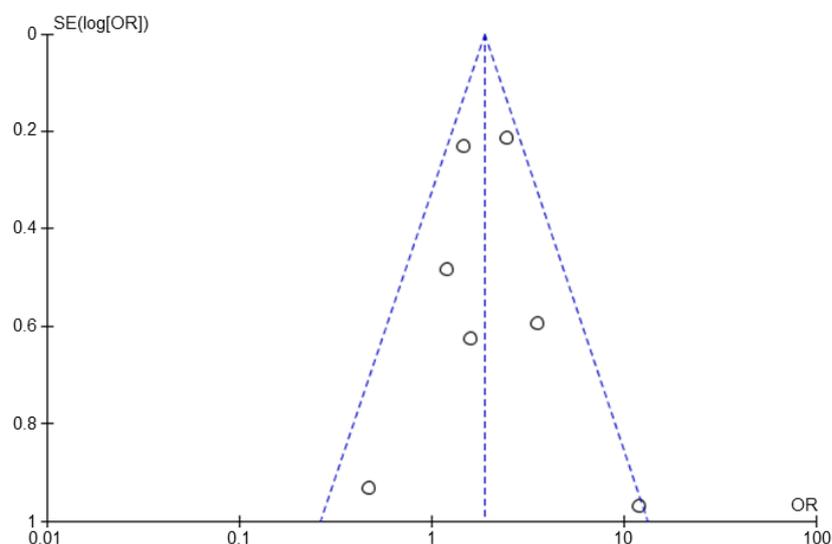


Figure 3. Funnel plot of the eligible studies.

第四項 サブグループ解析

サブグループ解析は薬物療法施行コース数に関して分類することができ、1 コースのみでの評価の研究デザインである“first course evaluation”グループと、全コースでの評価の研究デザインである“total course evaluation”グループをそれぞれ fixed-effects model で評価した。その結果、“first course evaluation”グループでは有意ではないものの NSAIDs の併用により CIN を増強させる傾向を示し、“total course evaluation”グループでは NSAIDs の併用が CIN のリスク因子となることが明らかとなった (Table 9)。一方で、“total course evaluation”グループにおいて I^2 値が 68% と高く、異質性が認められたことから random-effects model でも評価を行ったところ、fixed-effects model での評価と同様の結果が得られた。

Table 9. The subgroup analysis.

Subgroup	Number of studies	Fixed-effects model			Random-effects model		
		OR	95%CI	I^2	OR	95%CI	I^2
First course evaluation	3	1.42	0.97–2.10	0%	1.42	0.97–2.10	0%
Total course evaluation	4	2.44	1.06–5.63	68%	2.64	1.13–6.13	52%

第五項 CDDP が NRK-52E 細胞へ及ぼす影響

メタアナリシスの結果、NSAIDs の併用が CIN のリスク因子となることが明らかとなった一方で、どの NSAIDs が CIN に影響を及ぼしているかが不明なままであるため、基礎研究により詳細に評価することとした。検討に先立ち、NRK-52E 細胞が CDDP による

細胞障害を評価するモデル細胞として適しているかを検証した。腎臓の近位尿細管の Apical 側に発現するトランスポーターである Mate1、Multidrug resistance protein (Mdr) 1a、Multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2、Mrp4、Sodium glucose cotransporter (Sgt) 2、Peptide transporter (Pept) 2、Carnitine/organic cation transporter (Octn) 1、Octn2、Urate transporter (Urat) 1、Breast cancer resistance protein (Bcrp)、Basolateral 側に発現するトランスポーターである Glucose transporter (Glut) 1、Glut2、Glut9、Organic anion transporter (Oat) 1、Oat3、Oct1、Oct2、Ctr1 に関し、ラット腎臓近位尿細管と NRK-52E 細胞間で mRNA 発現を比較した。その結果、ほとんどの腎トランスポーターは NRK-52E 細胞でも発現しており、特に CDDP を輸送する Mate1、Oct2、Ctr1 の発現が認められた³⁴⁾ (Figure 4A)。また、CDDP 添加により、濃度依存的に細胞生存率が低下し、IC₅₀ 値が $7.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ と算出された (Figure 4B)。さらに、腎障害マーカーの 1 種である Clusterin を評価したところ、CDDP 10 μM 処理により mRNA 量が有意に増加していた (Figure 4C)。以上の結果より、NRK-52E 細胞は CDDP による細胞障害を評価するモデル細胞として適していることが示唆された。

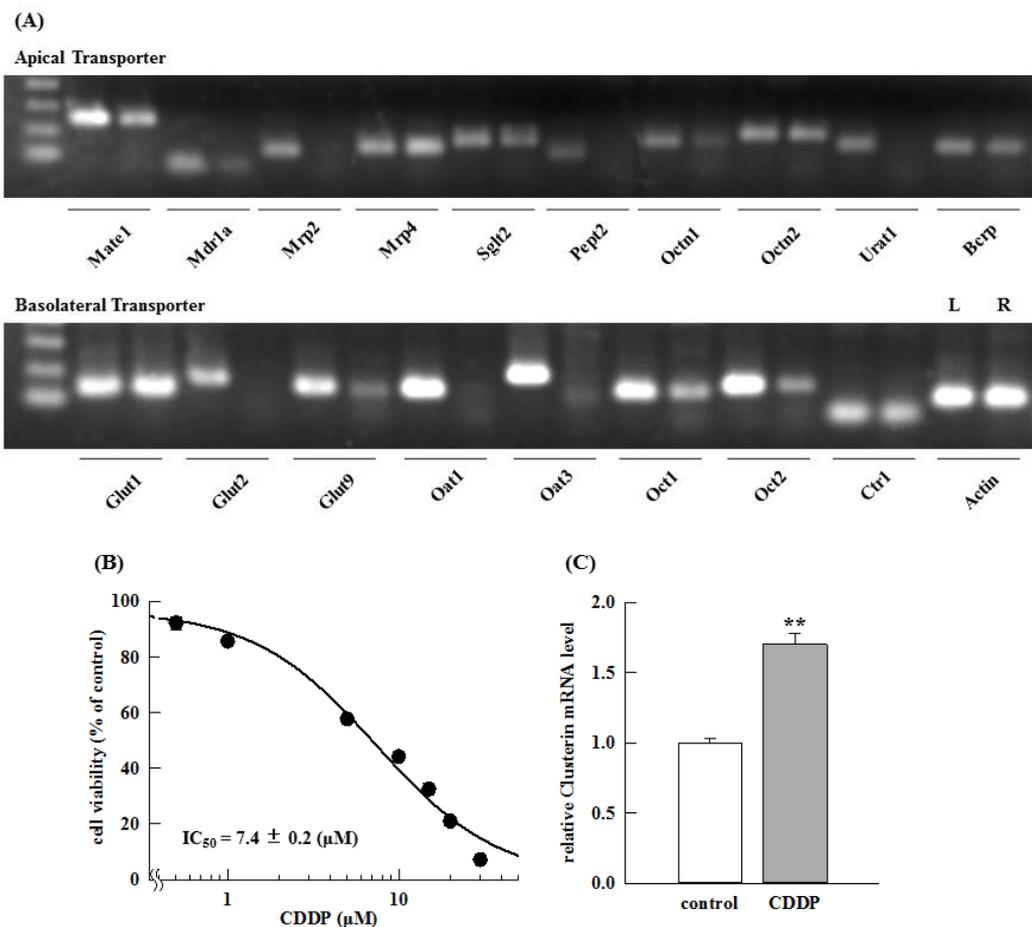


Figure 4. Transporter expression on NRK-52E cells and the characteristics of NRK-52E cells treated with CDDP. (A) Upper picture is the apical side and lower picture is the basolateral side of renal transporters by RT-PCR. L means left sample used rat kidney cortex's cDNA and R means right sample used NRK-52E cells' cDNA. (B) Cells

were incubated with CDDP (0–30 μ M). (C) Clusterin mRNA was normalized to Actin. Cells in the CDDP group were incubated with CDDP (10 μ M) for 48 h. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. **P < 0.01 compared with the control group; unpaired Student's t-test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第六項 NSAIDs が CDDP の細胞障害に及ぼす影響

NRK-52E 細胞に、17 種類の NSAIDs (アスピリン、セレコキシブ、ジクロフェナク、エトドラク、フルフェナム酸、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトドラク、ロルノキシカム、メフェナム酸、メロキシカム、ナプロキセン、オキサプロジン、ピロキシカム、ロフェコキシブ、ザルトプロフェン) を添加した際の細胞生存率を評価した。なお、検討に用いた NSAIDs の選択基準は (1) 経口投与の剤形が承認されている、(2) プロドラッグではない、(3) 入手が容易である、とした。Table 10 に細胞生存率の結果を示した。次に、Table 10 に記載した、細胞生存率が 95–120% となる NSAIDs の濃度で CDDP と同時添加し、CDDP と NSAIDs 同時添加時の IC₅₀ 値と CDDP 単独添加時の IC₅₀ 値の比を算出したところ、CDDP の細胞障害に対し、フルルビプロフェンは増強、ジクロフェナクを含むいくつかの NSAIDs は増強させず、一方でセレコキシブは軽減させることが明らかとなった (Figure 5A)。また、CDDP とセレコキシブまたはフルルビプロフェン同時添加時の Clusterin の mRNA 量を評価したところ、CDDP により発現が上昇した Clusterin はセレコキシブ同時添加により減少し、フルルビプロフェン同時添加により増大することが明らかとなった (Figure 5B and 5C)。

Table 10. MTT assay of NSAIDs alone and setting of concentration for co-addition of CDDP.

NSAIDs	IC ₅₀ (μ M)	Concentration of co-addition (μ M)
Aspirin	> 200	200
Celecoxib	63.4 \pm 1.5	50
Diclofenac	> 200	200
Etodolac	> 200	200
Flufenamic acid	> 200	200
Flurbiprofen	> 200	200
Ibuprofen	> 200	200
Indomethacin	> 200	25
Ketorolac	> 200	200
Lornoxicam	> 10	10
Mefenamic acid	> 200	200
Meloxicam	> 80	80
Naproxen	> 10	10
Oxaprozin	> 200	200
Piroxicam	> 200	200
Rofecoxib	> 25	25
Zaltoprofen	> 200	200

Cells were incubated with each NSAID. MTT assay was evaluated until each saturation concentration was established. Concentration of the NSAID co-added with CDDP was defined as no effect on NRK-52E cells within the range of 95–120% cell viability when treated with NSAIDs alone. Data are presented as means \pm S.E. from three independent experiments.

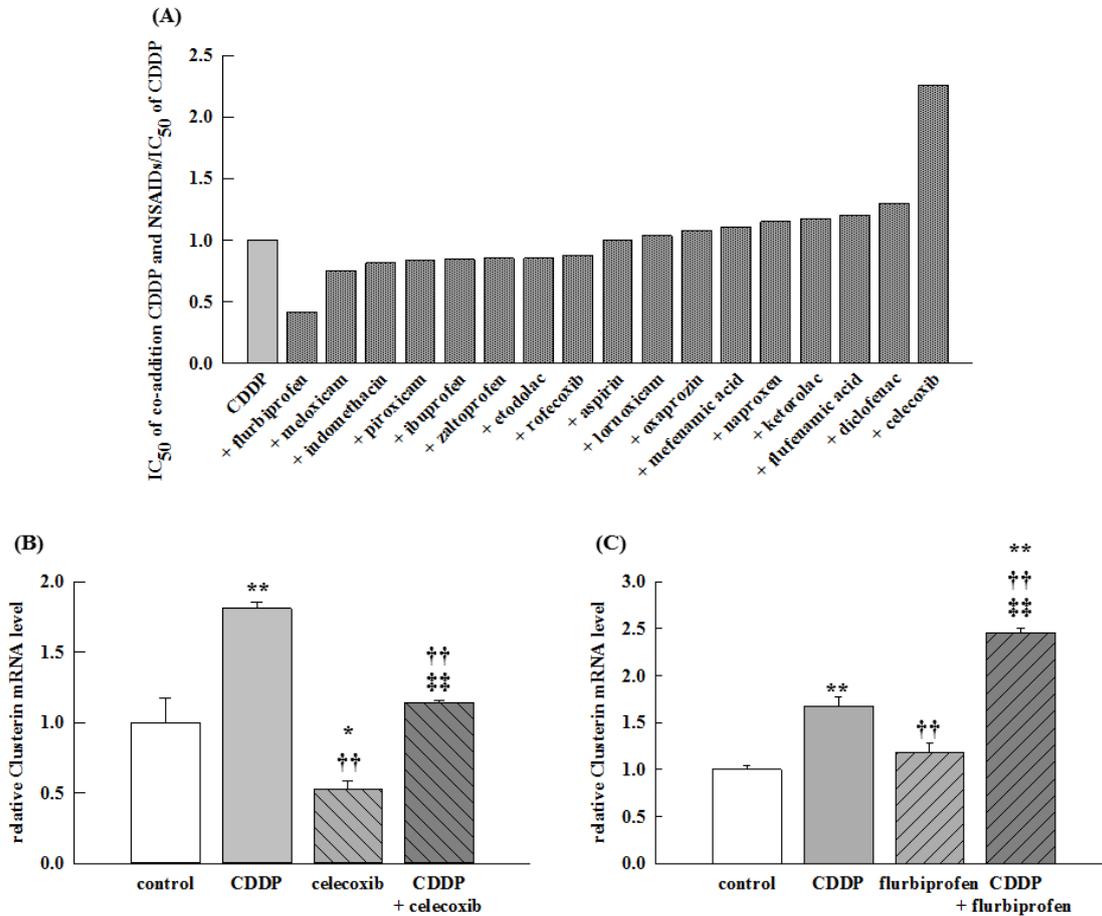


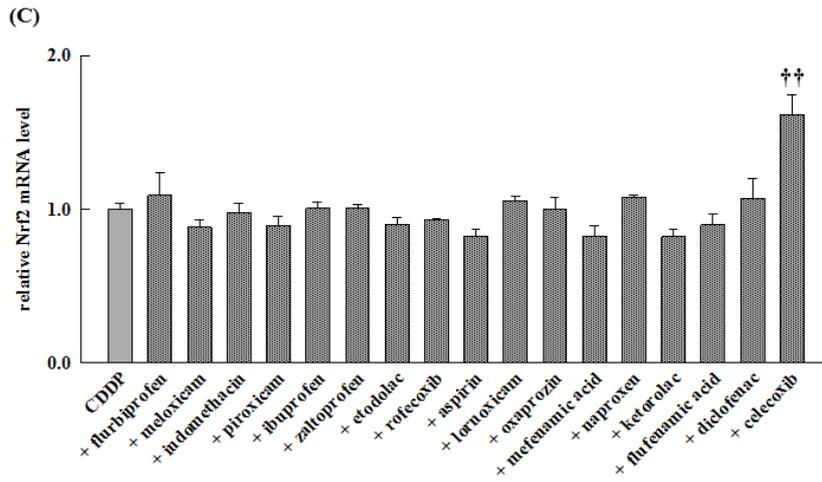
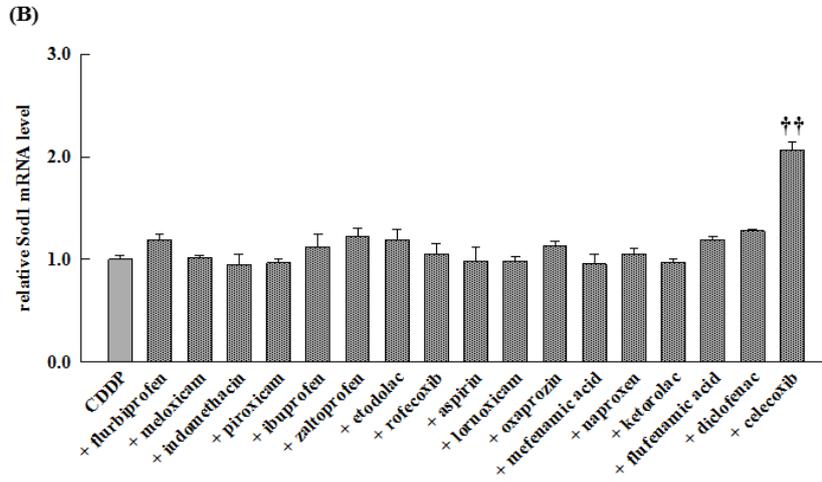
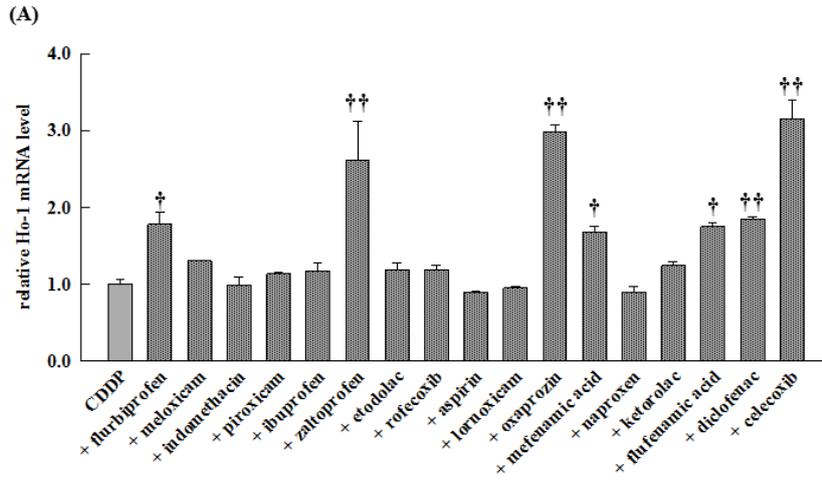
Figure 5. Effect of NSAIDs on CDDP-induced cytotoxicity and Clusterin mRNA levels in CDDP-treated NRK-52E cells.

(A) The values were the ratio of IC₅₀ of co-addition of CDDP and NSAIDs to IC₅₀ of CDDP alone. The concentration of NSAIDs co-addition with CDDP was defined as the concentration at which no effect on cell viability was observed when treated with NSAIDs only (described Table 10). Clusterin mRNA levels were altered following incubation with CDDP (10 μM) and (B) celecoxib (50 μM) or (C) flurbiprofen (200 μM) for 48 h. Clusterin mRNA was normalized to Actin. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group, ††P < 0.01 compared with the CDDP group, †††P < 0.01 compared with the celecoxib or flurbiprofen group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第七項 NSAIDs が酸化ストレスマーカーに及ぼす影響

CIN は抗酸化作用により軽減されることが報告されていることから³⁵⁾、酸化ストレスマーカーに着目した。その結果、酸化ストレスマーカーである Heme oxygenase 1 (Ho-1)、Superoxide dismutase 1 (Sod1)、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) はセレコキシブ同時添加により mRNA 量が増大することが明らかとなった (Figure 6A, 6B, and 6C)。また、これらマーカーは Figure 5A の細胞生存率の結果と相関関係があることが示された (Table 11)。セレコキシブが酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにするため、NSAIDs が持つスーパーオキシド除去能を評価した。その結果、各 NSAIDs 自体にはスーパーオキシド除去能を有していないことが明らかとなった (Figure 6D)。以上のことより、セレコキシブはス

スーパーオキシド除去能により直接酸化ストレスを軽減させているのではなく、酸化ストレスに対する抵抗性を高めることで CDDP の細胞障害を軽減させることが示唆された。



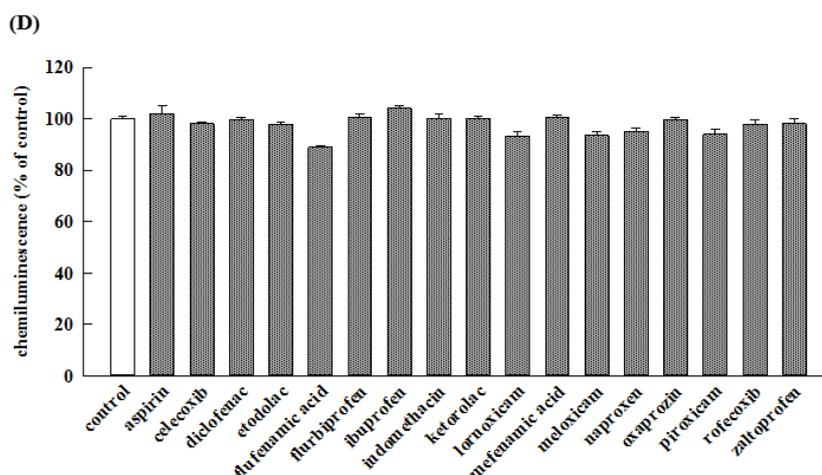


Figure 6. Effect of NSAIDs on mRNA levels of antioxidant markers in CDDP-treated NRK-52E cells and superoxide scavenging ability of 17 NSAIDs.

(A) Ho-1, (B) Sod1, and (C) Nrf2 mRNA were normalized to Actin. Cells were incubated with CDDP (10 μ M) and each NSAID (concentration is shown in Table 10) for 48 h. The expression level of the CDDP group was arbitrarily set at 1.0. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the CDDP group; Dunnett's test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments. (D) All NSAIDs were dissolved in DMSO. The concentration of each NSAID is shown in Table 10. Chemiluminescence of the control group was arbitrarily set at 100%. Data are presented as means with S.D., n = 3 per group.

Table 11. Correlations between cell viability and antioxidant or autophagy markers.

		R	P value
IC ₅₀ of MTT assay	Ho-1 mRNA level	0.505	0.0385*
	Sod1 mRNA level	0.758	< 0.001**
	Nrf2 mRNA level	0.685	0.00242**
	Atg5 mRNA level	0.898	< 0.001**

IC₅₀ of MTT assay is shown in Figure 5A, and Ho-1, Sod1, Nrf2, and Atg5 mRNA level are shown in Figure 6A, 6B, 6C, and 7B respectively. R means correlation coefficient. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared between IC₅₀ of MTT assay and each mRNA level; Pearson correlation coefficient.

第八項 NSAIDs がオートファジーマーカーに及ぼす影響

CIN は抗酸化作用だけではなく、オートファジー機能の亢進により軽減されることも報告されている³⁶⁾。このことから、オートファジーマーカーである Autophagy related gene (Atg) 5、Atg7、Lc 3、Beclin 1 の mRNA 量を評価したところ、セレコキシブ同時添加により CDDP 単独添加と比較して Atg5、Atg7、及び Lc 3 の mRNA 量が增大していることが明らかとなった (Figure 7A)。また、17 種の NSAIDs が Atg5 の mRNA 量に及ぼす影響を評価したところ Figure 7B の結果となり、これは酸化ストレスマーカーと同様に Figure 5A の細胞生存率の結果と相関関係を示した (Table 11)。以上の結果より、セレコキシブは酸化ストレスに対する抵抗性だけではなく、オートファジー機能の亢進により CDDP の細胞障害を軽減させることが示唆された。

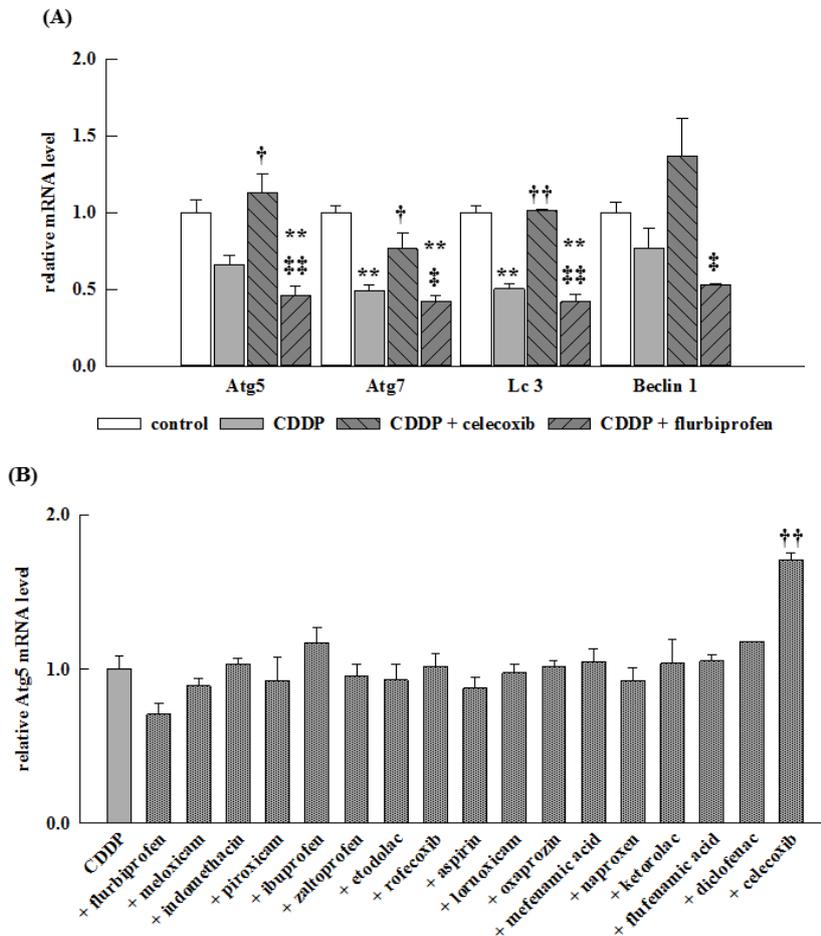


Figure 7. Effect of NSAIDs on mRNA levels of autophagy markers in CDDP-treated NRK-52E cells. (A) Atg5, Atg7, Lc 3, and Beclin 1 mRNA levels were altered by incubation with CDDP (10 μ M), celecoxib (50 μ M), and flurbiprofen (200 μ M) for 48 h. The mRNAs were normalized to Actin. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. **P < 0.01 compared with the control group, †P < 0.05 and ††P < 0.01 compared with the CDDP group, ‡P < 0.05 and ‡‡P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group; Tukey's post-hoc test. (B) Atg5 mRNA was normalized to Actin. Cells were incubated with CDDP (10 μ M) and each NSAID (concentration is shown in Table 10) for 48 h. The expression level of the CDDP group was arbitrarily set at 1.0. ††P < 0.01 compared with the CDDP group; Dunnett's test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第九項 セレコキシブとフルルビプロフェンが CIN に及ぼす影響

In vitro の結果より、CDDP の細胞障害に対してセレコキシブは軽減、フルルビプロフェンは増強させることが示された。この結果が生体内でも同様に作用するかを明らかにするため、*in vivo* で評価することとした。CDDP 投与により減少した体重は、セレコキシブ併用投与によりコントロールと同程度まで回復し、フルルビプロフェン併用投与により体重減少が亢進することが明らかとなった (Table 12)。腎臓の重量は体重変動と同様の傾向を示したが、体重あたりの腎臓重量を比較したところ、各群間で差が認められなかったことから、腎臓重量の変動は体重変動に起因するものであることが示された。また、腎障害マーカーの 1 種である SCr 値を測定したところ、CDDP 投与により高値を示した SCr

値はセレコキシブ併用投与により低下し、フルルビプロフェン併用投与では CDDP 単独投与と同程度の値を示した (Figure 8A)。さらに、腎障害マーカーの 1 種である **Kidney injury marker 1 (Kim-1)** の mRNA を評価したところ、CDDP 投与により発現が上昇した **Kim-1** は、セレコキシブ併用投与により減少し、フルルビプロフェン併用投与により増大することが示された (Figure 8B and 8C)。以上の結果より、セレコキシブは CIN を軽減させ、フルルビプロフェンは CIN を増強させることが明らかとなった。

Table 12. Variation of body and kidney weight in rats.

	Body weight (g)			Kidney weight (g)	Kidney weight /body weight
	Day 1 (baseline)	Day 5	Day 5 - Day 1	Day 5	Day 5
control	193.9 ± 4.7	219.4 ± 4.5	25.5 ± 1.3	2.08 ± 0.09	0.0095 ± 0.0005
CDDP	191.3 ± 8.8	184.4 ± 8.5	-7.0 ± 4.6**	1.75 ± 0.17**	0.0095 ± 0.0008
CDDP + celecoxib	194.9 ± 5.7	221.0 ± 5.3	26.2 ± 2.2††	1.99 ± 0.09	0.0090 ± 0.0003
CDDP + flurbiprofen	191.8 ± 10.8	162.0 ± 17.6	-29.8 ± 15.5**、††、##	1.62 ± 0.21**、##	0.0100 ± 0.0008

Body weight at baseline and day 5 was measured. Variation of body weight from baseline was compared between groups. Kidney weight was total right and left kidney. **P < 0.01 compared with the control group, ††P < 0.01 compared with the CDDP group, ##P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means ± S.D., n = 5–7 per group.

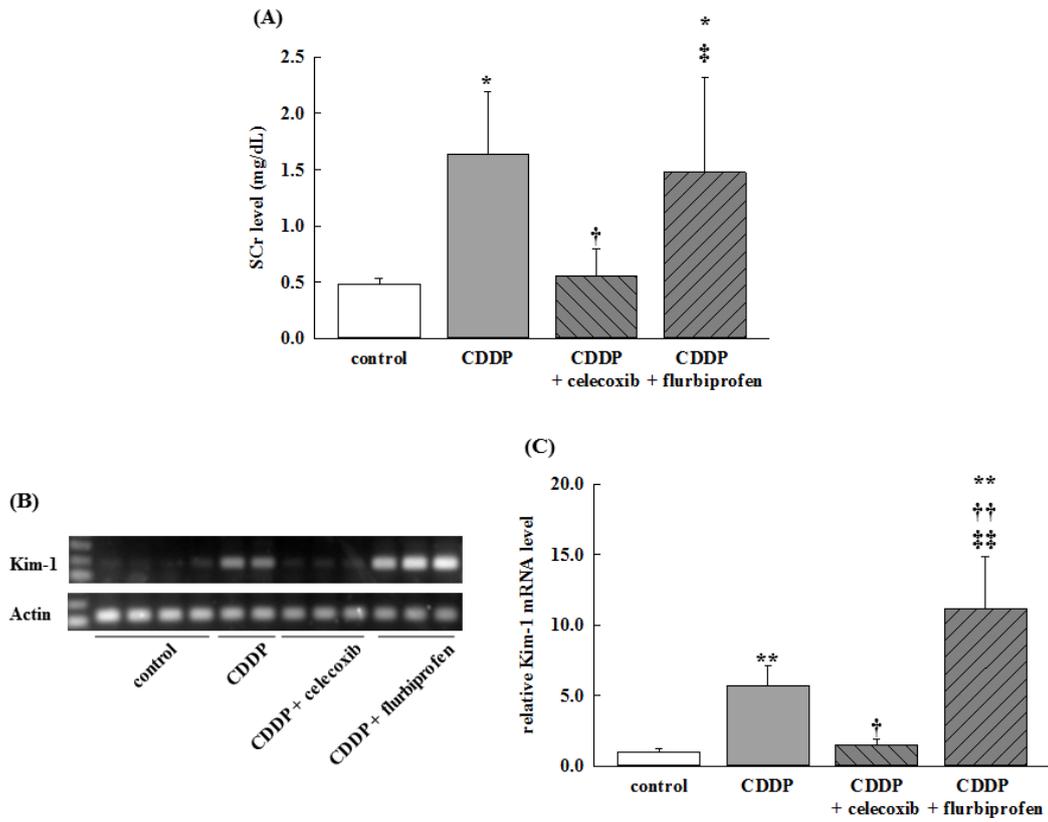


Figure 8. Effect of celecoxib and flurbiprofen on rats with nephrotoxicity by CDDP.

(A) The serum creatinine level was measured on day 5. (B) The picture was Kim-1 and Actin mRNA expression by RT-PCR, and (C) mRNA was quantified by ImageJ analysis software. Kim-1 was normalized to Actin. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group, †P < 0.05 and ††P < 0.01 compared with the CDDP group, ‡P < 0.05 and ‡‡P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means with S.D., n = 5–7 per group.

第四節 考察

本章ではまず、メタアナリシスにより NSAIDs が CIN のリスク因子となるかを評価した後、基礎研究により詳細な機序を検証した。メタアナリシスは一般的にプライマリーエンドポイントの結果やランダム化比較試験の結果を解析することが多い。しかしながら、NSAIDs の併用と CIN との関連を検討している論文の中で、プライマリーエンドポイントでの検証や前向き臨床研究の研究デザインの論文はこれまで報告されていない。したがって、セカンダリーエンドポイントの報告を用いた本検討のメタアナリシスの結果は、今後プライマリーエンドポイントでの検証や前向き臨床研究を行っていく上で重要な知見であると考えられる。

本検討での CIN 発症率は 29.5% であり、過去に報告されている CIN 発現頻度と同程度であったことから⁸⁾、本検討の母集団は実臨床から乖離のあるものではないことが示された。また、CDDP 投与患者の 25.1% が NSAIDs を服用していたことから、NSAIDs が投与されている患者に安全に CDDP を投与する方策の考案が必要である。しかしながら、本検討の候補論文には NSAIDs 投与方法の記載がなく、一度のみの使用なのか、あるいは常に服用しているのかの区別がつかない。したがって、NSAIDs の投与方法の違いで CIN に及ぼす影響が異なる可能性がある。

候補論文間に公表バイアスが含まれている可能性は低いことが示された。これは抽出された論文が全てセカンダリーエンドポイントでの評価であることから、統計学的な差に関係なく公表されることに起因すると考えられる。また、薬物療法施行コース数に関するサブグループ解析では“first course evaluation”グループではなく“total course evaluation”グループにおいて NSAIDs 併用が CIN のリスク因子であることが示された。これは CDDP が腎臓において蓄積性を示すためであると考えられる。筆者はこれまでに、ラットに CDDP を投与してから 1 週間後でも腎臓にプラチナが蓄積されていること¹⁴⁾、また、CDDP 反復投与は単回投与よりも腎臓におけるプラチナ蓄積量が増加していることを報告しており¹⁵⁾、total course の方がより CIN を発症しやすかったと考察している。一方で、本検討では患者背景の問題で薬物療法施行コース数に関するサブグループ解析しか行えなかったが、CIN は CDDP の投与量依存性と関連があることが報告されており⁴⁾、他のサブグループに関してもさらなる解析が求められる。

本研究のメタアナリシスにはいくつかの limitation が含まれている。7 報の候補論文の内、6 報が日本から出版されている論文であったことから、NSAIDs と CDDP との併用を考察している国はアジアに多く、国や地域に関してバイアスが含まれている可能性がある。また、CIN 予防方法には Mg の投与やハイドレーション法などが知られているが¹³⁾、候補論文の中でこれらの方法の有用性をプライマリーエンドポイントとしているものがある。その結果、母集団の中には上記の軽減方法が施行されていない患者が含まれるため、NSAIDs 服用群にこれら患者が多く含まれていた可能性は否定できない。また、本研

究では候補論文が少なく、セカンダリーエンドポイントでの論文を用いているため患者背景や研究デザイン、がん腫や併用薬が異なる可能性があり、特にどの種類の NSAIDs が併用されているかが不明である。したがって、基礎研究により NSAIDs が CIN へ及ぼす影響を詳細に評価することとした。

腎上皮細胞株を用いた *in vitro* での検討により、NSAIDs には CDDP の細胞障害を増強、及び軽減させる作用を有することが明らかとなり、*in vivo* でセレコキシブは CIN を軽減させ、フルルビプロフェンは CIN を増強させることを明らかとした。セレコキシブは COX-2 選択的に阻害し、フルルビプロフェンは COX-1 に選択性が高いため¹⁹⁾、NSAIDs 間での CIN に及ぼす影響の違いは COX-1 と COX-2 に対する選択性の違いであると予想していた。しかしながら、*in vitro* での結果より、セレコキシブより COX-2 に選択性が高いロフェコキシブや、フルルビプロフェンより COX-1 に選択性が高いケトララクは CDDP の細胞障害に影響を及ぼさなかった。また、セレコキシブと同様に COX-2 に選択性が高いエトドラクやメロキシカムは CDDP の細胞障害を軽減させなかった。したがって、NSAIDs 併用時の CIN への影響は COX 非依存的な作用であると考えられる。この知見は本検討で行った 17 種類の NSAIDs を同時に評価したことで明らかとなり、これまでに同じ条件下で複数の NSAIDs が CDDP の細胞障害に及ぼす影響を評価した報告はない。一方で、過去に報告されている NSAIDs の COX 阻害に対する選択性は recombinant の COX を用いた評価であり³⁷⁾、実際に NSAIDs が細胞内に取り込まれた状態での COX に対する阻害強度を報告した論文はなく、筆者も検討を試みたが十分な結果を得ることができなかった。したがって、NSAIDs が CIN に及ぼす影響が COX 依存的なのか非依存的なのかはさらなる検討が求められる。

セレコキシブが CIN に及ぼす影響には酸化ストレスマーカーとオートファジーマーカーが関与することを明らかとした。CDDP による細胞障害は ROS の産生により生じることから⁹⁾、ROS の除去、及び酸化ストレスに対する抵抗性を高めることが CIN の予防に有効な手段である。近年、抗酸化作用を示す食品成分と CDDP との組み合わせに関する検討が行われており、抗酸化作用を持つクルクミンは CIN を軽減させることが報告されている^{38, 39)}。また、CIN はミトコンドリア障害により生じるが¹¹⁾、オートファジーにより障害を受けたオルガネラが除去されることで CIN が軽減されることも報告されている³⁶⁾。実際に、オートファジー機能を低下させることで CIN が誘発されることが報告されていることから⁴⁰⁾、オートファジーと抗酸化作用は CIN 軽減に重要な要因である。

セレコキシブの CIN 軽減効果に抗酸化作用とオートファジーが関与することが示唆された一方で、フルルビプロフェンはこれらマーカーの発現を減少させず、フルルビプロフェンが CIN を増強させる機序については十分に解明できなかった。筆者はこれまでに、腎臓で CDDP を輸送するトランスポーターの発現変動に伴い、腎臓における CDDP 蓄積が減少することで CIN が軽減することを報告している^{14, 15)}。CDDP は腎臓において、OCT2 と CTR1 により取り込まれ、MATE1 により排泄される³⁴⁾。そこで、NRK-52E 細胞にお

ける CDDP と NSAIDs 同時添加時の細胞内プラチナ蓄積量を評価したが、セレコキシブやフルルビプロフェンの同時添加は細胞内プラチナ蓄積量に影響を及ぼさないことが明らかとなった (data not shown)。このことから、これら NSAIDs はトランスポーター発現変動に関与しないか、もしくは受動拡散の影響が CDDP のトランスポーター輸送よりも大きいことが考えられる。*In vivo* の検討では雄性のラットを用いたが、OCT2 は雌性よりも雄性で発現量が多く、それに伴い腎臓に CDDP が分布されやすいことが報告されている⁴¹⁾。したがって、CIN は雄性で生じやすいとされているが、フルルビプロフェンがトランスポーターへ及ぼす影響が低い場合、雌性においても CIN が増強する可能性がある。また、臨床現場において、フルルビプロフェンのプロドラッグであるフルルビプロフェンアキセチルはがん疼痛に用いられることから⁴²⁾、この薬剤が CIN にどのような影響を及ぼすかについても検討が必要である。

In vivo での検討において、腎障害を評価するために SCr 値と Kim-1 の mRNA 量を評価した。セレコキシブ併用投与は両マーカーで CDDP 単独投与よりも有意に減少させたが、フルルビプロフェン併用投与は Kim-1 の mRNA 量を増大させた一方で、SCr 値は CDDP 単独投与と同程度であった。これは、Kim-1 の方が SCr 値よりもマーカーとしての感度が高いことが報告されており⁴³⁾、フルルビプロフェン併用投与の影響が SCr 値では反映されにくかったのではないかと考えられる。また、フルルビプロフェン併用投与は CDDP による体重減少を亢進させた。CDDP による体重減少は食欲不振により生じるものだと考えられており、また、生体内の Mg 濃度が減少している場合、CIN が増強されることが報告されている⁴⁴⁾。このことから、フルルビプロフェン併用投与による体重減少は、強い摂食障害が生じたか、あるいは腎障害とそれに伴う低 Mg 状態により CDDP の毒性が強くなるためだと考えられる。

本検討では *in vitro* で 17 種の NSAIDs の影響を評価し、CDDP の細胞障害を最も増強、及び軽減させた NSAIDs について *in vivo* でさらに検討を行った。一方で、*in vitro* ではジクロフェナクを含むいくつかの NSAIDs は CDDP の細胞障害に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これら NSAIDs の中には、実臨床でがん疼痛に対する使用頻度が低いものが含まれるものの、CDDP 投与患者に安全に使用できるかを検証するためには *in vivo* でさらなる検討が重要であると考えられる。

結論として、メタアナリシスにより NSAIDs は CIN のリスク因子となることが明らかとなった⁴⁵⁾。また、基礎研究により、NSAIDs の中には CIN を増強させる、増強させない、軽減させる作用を有するものがあることを明らかとした⁴⁶⁾。CDDP 投与患者に NSAIDs が処方された場合、アセトアミノフェンやトラマドール等の他の抗炎症薬への変更や、本研究で CIN 軽減効果を有することを明らかとしたセレコキシブへの変更が推奨される。また、本研究はリバーズ・トランスレーショナルリサーチに基づき検討を進めたことから、今後はセレコキシブが CIN を軽減させるかを臨床研究で評価していく必要がある。

第二章 CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs の探索

第一節 緒言

これまでに、一部の NSAIDs には抗腫瘍効果を有することが示唆されており^{21, 22)}、CDDP と NSAIDs の組み合わせにより、がん疼痛を軽減させつつ CDDP の抗腫瘍効果を高めることが期待できる。しかしながら、どの種類の NSAIDs が抗腫瘍効果を有しているかの報告は乏しく、同一条件下で複数の NSAIDs 間を比較した報告はない。そこで本研究では、がん部位別死亡率 1 位の肺がんに着目し、肺がん細胞に抗腫瘍効果を示す NSAIDs を探索することとした。

一方で、がん薬物療法を進めていく上で、腫瘍の抗がん剤耐性獲得が問題となる⁴⁷⁾。腫瘍が抗がん剤に対して耐性を獲得することで、治療効果の低下、治療期間の延長、治療選択肢の減少により、がん治療の妨げとなることから、最適な薬物療法の遂行には耐性獲得の回避が必須となる。腫瘍の抗がん剤耐性獲得機構には薬物輸送の変化や DNA 修復機構の亢進などがあり⁴⁸⁾、対象となる抗がん剤やがん細胞の種類によって様々な耐性機構が存在する⁴⁹⁾。CDDP 耐性の獲得機構は複数報告されており、代表的なものとしてシスチン・グルタミン酸トランスポーターである cystine/glutamate transporter (xCT) を介した ROS に対する抵抗性の向上や⁵⁰⁾、幹細胞マーカーの 1 種である sex determining region Y-box 2 (SOX2) による CSCs 様機能の亢進などがある⁵¹⁾。本検討では CDDP 耐性がん細胞株を樹立し検討に用いることで、CDDP 耐性の有無に関わらず、CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs を探索することとした。

また、CSCs は腫瘍組織に 0.01-1% 存在し、がん細胞集団ヒエラルキーのトップに位置し、自己複製能や腫瘍形成能、分化能、転移能、抗がん剤耐性能などを有していると言われている^{52, 53)}。抗がん剤が腫瘍を攻撃した際、がん細胞が消滅しても CSCs が残存する場合、がんが再発すると言われていることから⁵⁴⁾、がん薬物療法において CSCs を標的としたアプローチの探索が行われている。本検討では CDDP 耐性の有無だけではなく、CSCs にも効果を示す NSAIDs を探索することとした。

本章では、CDDP 耐性の有無に関わらずがん細胞、及び CSCs に効果を示す NSAIDs を評価し、CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs を探索することを目的とし、種々検討を行った。

第二節 実験材料及び方法

第一項 試薬

第一章 第二節 第一項と同様のものを使用した。

第二項 使用細胞

ヒト肺腺がん細胞株である A549 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) とヒト小細胞肺がん細胞株である SBC-3 細胞 (JCRB 細胞バンク、Osaka, Japan) を用いた。10% FBS と 1% penicillin-streptomycin を含む RPMI-1640 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) を培養液として用い、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で培養した。

第三項 CDDP 耐性株の樹立

耐性化前の状態の細胞をそれぞれ A549/parent 細胞、SBC-3/parent 細胞とした。これら細胞に CDDP をそれぞれ 6.7 μ M、0.6 μ M まで適宜増量させながら添加し、1 ヶ月間以上曝露させながら培養した。CDDP 耐性株をそれぞれ A549/DDP 細胞、SBC-3/DDP 細胞とし、曝露後に残存する CDDP を除去する目的で CDDP を含まない培養液で 2 ヶ月間以上培養した。さらに、一度細胞を凍結保存し、解凍後でも CDDP に対する抵抗性に変化がないことを確認した。

第四項 細胞生存率評価

第一章 第二節 第八項と同様に行った。なお、A549/parent 細胞と A549/DDP 細胞は 5,000 cells/well で、SBC-3/parent 細胞と SBC-3/DDP 細胞は 20,000 cells/well で播種した。

第五項 mRNA 量測定

第一章 第二節 第七項に記載の Total RNA の抽出、逆転写反応、real-time PCR と同様に行った。なお、Table 13 に使用した primer の塩基配列を示す。

Table 13. Primer sequences for real-time PCR.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
h18S	5'-gttggttttcggaactgaggc-3'	5'-gtcggcatcgtttatggtcg-3'
hACTIN	5'-tggcaccagcacaatgaa-3'	5'-ctaagtcatagtccgcctagaagca-3'
hB2M	5'-cagcgtactccaaagattcagg-3'	5'-cccagacacatagcaattcagg-3'
hGAPDH	5'-caatgacccttcattgacc-3'	5'-gacaagctcccgttctcag-3'
hHMBS	5'-attgctatgtccaccacagg-3'	5'-ggtttctagggtcttcccaac-3'
hHPRT1	5'-ggactaattatggacaggactg-3'	5'-gctcttcagtctgataaaatctac-3'
hSDHA	5'-tggagacctaaagcactgaag-3'	5'-tactcatcaatccgcaccttg-3'
hTBP	5'-ggataagagagccacgaacc-3'	5'-gctggaaaaccaactctctg-3'
hOCT4	5'-ctgggggttctatttgggaag-3'	5'-tgctctcactcggttctc-3'
hSOX2	5'-accecaagatgcacaactc-3'	5'-cttctccgttccgacaaaag-3'
hCD133	5'-tcaaaaggagtcggaactgg-3'	5'-cagggatgatgttgggtctc-3'
hCD44	5'-gcaaccctactgatgatgacg-3'	5'-aatgtgtcttggctctctgtag-3'
hCD44v9	5'-agcagagtaattctcagagcttc-3'	5'-gcttgatgtcagagtagaagttg-3'
hxCT	5'-gtacgagtctgggtggaac-3'	5'-agcttgatcgaagttcagg-3'
h4F2hc	5'-aagaaccagaaggatgatgtcg-3'	5'-gggagtaaggtccagaatgac-3'
hMRP1	5'-gtgtgggtgccttgttttac-3'	5'-atatgccccgactctttcc-3'
hMRP2	5'-tgaacctgatgtctgtggatg-3'	5'-cctgaatggcttactcttggtg-3'
hMRP3	5'-tcagacagagattggagagaagg-3'	5'-cgtggctcaaagatgtgcttg-3'
hMRP4	5'-tgttcttctgggtcctcaatc-3'	5'-aggcttctgtgcgtcattc-3'
hMRP5	5'-tcttctgtgtgggaatgatcg-3'	5'-ttattgtagcgctggatggtg-3'
hBCRP	5'-ttatccgtggtgtgtctgga-3'	5'-ttctgaggccaataaggtg-3'

第六項 シスチン取り込み量測定

細胞を 24 well プレート (Corning, Corning, NY, USA) に 50,000 cells/well 播種し、24 時間培養した。その後、培養液の交換、もしくはセレコキシブを添加し、48 時間培養した。なお、セレコキシブ添加時の培養液中の最終 DMSO 濃度は 0.1%とした。培養後、培養液を除去し、37°C 条件下で uptake buffer (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM d-glucose, 5 mM HEPES, pH 7.4) 500 µL で 2 回洗浄し、uptake buffer を 500 µL 加えて 37°C で 10 分間インキュベートした。その後、buffer を除去し、0.5 µM の [¹⁴C]-cystine (PerkinElmer, Boston, MA, USA) を含む uptake buffer (pH 7.4) を 250 µL 添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、4°C の uptake buffer 1 mL で 3 回洗浄し、0.5 M NaOH 500 µL で細胞を溶解した。溶解後のサンプル 475 µL をバイアルに移し、液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold; PerkinElmer, Boston, MA, USA) を 3 mL 加え、液体シンチレーションカウンター LSC-5100 (日立製作所, Tokyo, Japan) で各サンプルの放射活性を測定した。また、溶解後のサンプル 25 µL を用い、BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) でタンパク質濃度を測定した。

第七項 xCT 一過性過剰発現

xCT 発現プラスミド (xCT_pcDNA3.1/Zeo (+))とコントロール用のプラスミド (pcDNA3.1/Zeo (+)) は GenScript (Piscataway, NJ, USA) から購入し、プラスミドのトランスフェクトには Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。細胞を 24 well プレートに 2.0×10^5 cells /well で播種し、24 時間培養した。その後、培養液を除去し、抗生物質を含まない培養液を 500 μ L 添加した。Table 14 に示す反応液を調製し、室温で 15 分間インキュベートした後に各 well に 50 μ L ずつ添加し、24 時間培養した。その後、抗生物質を含まない培養液で培養液の交換、もしくは CDDP を添加し、48 時間培養した後に検討に用いた。なお、96 well プレートでの検討では細胞を 40,000 cells/well で播種し、全て 1/5 倍量とした。

Table 14. Composition of reaction solution for transfection with plasmid.

Component	Volume
Plasmid (0.5 μ g)	Variable
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	50 μ L
Lipofectamine 3000 Reagent	1.5 μ L
P3000 Reagent	1 μ L

第八項 xCT ノックダウン

xCT siRNA (HSS119128) とネガティブコントロール siRNA (12935300) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入し、siRNA のトランスフェクトには Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。siRNA が 120 nM になるよう Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で調製し、Lipofectamine RNAiMAX Reagent を 1/100 倍量加えて室温で 20 分間インキュベートした。その後、6 well プレートに各 500 μ L ずつ添加し、 1.25×10^5 cells /well となるよう抗生物質を含まない培養液で懸濁した細胞を 2.5 mL 加え、24 時間培養した。その後、抗生物質を含まない培養液で培養液の交換、もしくは CDDP を添加し、48 時間培養した後に検討に用いた。なお、96 well プレートでの検討では細胞を 5,000 cells/well で播種し、全て 1/25 倍量とした。

第九項 Sphere Formation Assay

培養液として 1% penicillin-streptomycin、20 ng/mL epidermal growth factor (Proteintech Group, Rosemont, IL, USA)、10 ng/mL basic fibroblast growth factor (Proteintech Group, Rosemont, IL, USA)、B-27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む DMEM/F12 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いた。細胞を 96-well ultra-low attachment microplates (Corning, Corning, NY, USA) に 400 cells/well で播種し、A549/DDP 細胞は 7 日間、SBC-3/DDP 細胞は 9 日間培養し、スフェロイドを形成させた。その間の培地交換は 2-3 日毎に行い、well 内の半量の培養液を除去し、同量の新しい培養液を加え、その後、CDDP 及び NSAIDs を添加し、48 時間培養した。なお、添加後の培養液中の最終 DMSO 濃度は 0.1%とした。培養後、スフェロイ

ド数を顕微鏡下でカウントした。なお、Total RNA 抽出時には A549/DDP 細胞を 6-well ultra-low attachment microplates (Corning, Corning, NY, USA) に 12,000 cells/well で播種し、SBC-3/DDP 細胞を 100 mm ultra-low attachment dish (Corning, Corning, NY, USA) に 70,000 cells/well 播種して Total RNA の抽出を行った。

第十項 統計解析

統計解析は unpaired Student's t-test、Tukey's post-hoc test、Dunnett's test のうち適したものをを用い、 $P < 0.05$ を有意とした。統計解析は SigmaPlot 14 を用いて行った。

第三節 実験結果

第一項 CDDP 耐性ヒト肺癌細胞株の樹立

検討に先立ち、CDDP 耐性ヒト肺癌細胞株の樹立を行った。CDDP に対する IC₅₀ 値は、A549/DDP 細胞で $24.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 、A549/parent 細胞で $12.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$ であったことから CDDP 耐性獲得により 2.08 倍の抵抗性を示し、SBC-3/DDP 細胞で $11.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、SBC-3/parent 細胞で $3.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ であったことから CDDP 耐性獲得により 3.68 倍の抵抗性を示すことが明らかとなった (Figure 9A and 9B)。

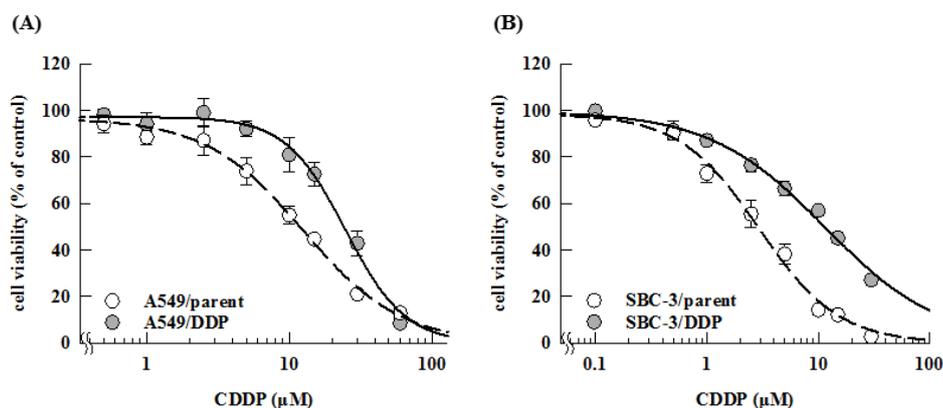


Figure 9. Cell viability of A549 and SBC-3 cells with or without resistance to CDDP.

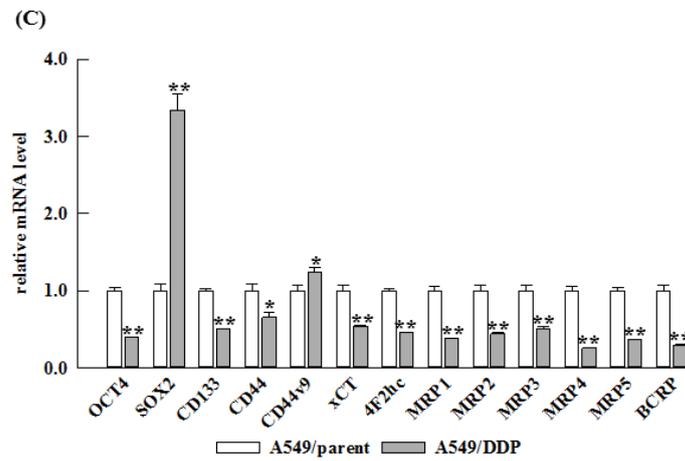
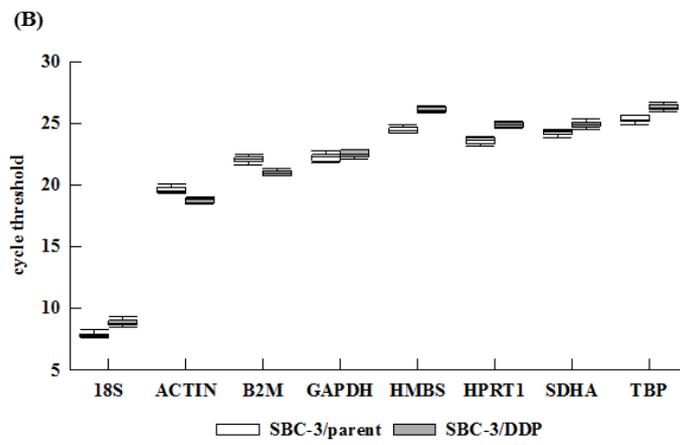
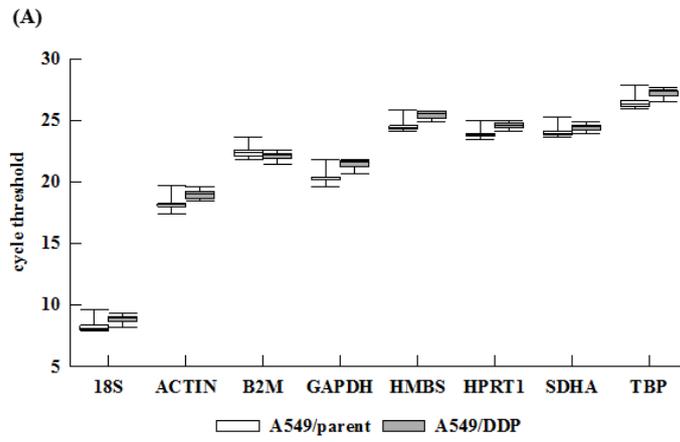
(A) A549 and (B) SBC-3 cells were incubated with CDDP (0–30 μM). White circle and gray circle indicate the parental and the resistant cells, respectively. The IC₅₀ was $12.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$ in A549/parent, $24.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ in A549/DDP, $3.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ in SBC-3/parent, and $11.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ in SBC-3/DDP. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第二項 CDDP 耐性肺癌細胞の特性

耐性前後における各種マーカーの mRNA 量の評価に先立ち、ハウスキーピング遺伝子発現量の変動を評価した。18S、ACTIN、Beta-2 microglobulin (B2M)、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、Hydroxymethylbilane synthase (HMBS)、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)、Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (SDHA)、TATA-binding protein (TBP) の 8 種のハウスキーピング遺伝子进行评估した結果、A549 細胞では B2M が、SBC-3 細胞では GAPDH が CDDP 耐性前後で変動していなかったことから、これらをレファレンス遺伝子として用いることとした (Figure 10A and 10B)。次に、幹細胞マーカーである Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) と SOX2、CSCs マーカーである Cluster of differentiation (CD) 133 と CD44 と CD44 variant 9 (CD44v9)、xCT とその補因子である 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc)、抗がん剤を排泄するトランスポーターである MRP1–5 と BCRP の mRNA 量を CDDP 耐性前後で比較した。その結果、CDDP 耐性獲得により、A549 細胞では SOX2 発現が、SBC-3 細胞では xCT 発現が上昇していることが明らかとなった (Figure 10C and 10D)。SBC-3 細胞で xCT の mRNA 量が上昇していた

ことから、xCTの基質であるシスチンを用い、xCTの機能レベルを評価したところ、A549細胞ではシスチンの取り込みに変化がなかった一方で、SBC-3細胞ではCDDP耐性獲得によりシスチンの取り込みが上昇していることが明らかとなった (Figure 10E and 10F)。

SBC-3/DDP細胞でxCT発現が上昇していたこと、また、CDDPのグルタチオン抱合体はMRP2の基質となることから⁵⁵⁾、xCT阻害剤であるスルファサラジン及びMRP阻害剤であるMK-571がCDDPの殺細胞効果に及ぼす影響を評価した。スルファサラジン共存下において、SBC-3/parent細胞とSBC-3/DDP細胞はCDDPに対する抵抗性が低下した一方で、A549/parent細胞とA549/DDP細胞では変化が認められなかった (Table 15)。また、MK-571共存下ではA549細胞とSBC-3細胞共に変動が認められなかった。以上の結果より、SBC-3細胞ではxCTがCDDPに対する抵抗性に重要な役割を担っていることが示唆された。



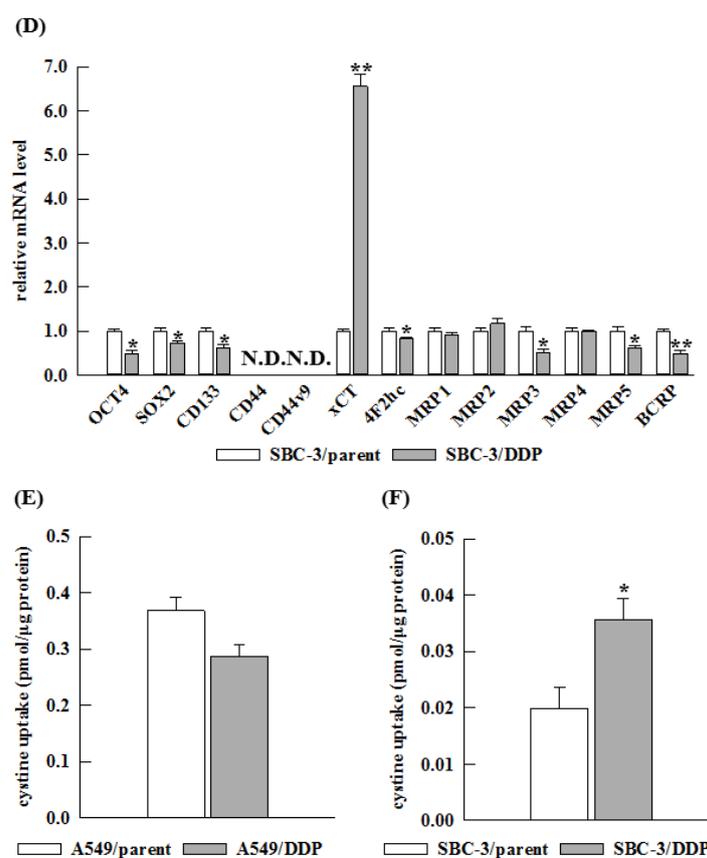


Figure 10. Several marker mRNA levels and variation in cystine uptake in cells with or without resistance to CDDP.

Transcriptional profile of the cycle threshold values of housekeeping genes in (A) A549 and (B) SBC-3 cells. The left box presents the parental cells and the right box presents the resistant cells. Boxes represent the lower and upper quartiles of the cycle threshold range with the median indicated. Vertical bars represent the 25th and 75th percentiles, n = 9 per group. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the parental cells; unpaired Student's t-test. mRNA expression levels were normalized to those of (C) B2M for A549 cells and (D) GAPDH for SBC-3 cells. The left bar indicates the parental cells and the right bar indicates the resistant cells. The expression level of the parental cells was arbitrarily set at 1.0. Uptake of [¹⁴C]-cystine (0.5 μM) by (E) A549 and (F) SBC-3 cells was measured in uptake buffer (pH 7.4) for 15 min at 37°C. The left bar indicates the parental cells and the right bar indicates the resistant cells. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the parental cells; unpaired Student's t-test. N.D.: not detected. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

Table 15. The ratio of the IC₅₀ of co-treatment with CDDP and inhibitors to the IC₅₀ of CDDP in the MTT assay.

	Co-treatment with sulfasalazine (100 μM)	Co-treatment with MK-571 (10 μM)
A549/parent	1.00 ± 0.11	1.10 ± 0.06
A549/DDP	0.96 ± 0.08	1.20 ± 0.15
SBC-3/parent	0.51 ± 0.03*	0.78 ± 0.12
SBC-3/DDP	0.63 ± 0.06*	1.19 ± 0.04

*P < 0.05 compared between the IC₅₀ of co-treatment with CDDP and inhibitor and the IC₅₀ of CDDP alone in each cell; unpaired Student's t-test. Data are presented as means ± S.E. from three independent experiments.

第三項 xCT 過剰発現が SBC-3 細胞の CDDP 抵抗性に及ぼす影響

SBC-3/parent 細胞に xCT を一過性過剰発現させたところ、xCT の mRNA 量は有意に上昇し (Figure 11A)、CDDP に対する IC₅₀ 値は 2.0 ± 0.5 μM から 4.6 ± 0.4 μM に上昇し

た (Figure 11B)。以上の結果より、SBC-3 細胞において xCT 発現の上昇が CDDP 耐性化の機序であることを明らかとした。

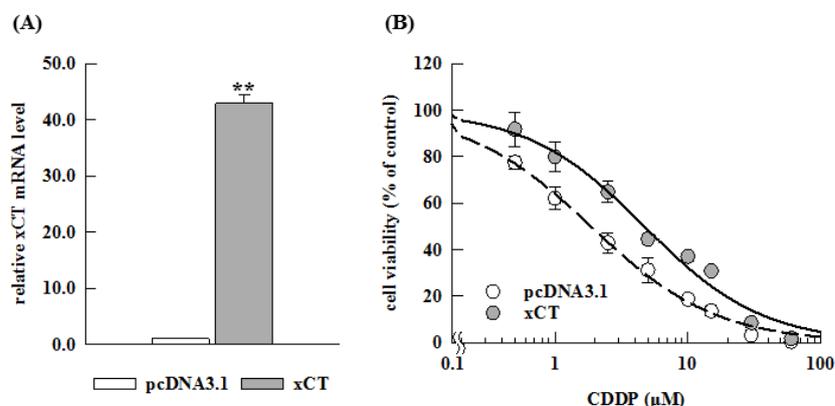


Figure 11. xCT mRNA level in and cell viability of SBC-3/parent cells overexpressing xCT.

(A) xCT mRNA expression level was normalized to GAPDH. The left bar indicates the transfection with pcDNA3.1 and the right bar indicates the transfection with xCT_pcDNA3.1. The expression level of the pcDNA3.1 was arbitrarily set at 1.0. **P < 0.01 compared with the pcDNA3.1; unpaired Student's t-test. (b) White circle and gray circle indicate the transfection with pcDNA3.1 and xCT_pcDNA3.1, respectively. The IC₅₀ was 2.0 ± 0.5 μM with pcDNA3.1 and 4.6 ± 0.4 μM with xCT_pcDNA3.1. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第四項 xCT ノックダウンが A549 細胞の CDDP 抵抗性に及ぼす影響

A549/DDP 細胞において xCT をノックダウンした結果、xCT の mRNA 量は有意に低下した一方で、CDDP 耐性化により上昇した SOX2 の mRNA 量は変化しなかった (Figure 12A)。また、xCT ノックダウン時における CDDP に対する IC₅₀ 値は、コントロールで 13.9 ± 0.1 μM、xCT ノックダウンで 13.5 ± 0.2 μM であった (Figure 12B)。以上の結果より、A549 細胞の CDDP 耐性化には xCT の関与は低く、異なる機序として SOX2 の関与が示唆された。

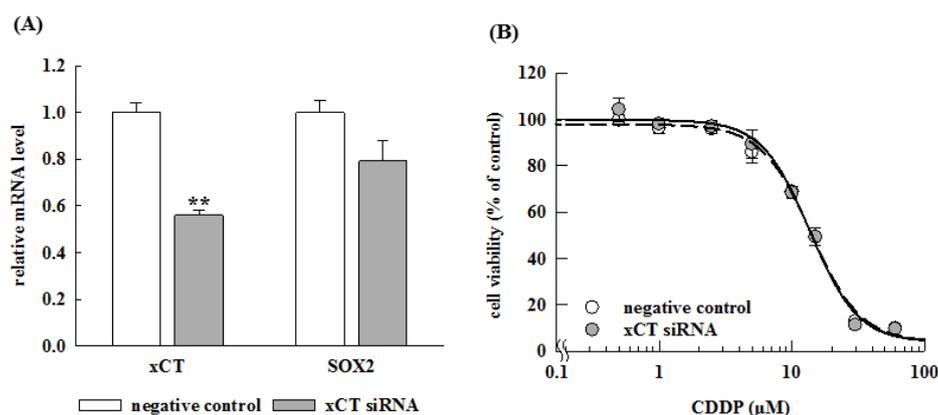


Figure 12. xCT and SOX2 mRNA levels in and cell viability of xCT knockdown A549/DDP cells.

(A) xCT and SOX2 mRNA expression level was normalized to B2M. The left bar indicates the transfection with negative control and the right bar indicates the transfection with xCT siRNA. The expression level of the negative control was arbitrarily set at 1.0. **P < 0.01 compared with the negative control; unpaired Student's t-test. (B) White circle and gray circle indicate the transfection with negative control and xCT siRNA, respectively. The IC₅₀ was 13.9 ± 0.1 μM and 13.5 ± 0.2 μM for cells transfected with negative control and xCT siRNAs, respectively.

Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第五項 NSAIDs 単剤が肺がん細胞の細胞生存率に及ぼす影響

上記の検討により、異なる CDDP 耐性機構を有する 2 種類の CDDP 耐性肺がん細胞株の樹立に成功した。これら細胞を用い、第一章で検討した 17 種の NSAIDs が肺がん細胞の細胞生存率に及ぼす影響を評価した。その結果、A549 細胞では CDDP 耐性の有無に関わらずセレコキシブに対する IC₅₀ 値が算出され (Table 16)、SBC-3 細胞では CDDP 耐性の有無に関わらずセレコキシブ、ジクロフェナク、フルフェナム酸の IC₅₀ 値が算出された (Table 17)。また、検討した NSAIDs の最大濃度処理時の細胞生存率を Figure 13A と Figure 13B に示した。その結果、2 種の細胞に共通して CDDP 耐性の有無に関わらず、セレコキシブ、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸が殺細胞効果を示すことが明らかとなった。

Table 16. MTT assay of NSAIDs alone in A549/parent and A549/DDP cells.

NSAIDs	Evaluated concentration (μM)	IC ₅₀ in parental cells (μM)	IC ₅₀ in resistant cells (μM)	Concentration of co-addition (μM)
Aspirin	0–200	> 200	> 200	200
Celecoxib	0–100	87.9 ± 0.6	76.0 ± 4.2	50
Diclofenac	0–200	> 200	> 200	150
Etodolac	0–200	> 200	> 200	200
Flufenamic acid	0–200	> 200	> 200	100
Flurbiprofen	0–200	> 200	> 200	200
Ibuprofen	0–200	> 200	> 200	200
Indomethacin	0–200	> 200	> 200	100
Ketorolac	0–200	> 200	> 200	200
Lornoxicam	0–10	> 10	> 10	10
Mefenamic acid	0–200	> 200	> 200	100
Meloxicam	0–80	> 80	> 80	50
Naproxen	0–10	> 10	> 10	10
Oxaprozin	0–200	> 200	> 200	200
Piroxicam	0–200	> 200	> 200	200
Rofecoxib	0–25	> 25	> 25	25
Zaltoprofen	0–200	> 200	> 200	200

Cells were incubated with each NSAID. The MTT assay was evaluated until each saturation concentration. The concentration of the NSAIDs co-added with CDDP was defined as no effect on A549/parent and A549/DDP cells within the range of 75–115% cell viability in treatment with NSAIDs alone. Data are presented as means ± S.E. from three independent experiments.

Table 17. MTT assay of NSAIDs alone in SBC-3/parent and SBC-3/DDP cells.

NSAIDs	Evaluated concentration (μM)	IC ₅₀ in parental cells (μM)	IC ₅₀ in resistant cells (μM)	Concentration of co-addition (μM)
Aspirin	0–200	> 200	> 200	200
Celecoxib	0–100	81.8 \pm 0.3	77.2 \pm 1.1	50
Diclofenac	0–200	133.6 \pm 3.3	166.8 \pm 10.7	60
Etodolac	0–200	> 200	> 200	200
Flufenamic acid	0–200	149.4 \pm 7.7	168.5 \pm 6.2	60
Flurbiprofen	0–200	> 200	> 200	200
Ibuprofen	0–200	> 200	> 200	200
Indomethacin	0–200	> 200	> 200	100
Ketorolac	0–200	> 200	> 200	200
Lornoxicam	0–10	> 10	> 10	10
Mefenamic acid	0–200	> 200	> 200	100
Meloxicam	0–80	> 80	> 80	50
Naproxen	0–10	> 10	> 10	10
Oxaprozin	0–200	> 200	> 200	150
Piroxicam	0–200	> 200	> 200	200
Rofecoxib	0–25	> 25	> 25	25
Zaltoprofen	0–200	> 200	> 200	200

Cells were incubated with each NSAID. The MTT assay was evaluated until each saturation concentration. The concentration of the NSAIDs co-added with CDDP was defined as no effect on SBC-3/parent and SBC-3/DDP cells within the range of 75–115% cell viability in treatment with NSAIDs alone. Data are presented as means \pm S.E. from three independent experiments.

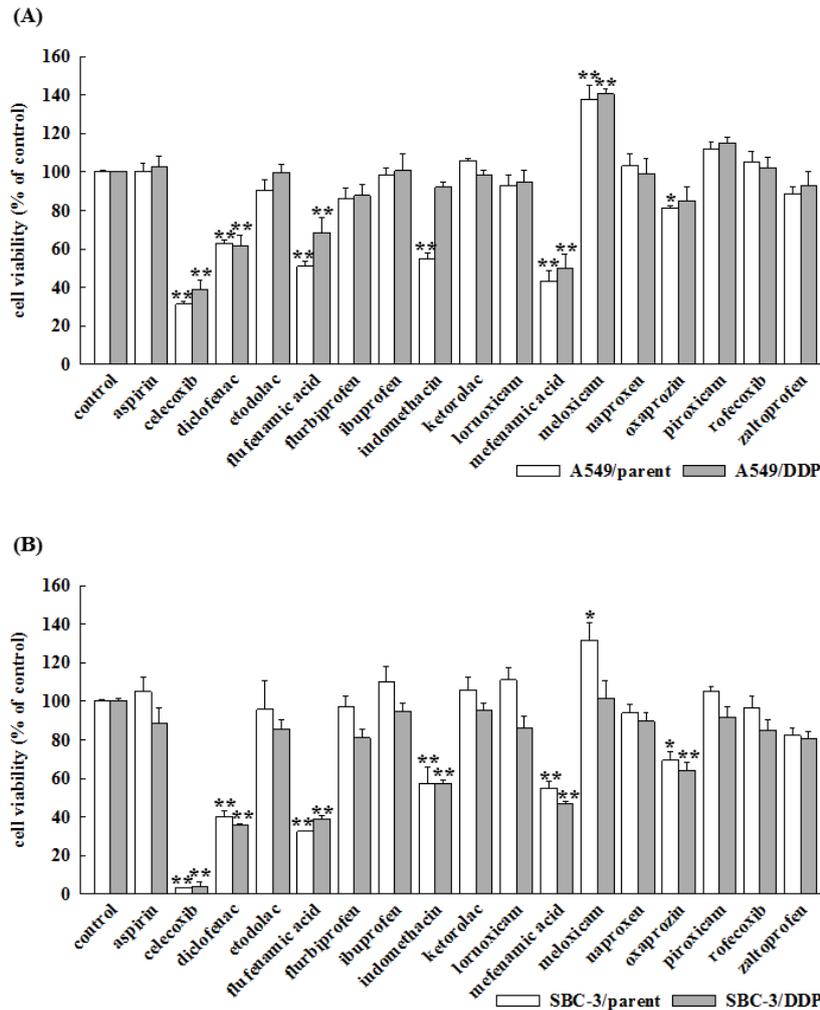


Figure 13. Effect of NSAIDs alone on lung cancer cell viability.

(A) A549/parent and A549/DDP cells and (B) SBC-3/parent and SBC-3/DDP cells were treated with each NSAIDs for 48 h. As for the concentration of NSAIDs, the maximum concentration described in the evaluated concentration in Table 16 and Table 17 was used. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the each control group; Dunnett's test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第六項 CDDP の肺がん細胞に対する殺細胞効果に及ぼす NSAIDs の影響

次に、Table 16 と Table 17 に記載した、細胞生存率が 75–115%となる NSAIDs の濃度で CDDP と同時添加し、CDDP と NSAIDs 同時添加時の IC₅₀ 値と CDDP 単独添加時の IC₅₀ 値の比を算出したところ、単独で殺細胞効果を示したジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸は A549 細胞と SBC-3 細胞において CDDP の殺細胞効果に影響を及ぼさないことが明らかとなり、これら NSAIDs は相加的に CDDP の殺細胞効果を高めることが示唆された (Figure 14A and 14B)。一方で、単独で殺細胞効果を示したセレコキシブは CDDP の抵抗性を高めることが明らかとなった。

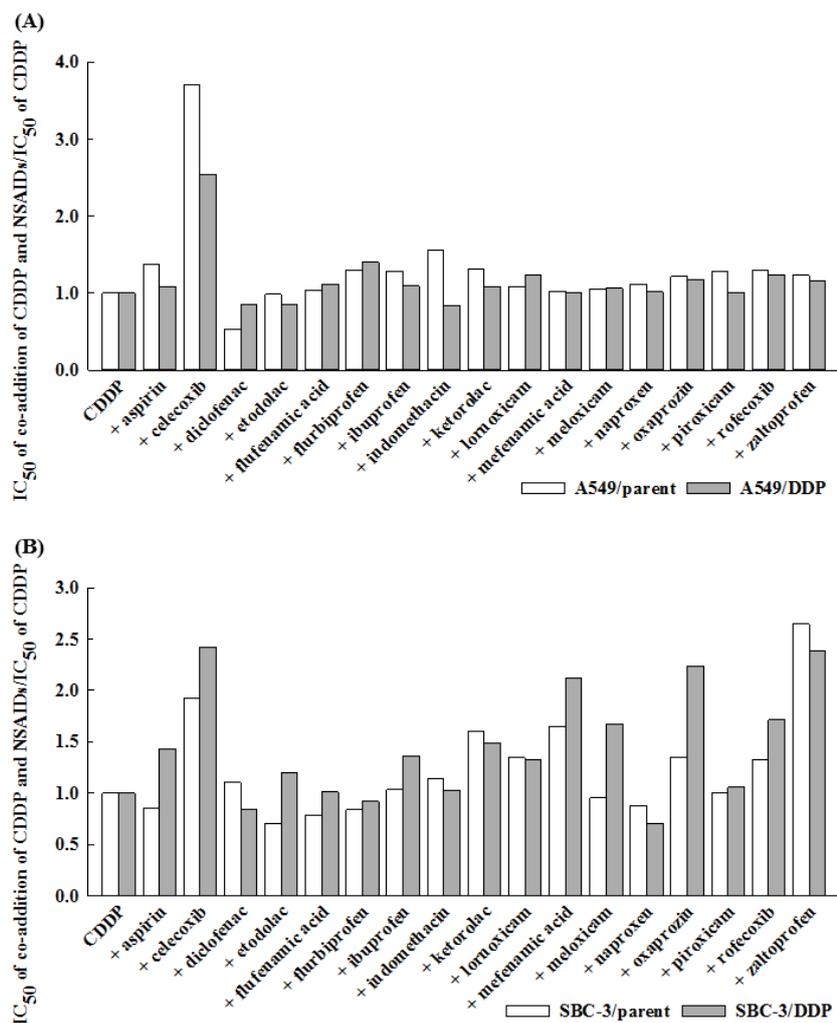


Figure 14. Comparison of the ratio of the effect of NSAIDs on CDDP cytotoxicity in lung cancer cells.

The values were the ratio of IC_{50} of co-addition of CDDP and NSAIDs to IC_{50} of CDDP alone (A) in A549/parent and A549/DDP cells and (B) in SBC-3/parent and SBC-3/DDP cells. The concentration of NSAIDs co-addition with CDDP was defined as the concentration at which no effect on cell viability was observed in treatment with NSAIDs only (described Table 16 and Table 17). Data are presented from three independent experiments.

第七項 セレコキシブが CDDP の抵抗性に及ぼす影響

セレコキシブが CDDP に対する抵抗性を高めた要因を明らかとするため、xCT の mRNA 量を評価したところ、セレコキシブ添加により A549/DDP 細胞では軽微に、SBC-3/DDP 細胞では顕著に mRNA 量が上昇することが明らかとなった (Figure 15A and 15B)。また、xCT の機能評価をしたところ、A549/DDP 細胞ではシスチンの取り込みに差が認められなかった一方で、SBC-3/DDP 細胞ではセレコキシブ添加によりシスチンの取り込みが増大することが明らかとなった (Figure 15C and 15D)。以上の結果より、セレコキシブによる CDDP 抵抗性の増大には xCT が一部関与していることが示唆された。

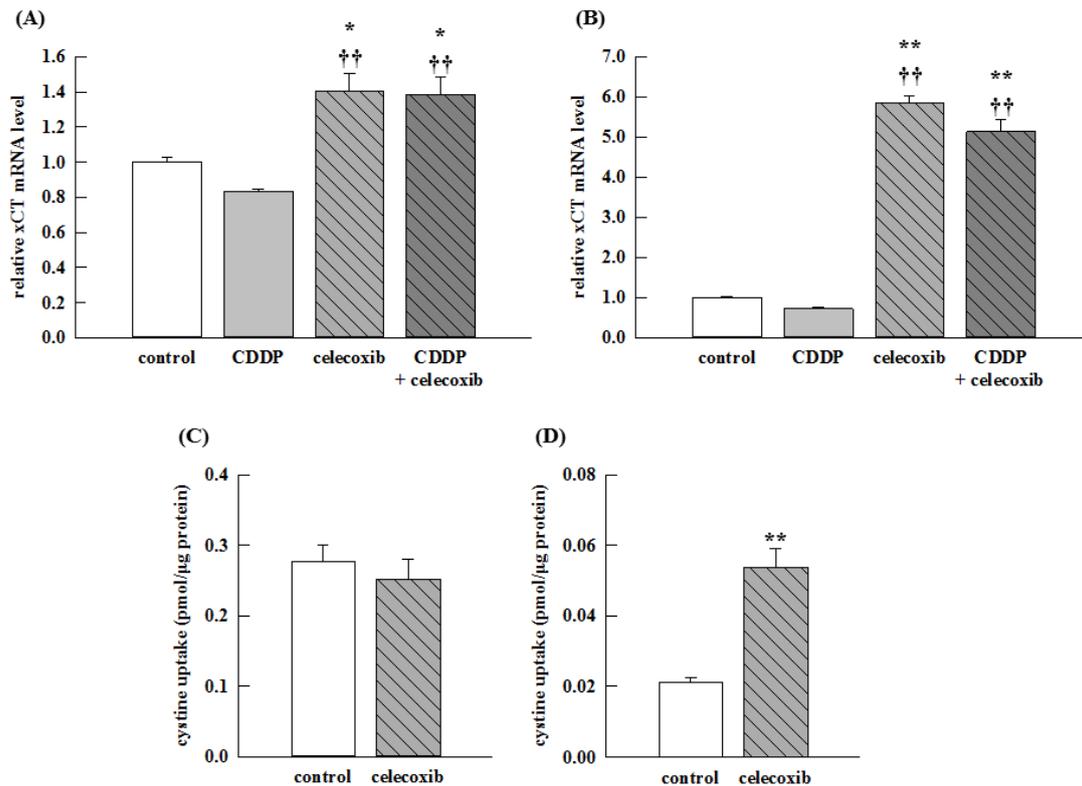


Figure 15. Effect of celecoxib on xCT mRNA level and cystine uptake in CDDP-resistant cells.

(A) A549/DDP and (B) SBC-3/DDP cells were incubated with CDDP (20 μ M and 10 μ M, respectively) and celecoxib (50 μ M) for 48 h. xCT mRNA level was normalized to B2M in A549/DDP cells and to Actin in SBC-3/DDP cells. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with the control group, †† P < 0.01 compared with the CDDP group; Tukey's post-hoc test. (C) A549/DDP and (D) SBC-3/DDP cells were incubated with celecoxib (50 μ M) for 48 h. ** P < 0.01 compared with the control group; unpaired Student's *t*-test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第八項 NSAIDs 単剤がスフェロイドに及ぼす影響

Sphere Formation Assay は、薬物が CSCs に及ぼす影響を網羅的かつ簡便に評価できる実験系である⁵⁶⁾。血清を含まない培養液を用い、がん細胞を超低接着状態で培養することで、CSCs が持つ腫瘍形成能により、CSCs の特徴を示すスフェロイドが形成される。薬物の CSCs への影響はスフェロイド数の減少により評価が可能であることから、NSAIDs 単剤が CSCs に及ぼす影響を評価することとした。Figure 13A と Figure 13B の結果と同じ濃度の NSAIDs を添加したところ、セレコキシブ、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸は A549/DDP 細胞と SBC-3/DDP 細胞のスフェロイド共にスフェロイド数を減少させ、インドメタシンは SBC-3/DDP 細胞のスフェロイドにおいてのみスフェロイド数を減少させた (Figure 16A and 16B)。また、効果を示した NSAIDs 添加時の IC_{50} 値は Table 18 に示した。

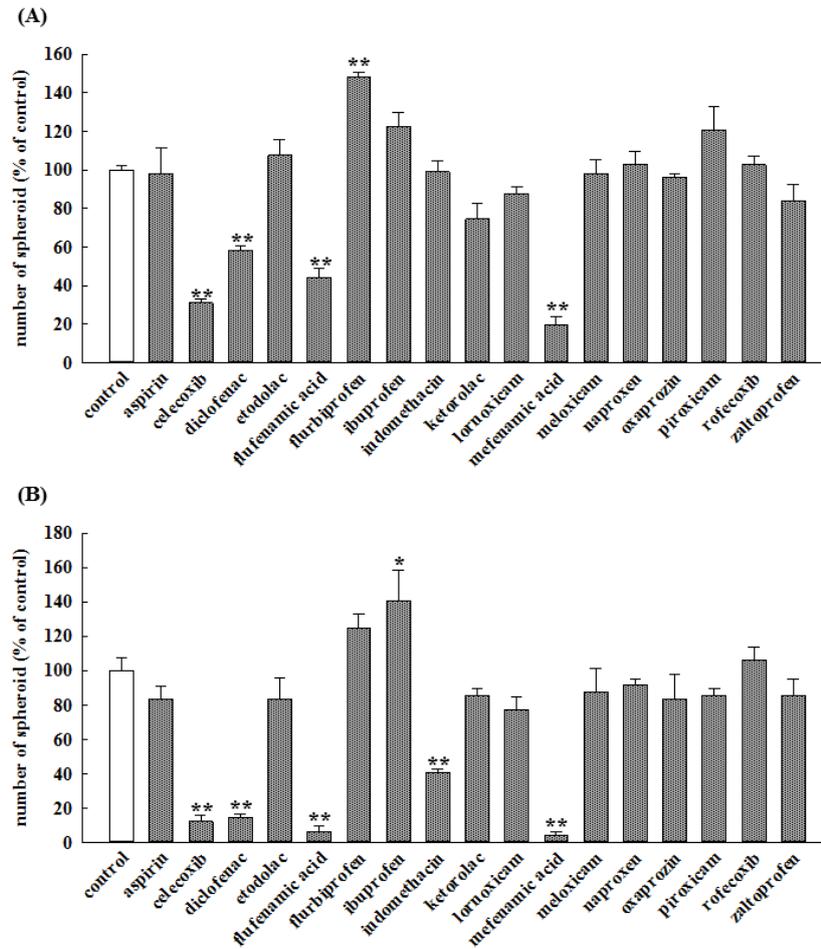


Figure 16. Effect of NSAIDs alone on spheroids viability.

Spheroids of (A) A549/DDP and (B) SBC-3/DDP cells were treated with each NSAID for 48 h. As for the concentration of NSAIDs, the maximum concentration described in the evaluated concentration in Table 16 and Table 17 was used. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group; Dunnett's test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

Table 18. Sphere formation assay in treatment with NSAIDs alone.

NSAIDs	Spheroids of A549/DDP cells		Spheroids of SBC-3/DDP cells	
	IC ₅₀ (μM)	Concentration of co-addition (μM)	IC ₅₀ (μM)	Concentration of co-addition (μM)
Aspirin		200		200
Celecoxib	88.1 ± 6.7	25	53.4 ± 2.7	25
Diclofenac	183.6 ± 14.3	100	138.5 ± 5.8	60
Etodolac		200		200
Flufenamic acid	175.3 ± 26.7	50	153.2 ± 5.9	60
Flurbiprofen		200		200
Ibuprofen		200		200
Indomethacin		200	196.6 ± 10.0	100
Ketorolac		200		200
Lornoxicam		10		10
Mefenamic acid	161.2 ± 1.4	75	131.2 ± 5.0	75
Meloxicam		80		80
Naproxen		10		10
Oxaprozin		200		200
Piroxicam		200		200
Rofecoxib		25		25
Zaltoprofen		200		200

Spheroids were incubated with each NSAID. Concentration of the NSAIDs co-added with CDDP was defined as the range of 70–150% spheroid viability in treatment with NSAIDs alone. Data are presented as means ± S.E. from three independent experiments.

第九項 CDDP のスフェロイドに対する効果に及ぼす NSAIDs の影響

NSAIDs と CDDP 同時添加による Sphere Formation Assay を行うに先立ち、CDDP 単独添加時のスフェロイドへの影響を評価した。その結果、A549/DDP 細胞と SBC-3/DDP 細胞のスフェロイド共に、CDDP の濃度依存的にスフェロイド数が減少し、IC₅₀ 値はそれぞれ 31.9 ± 0.3 μM、20.6 ± 1.0 μM と算出された (Figure 17A and 17B)。また、Figure 9A と 9B の MTT assay より算出された IC₅₀ 値と比較してそれぞれ 1.28 倍、1.81 倍高かったことから、スフェロイド形成により CDDP に対して高い抵抗性を示すことが明らかとなった。

次に、Table 18 に記載した、スフェロイド数が 70–150%となる NSAIDs の濃度で CDDP と同時添加し、CDDP と NSAIDs 同時添加時のスフェロイド数への影響を評価したところ、NSAIDs は CDDP のスフェロイドに対する効果に影響を及ぼさないことが示された (Figure 17C and 17D)。

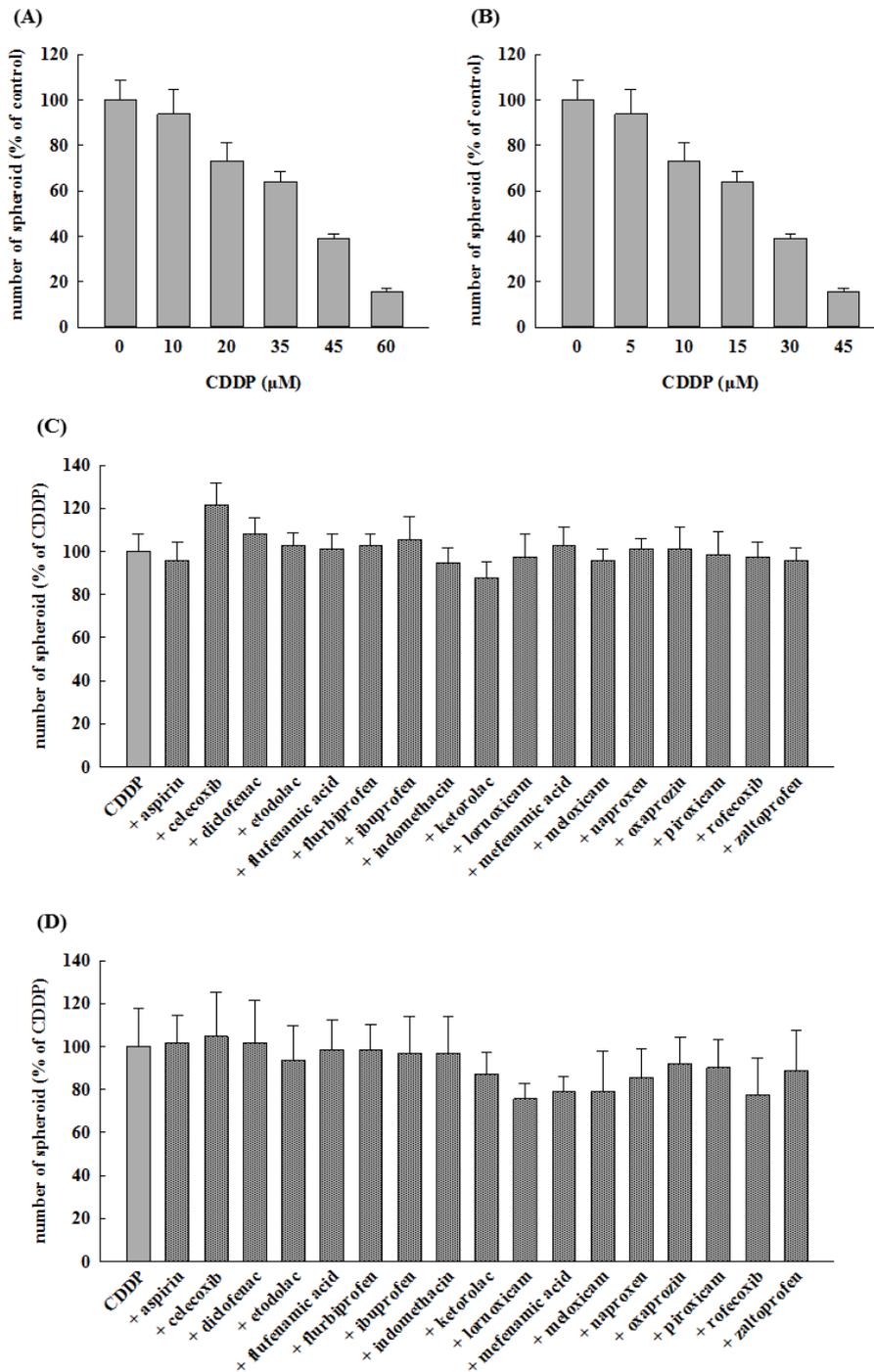


Figure 17. Effect of CDDP and NSAIDs on spheroids viability.

Spheroids of (A) A549/DDP and (B) SBC-3/DDP cells were treated with CDDP for 48 h. Spheroids of (C) A549/DDP and (D) SBC-3/DDP cells were treated with CDDP (20 μM and 10 μM , respectively) and NSAIDs (concentration is described in Table 18). Not significance compared with the CDDP group; Dunnett's test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第十項 単剤でスフェロイドに作用した NSAIDs が CDDP の効果に及ぼす影響

先の検討で、NSAIDs が CDDP のスフェロイドに対する効果に影響を及ぼさなかった

のは、添加した NSAIDs の濃度が低く、効果が十分に発揮されていなかった可能性が考えられるため、単剤で A549/DDP 細胞と SBC-3/DDP 細胞のスフェロイドに作用を示したセレコキシブ、ジクロフェナク、メフェナム酸、フルフェナム酸の添加濃度を単剤で 70–80% のスフェロイド数になる濃度に上げて再検討した。その結果、NSAIDs 同時添加により CDDP 単剤と比較してスフェロイド数が 70–80% となっていたことから、NSAIDs は CDDP のスフェロイドに対する効果を相加的に高めることが明らかとなった (Figure 18A and 18B)。

セレコキシブはがん細胞において xCT 発現上昇により CDDP に対する抵抗性を高めたが、スフェロイドにおいては相加的に CDDP の効果を増強させることが示された。したがって、セレコキシブ添加時のスフェロイドにおける xCT 発現を評価したところ、A549/DDP 細胞と SBC-3/DDP 細胞のスフェロイド共に xCT の mRNA 量が上昇していた (Figure 18C and 18D)。以上の結果より、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸は CDDP 耐性の有無に関わらずがん細胞・CSCs において CDDP の抗腫瘍効果を相加的に高めることが示された。また、セレコキシブはがん細胞において xCT 発現上昇により CDDP に対する抵抗性を高める一方で、CSCs に対しては xCT の発現を上昇させながらも相加的に CDDP の抗腫瘍効果を高めることが明らかとなった。

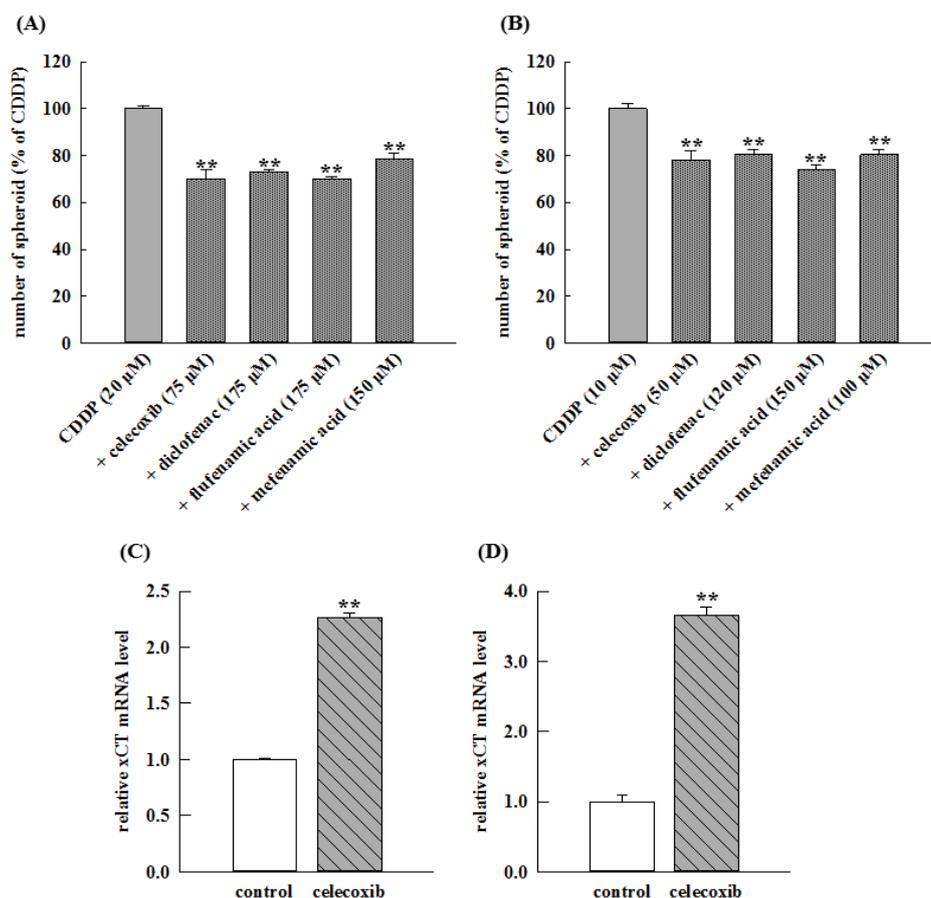


Figure 18. Effect of five NSAIDs on the anticancer effect of CDDP and celecoxib on xCT mRNA levels in spheroids. Spheroids of (A) A549/DDP and (B) SBC-3/DDP cells were treated with CDDP (20 μ M and 10 μ M, respectively) and

NSAIDs for 48 h. **P < 0.01 compared with the CDDP group; Dunnett's test. Spheroids of (C) A549/DDP and (D) SBC-3/DDP cells were incubated with celecoxib (25 μ M) for 48 h. xCT mRNA levels was normalized to HPRT1 in A549/DDP cells and to B2M in SBC-3/DDP cells. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. **P < 0.01 compared with the control group; unpaired Student's t-test. Data are presented as means with S.E. from three independent experiments.

第四節 考察

本章ではまず、CDDP 耐性の有無に関わらず殺細胞効果を示す NSAIDs を探索するために、異なる CDDP 耐性機構を有する 2 種類の CDDP 耐性肺がん細胞株の樹立を行った。SBC-3 細胞は CDDP 耐性機構の 1 つである xCT の発現上昇と機能向上により CDDP の殺細胞効果を減弱させた⁵⁰⁾。xCT はアミノ酸トランスポーターの 1 種であり、システインの二量体であるシスチンの取り込みとグルタミン酸の排泄の役割を持つ⁵⁷⁾。また、xCT はシステイン、グルタミン酸、グリシンで構成されるトリペプチドであり、抗酸化作用を示すグルタチオンの産生に関与する⁵⁸⁾。xCT により細胞内に取り込まれたシスチンはシステインとなりグルタチオン産生に利用されるが、細胞内システイン量がグルタチオン産生の律速基質となることから、xCT は細胞内レドックスバランスの調整に重要な役割を担っている⁵⁹⁾。一方で、xCT は正常細胞だけではなくがん細胞においても発現し⁶⁰⁾、CDDP のような ROS の産生により抗腫瘍効果を示す抗がん剤に対しては、xCT の機能により抗腫瘍効果を減弱させてしまう⁶⁾。このことから、臨床研究においても xCT の阻害剤であるスルファサラジンと CDDP の組み合わせが検討されており⁶¹⁾、xCT の阻害が CDDP 耐性の回避に重要である。

SBC-3 細胞は CDDP 耐性獲得により、xCT の mRNA 量上昇とシスチン取り込み増大を示したが、補因子である 4F2hc の mRNA 量は上昇させなかった。xCT は細胞膜上で 4F2hc とジスルフィド結合し、ヘテロダイマーとなることで機能する⁶²⁾。したがって、シスチンの取り込みが上昇したのは、元から細胞膜上に 4F2hc が十分に発現していた、もしくは xCT の膜移行が促進されたことによるものだと考えられる。

SBC-3 細胞は CDDP 耐性獲得により xCT の mRNA 量と機能を上昇させたが、A549 細胞では xCT の上昇が認められなかった。これは SBC-3 細胞よりも A549 細胞で xCT の mRNA 量が多く (real-time PCR で検出された xCT の平均 threshold cycles 値は SBC-3/parent 細胞で 28.03、A549/parent 細胞で 23.15)、A549 細胞は SBC-3 細胞と比較してシスチン取り込み量が 10 倍以上高いことから、A549 細胞は元々 xCT を介した CDDP に対する抵抗性を有していたため、CDDP 長期曝露でも xCT の変動が認められなかったのではないかと考えられる。実際に、臨床では非小細胞肺がんは小細胞肺がんよりも CDDP に対する感受性が低いことが報告されている⁶³⁾。

A549 細胞は CDDP 耐性獲得により、xCT ではなく SOX2 の mRNA 量が増大していた。また、CD44 は A549 細胞においてのみ発現し、CDDP 耐性獲得により CD44 のバリエーションである CD44v9 の発現が上昇し、スタンダードアイソフォームである CD44 の発現が減少した。CD44v9 はがんの悪性度と CSCs に関連のあるマーカーである⁶⁴⁾。CSCs は Wnt シグナル、Notch シグナル、Hedgehog シグナルなどを介して様々な抗がん剤に抵抗性を示し⁵²⁾、SOX2 とも関連が深い⁶⁵⁾。したがって、A549 細胞における CDDP 耐性機構は SOX2 発現上昇による CSCs 様機能の向上であると考えられる。SOX2

は転写因子であり様々な遺伝子の発現調節を行っていることから機能評価は難しく⁶⁶⁾、検討できなかった。一方で、SBC-3/parent 細胞に xCT を一過性過剰発現させると CDDP に対する抵抗性が高まったが、A549/DDP 細胞において xCT をノックダウンしても SOX2 発現に変化は認められず、CDDP に対する抵抗性は変わらなかった。以上の結果より、A549 細胞は SBC-3 細胞と異なる CDDP 耐性機構を有していることを見出した。

CDDP 耐性機構を明らかとするために、本検討では xCT だけではなく MRP にも着目した。CDDP は MRP の基質とならないことが報告されている⁶⁷⁾。一方で、CDDP は生体内で代謝されてグルタチオン抱合体となり、その後システイン抱合体となるが⁶⁸⁾、CDDP のグルタチオン抱合体は MRP2 の基質となることが示唆されている⁵⁵⁾。CDDP のシステイン抱合体は CDDP よりも毒性が強いことが報告されていることから⁶⁹⁾、MRP 発現上昇により CDDP に対する抵抗性が高まっているのではないかと予測した。しかしながら、MRP の阻害剤である MK-571 を CDDP と同時添加しても、CDDP の殺細胞効果に影響を及ぼさなかったことから、CDDP 耐性化に MRP の寄与は低いことが示された。MK-571 は MRP を広く阻害し、各アイソフォームにおける阻害強度も異なるため⁷⁰⁾、MK-571 の濃度を上げ、全ての MRP アイソフォームを十分に阻害することで MRP と CDDP 耐性との関連が明らかとなる可能性があるが、本検討で用いた MK-571 よりも高い濃度で細胞に添加した場合、MK-571 により細胞障害が生じたことからこれ以上の検討はできなかった。

樹立した異なる CDDP 耐性機構を有する 2 種類の CDDP 耐性肺がん細胞株を用い、CDDP の耐性に関わらず殺細胞効果を示す NSAIDs を探索した。その結果、A549 細胞と SBC-3 細胞に対し、共に殺細胞効果を示した NSAIDs としてセレコキシブ、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸の 4 剤を見出した。NSAIDs の抗腫瘍効果の機序は COX 依存的な報告と COX 非依存的な報告があり^{21, 22)}、未だ十分に解明されていない。セレコキシブは COX-2 選択的に阻害作用を示す NSAIDs だが¹⁹⁾、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸も殺細胞効果を示したことから、また、セレコキシブよりも COX-2 に選択性が高いロフェコキシブは殺細胞効果を示さなかったことから、COX-1 と COX-2 に対する選択性の違いは NSAIDs の抗腫瘍効果の機序とは関連が低いことが推察される。

セレコキシブは単剤で A549 細胞と SBC-3 細胞に殺細胞効果を示した。一方で、これまでにセレコキシブの抗腫瘍効果を評価した報告はあるが⁷¹⁾、CDDP と同時添加時における IC₅₀ 値の比較は検討されておらず、CDDP とセレコキシブとの相互作用はこれまで報告されていない。本研究では、セレコキシブは肺がん細胞において xCT を介して CDDP に対する抵抗性を高めていることを明らかとした。一方で、セレコキシブは CDDP のような xCT により抗腫瘍効果が減弱する抗がん剤ではなく、xCT との関与がない抗がん剤と組み合わせることで、その抗がん剤の抗腫瘍効果を高める可能性がある。

セレコキシブにより xCT の mRNA 量は増大したが、A549/DDP 細胞では SBC-3/DDP 細胞よりも上昇幅が小さかった。また、A549/DDP 細胞はセレコキシブ添加により xCT

発現が上昇したにも関わらず、シスチンの取り込みに差が認められなかった。これには3つの要因が考えられる。第一に、セレコキシブによる SBC-3/DDP 細胞でのシスチン取り込み増大幅は xCT の mRNA 量の上昇幅よりも小さいことから、A549/DDP 細胞でのわずかな mRNA 量の上昇はシスチンの取り込みに反映されなかった可能性がある。第二に、シスチン取り込みの増大は認められなかったものの、xCT を介したグルタチオン産生は亢進している可能性がある。第三に、A549 細胞は元々高い xCT 活性を有している可能性があることから、シスチン取り込みの増大は取り込み時間を延長させることで観察されるかもしれない。xCT の速度論解析については少ないながらも報告されている一方で^{72,73)}、それぞれの論文で評価系が異なっており、速度論的パラメータも論文間で異なっている。したがって、今後は CDDP 耐性の有無における A549 細胞での詳細な xCT の速度論解析と速度論的パラメータの比較を検討していく必要がある。

SBC-3 細胞は A549 細胞と比較し、NSAIDs に対して感受性が高く、いくつかの NSAIDs は SBC-3 細胞において CDDP に対する抵抗性を高めることが明らかとなった。このことから、同じ組織でもがん細胞の組織分類によって効果的な NSAIDs が異なることが示された。NSAIDs はがん患者に高頻度で処方されることから²⁰⁾、がん腫ごとに適切な NSAIDs を選択することが重要であり、本研究の結果は、これらを検証する基礎的な評価系の構築の一助となると考えられる。また、殺細胞効果を示した NSAIDs のほとんどは CDDP 耐性の有無に関わらず効果を示した。このことから、NSAIDs は CDDP とは異なるアプローチによりがん細胞を攻撃でき、新たながん治療選択肢の1つとなりうる。

本検討ではがん細胞だけではなく CSCs についても評価した。その結果、肺がん細胞に殺細胞効果を示したほとんどの NSAIDs は CSCs に対しても同様に効果を示すことが明らかとなった。また、MTT assay と Sphere Formation Assay では実験系が異なるため厳密な比較はできないが、NSAIDs の効果はがん細胞と CSCs で同等か、もしくはわずかに CSCs に対する効果の方が強いことが示された。したがって、NSAIDs は腫瘍を攻撃するだけでなく、がんの再発を抑制することが期待される。

セレコキシブはがん細胞において xCT 発現上昇により CDDP の抵抗性を高めたが、CSCs においては xCT 発現を上昇させながらも相加的に CDDP の効果を高めたことから矛盾が生じている。スフェロイドは通常培養での細胞よりも *in vivo* に近い特徴を示すことが報告されており⁷⁴⁾、生体内ではセレコキシブは CDDP の抗腫瘍効果を減弱させないことが予測される。一方で、スフェロイドにおける xCT の局在が不明であることから xCT が膜発現しておらず機能していない可能性や、通常培養とは異なりスフェロイドは3次元培養であるため、スフェロイド中心部と周辺部でセレコキシブの濃度勾配が生じ、十分にセレコキシブの効果が発揮されていない可能性も考えられることから、セレコキシブの生体内での効果についてはより詳細な検討が求められる。

結論として、SOX2 発現上昇により CDDP 耐性を獲得した A549/DDP 細胞と xCT 発現上昇により CDDP 耐性を獲得した SBC-3/DDP 細胞の2種の樹立に成功した⁷⁵⁾。また、

これら細胞を用いることでジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸はがん細胞と CSCs において CDDP の殺細胞効果を相加的に高めることを見出した。一方で、セレコキシブはがん細胞において xCT 発現上昇により CDDP に対する抵抗性を高めたが、CSCs においては CDDP の効果を相加的に高めることが明らかとなった、今後はセレコキシブの CDDP に対する効果が、がん細胞と CSCs のどちらに対して寄与が大きいかを検証していく必要がある。

第三章 CDDP-NSAIDs の治療効果・副作用の同時評価

第一節 緒言

第一章と第二章での結果から、セレコキシブは CIN を軽減させ、かつ CSCs において CDDP の抗腫瘍効果を高める可能性がある。一方で、がん細胞においては xCT を介し、CDDP の抵抗性を高めることから、セレコキシブは生体内でがん細胞と CSCs のどちらに対する寄与が大きいかは不明である。

また、ジクロフェナクは CDDP の腎細胞への障害を増強させないことを見出しており、また、がん細胞と CSCs において CDDP の抗腫瘍効果を高める可能性がある。しかしながら、ジクロフェナクの CIN への影響と抗腫瘍効果への影響は全て *in vitro* での検討であり、生体内で同様に効果を発揮するかは不明である。

抗がん剤がヒトがん細胞に対する抗腫瘍効果を *in vivo* レベルで評価できるモデルとして Xenograft モデルがある。Xenograft モデルは、免疫不全動物に異種であるヒトがん細胞を移植するモデルであり、化学発がんモデルや遺伝子改変動物モデルよりもモデルの複雑さは低いものの、簡便かつ短期間で構築できる。Xenograft モデル構築には免疫不全動物の皮下へ移植する異所性移植、がん細胞由来組織に対応した部位に移植する同所性移植、脈管内へ移植する転移に分けられる。異所性移植は皮下にがん細胞を移植することから、がん細胞の生着や増殖の観察が容易であり、抗がん剤投与時の抗腫瘍効果の判定が容易である。

本章では、異所性移植による Xenograft モデルマウスを構築し、CDDP とセレコキシブ及びジクロフェナクを併用投与することで、セレコキシブの効果ががん細胞と CSCs のどちらに対し寄与が大きいのか、また、ジクロフェナクは *in vivo* でも CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高めるのかを明らかとすることを目的とし、種々検討を行った。

第二節 実験材料及び方法

第一項 試薬

第一章 第二節 第一項及び第二章 第二節 第一項と同様のものを使用した。

第二項 使用細胞

第二章 第三節で樹立した A549/DDP 細胞を用いた。10% FBS と 1% penicillin-streptomycin を含む RPMI-1640 を培養液として用い、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で培養した。また、公益財団法人実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan) に微生物検査を委託し、マウスに対する感染力が強い微生物が使用細胞に感染していないことを確認した。

第三項 使用動物

BALB/cAJcl-nu (*nu/nu*) 雄性マウスを 5 週齢で日本クレア株式会社より購入し、6 週齢の時点で実験に用いた。全てのマウスの飼育は SPF 環境で管理された北海道大学薬学部動物舎で行われ、自由飲水・摂食させた。本研究における全ての動物実験は「国立大学法人北海道大学 動物実験に関する規定」に則り実施した。

第四項 Xenograft モデル

細胞を FBS と抗生物質を含まない RPMI-1640 で懸濁し、移植直前まで 4°C で保管した。マウスの背中に細胞を 2.0×10^6 cells/100 μ L で皮下投与し、腫瘍が 80–120 mm³ に達したものを day 1 として検討に用いた。腫瘍サイズはデジタルノギス (アズワン、Osaka, Japan) で測定し、以下の式で算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}^2 \times 0.5$$

また、人道的エンドポイントは 1000 mm³ とした。

第五項 CDDP・NSAIDs 投与方法と各検体の採取方法

生理食塩水に溶解した CDDP (5 mg/kg, 0.5 mg/mL) あるいは生理食塩水を day 1, 8, 15 に腹腔内投与し、メチルセルロースで懸濁したセレコキシブ (30 mg/kg/day, 3 mg/mL)、ジクロフェナク (10 mg/kg/day, 1 mg/mL) あるいはメチルセルロースを day 1–4, 8–11, 15–18 に経口投与を行った。本検討では (1) コントロール群: 生理食塩水 + メチルセルロース、(2) CDDP 群: CDDP + メチルセルロース、(3) CDDP + セレコキシブ群: CDDP + セレコキシブ、(4) CDDP + ジクロフェナク群: CDDP + ジクロフェナクの 4 群に分けて評価した。

体重測定は day 1, 8, 15, 22 に行い、腫瘍サイズは day 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 に測定した。腎臓サンプルと腫瘍サンプルは day 22 に摘出した後に生理食塩水で洗浄した。各

種サンプルは測定に用いるまで-80°Cで保管した。

第六項 mRNA量測定

第一章 第二節 第七項と同様に行った。なお、抽出した腫瘍は2.4 mLのISOGEN II中でホモジネートし、そのうち800 µLを腎臓サンプルと同様に処置した。RT-PCRはChart 3に示す条件で反応を行い、使用したprimerの塩基配列をTable 19に示す。また、real-time PCRで使用したprimerの塩基配列をTable 20に示す。

Chart 3. Procedure for RT-PCR.

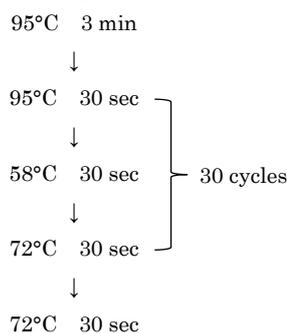


Table 19. Primer sequences for RT-PCR.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
mKim-1	5'-agccgcagaaaaaccctac-3'	5'-cgcttagagatgctgacttcc-3'
mActin	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'	5'-atcacaatgcctgtggtacg-3'

Table 20. Primer sequences for real-time PCR.

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
hxCT	5'-gtacgagtctgggtggaac-3'	5'-agcttgatcgcaagttcagg-3'
h4F2hc	5'-aagaaccagaaggatgatgtcg-3'	5'-gggagtaaggtccagaatgac-3'
hACTIN	5'-tggcaccagcacaatgaa-3'	5'-ctaagtcatagtcgcctagaagca-3'
mHo-1	5'-agatagagcgcaacaagcag-3'	5'-agtgagcccataccagaag-3'
mActin	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'	5'-atcacaatgcctgtggtacg-3'

第七項 統計解析

統計解析はTukey's post-hoc testを用い、P < 0.05を有意とした。統計解析はSigmaPlot 14を用いて行った。

第三節 実験結果

第一項 セレコキシブ・ジクロフェナクが CDDP の抗腫瘍効果に及ぼす影響

A549/DDP 細胞は皮下投与後、5-10 日間で全て生着した。腫瘍サイズは CDDP 投与により減少傾向を示したものの有意な差はなく、CDDP とジクロフェナク併用投与によりコントロールと比較して有意に腫瘍サイズを減少させることが明らかとなった (Figure 19A)。一方で、CDDP とセレコキシブ併用投与は CDDP 単独投与と同等の効果、もしくは軽度に CDDP の抗腫瘍効果を減弱させる傾向を示した。また、腫瘍重量は概ね腫瘍サイズと同様の傾向を示し、CDDP とジクロフェナク併用投与によりコントロールと比較して有意に腫瘍重量を減少させた (Figure 19B and 19C)。以上の結果より、ジクロフェナクは CDDP の抗腫瘍効果を高めることが明らかとなった。

マウスの体重は CDDP 投与により day 15 で体重減少が認められたが、セレコキシブ併用投与により体重減少が軽減し、ジクロフェナク併用投与により CDDP による体重減少が亢進することが明らかとなり、腫瘍サイズや腫瘍重量と同様の傾向を示した (Table 21)。また、腎臓重量は CDDP が投与された群において減少しており、体重あたりの腎臓重量においても同様に CDDP が投与された群はコントロールと比較して減少していた (Table 22)。

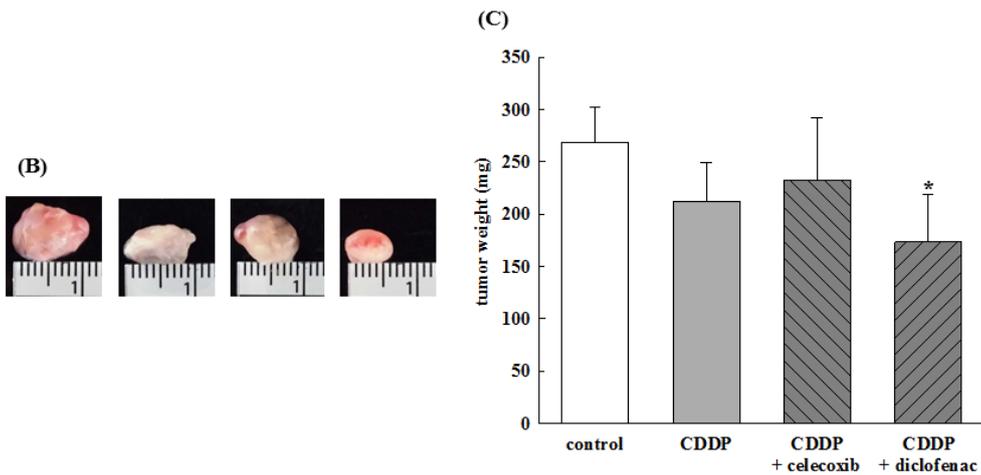
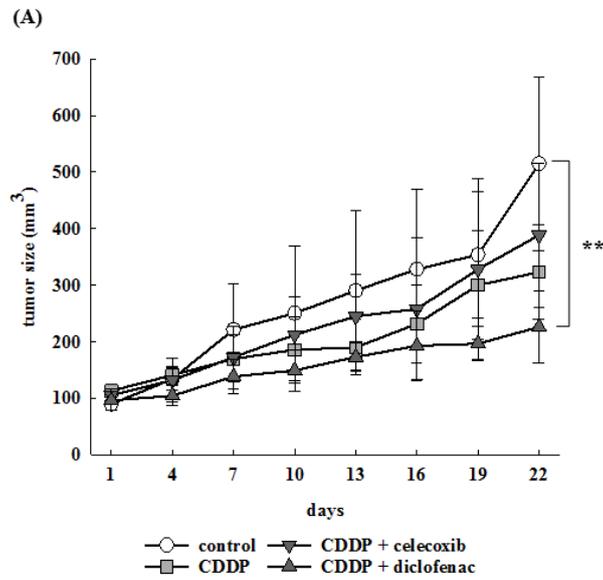


Figure 19. Effect of celecoxib and diclofenac on anticancer effects of CDDP in Xenograft model mice. (A) Tumor size at day 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, and 22 was measured. (B) The pictures (1 scale is 1 mm) were excited tumors at day 22 and (C) tumor weight were measured. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means with S.D., n = 5 per group.

Table 21. Variation of body weight in mice.

	Body weight (g)			
	Day 1 (baseline)	Day 8 - Day 1	Day 15 - Day 1	Day 22 - Day 1
control	23.4 ± 1.9	2.1 ± 1.0	2.0 ± 0.7	3.0 ± 1.0
CDDP	23.1 ± 1.0	0.8 ± 0.9	-0.2 ± 0.8**	0.2 ± 0.9**
CDDP + celecoxib	22.8 ± 1.4	1.9 ± 0.3	0.7 ± 0.8	1.6 ± 0.6
CDDP + diclofenac	23.4 ± 0.8	-0.7 ± 1.3**,#	-0.7 ± 1.2**	-1.3 ± 1.8**,#

Body weight at day 1, 8, 15, and 22 was measured. Variation of body weight from baseline was compared between groups. **P < 0.01 compared with the control group, #P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means ± S.D., n = 5 per group.

Table 22. Variation of kidney weight in mice.

	Kidney weight (mg)	Kidney weight/body weight
control	448.1 ± 43.0	0.0170 ± 0.0007
CDDP	341.8 ± 35.8**	0.0147 ± 0.0012**
CDDP + celecoxib	354.3 ± 30.9**	0.0145 ± 0.0005**
CDDP + diclofenac	335.9 ± 19.9**	0.0152 ± 0.0002**

Kidney weight at day 22 was total right and left kidney. The ratio was the kidney weight per body weight at day 22. **P < 0.01 compared with the control group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means ± S.D., n = 5 per group.

第二項 腫瘍における xCT 発現の評価

セレコキシブ併用投与により、CDDP の抗腫瘍効果を軽微に減弱させる傾向を示したことから、腫瘍における xCT の mRNA 量の評価した。その結果、xCT の mRNA 量に変動は認められなかった (Figure 20A)。また、xCT の補因子である 4F2hc にも mRNA 量に変化がないことが明らかとなった (Figure 20B)。

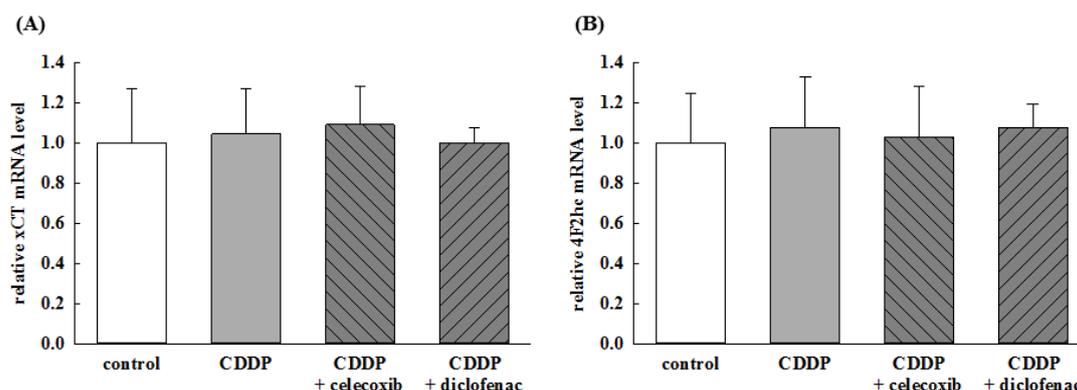


Figure 20. Effect of celecoxib and diclofenac on xCT and 4F2hc mRNA level in tumor treated with CDDP.

(A) xCT and (B) 4F2hc mRNA level were normalized to ACTIN. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. Not significance compared with each group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means with S.D., n = 5 per group.

第三項 セレコキシブ・ジクロフェナクが CIN に及ぼす影響

セレコキシブ及びジクロフェナクが CIN に及ぼす影響を検討するため、腎障害マーカーの 1 種である Kim-1 の mRNA 量の評価した。その結果、セレコキシブ及びジクロフェナク併用投与は CDDP 投与による Kim-1 の mRNA 量上昇に影響を及ぼさないことが明らかとなった (Figure 21A and 21B)。また、腎臓において、酸化ストレスマーカーの 1 種である Ho-1 の mRNA 量は、セレコキシブ併用投与により CDDP 群と比較して有意に上昇させていたが、その変動幅は小さかった (Figure 21C)。以上の結果より、セレコキシブとジクロフェナクは CIN を増強させないことが示され、ジクロフェナクは CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs であることが明らかとなった。

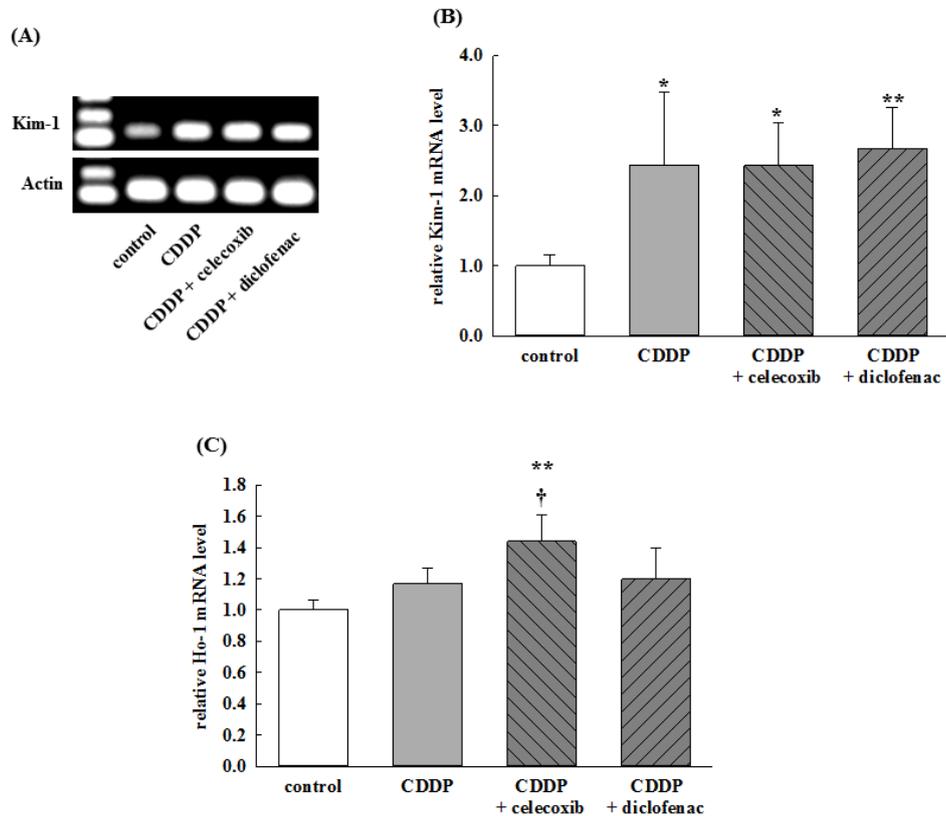


Figure 21. Effect of celecoxib and diclofenac on Kim-1 and Ho-1 mRNA level in kidney treated with CDDP. (A) The picture was Kim-1 and Actin mRNA expression by RT-PCR, and (B) mRNA was quantified by ImageJ analysis software. (C) Ho-1 mRNA expression was measured by real-time PCR. Kim-1 and Ho-1 mRNA level were normalized to Actin. The expression level of the control group was arbitrarily set at 1.0. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the control group, † $P < 0.05$ compared with the CDDP group; Tukey's post-hoc test. Data are presented as means with S.D., $n = 5$ per group.

第四節 考察

本章では、ジクロフェナク及びセレコキシブが CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高めるかを検証するため、Xenograft モデルを構築し評価した。その結果、CDDP とジクロフェナクの併用投与は腫瘍サイズと腫瘍重量を有意に減少させることが明らかとなり、CDDP 単独投与では腫瘍サイズと腫瘍重量を有意に減少させなかったことから、ジクロフェナクは CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs であることが示唆された。しかしながら、ジクロフェナク併用投与は CDDP 単独投与と比較し減少傾向を示したものの有意な差が認められなかった。本検討は day 22 までの評価であり、評価期間を延長することで改善される可能性が考えられるが、コントロール群の腫瘍サイズが人道的エンドポイント付近であることから、これ以上の検討は行えなかった。

セレコキシブ併用投与は軽微に CDDP の抗腫瘍効果を減弱させる傾向を示したことから、セレコキシブ自体の抗腫瘍効果よりも CDDP 抵抗性向上への作用の方が大きいことが示唆された。また、CDDP の抗腫瘍効果を高めなかったことから、セレコキシブの効果は CSCs よりもがん細胞への寄与が大きい可能性がある。一方で、Xenograft モデルから抽出した腫瘍は不均一ながん細胞集団であり、異型であったことから、セレコキシブが腫瘍全体に効果を示しておらず、腫瘍中心部と周辺部で濃度勾配が生じ、効果が十分に発揮されていないことが考えられる。また、腫瘍中において CSCs がどこに存在しているかは不明であり、セレコキシブが CSCs に影響を及ぼしていない可能性もある。本検討では A549/DDP 細胞のみの検討であったが、異なる細胞を移植した複数のモデルを用いることでセレコキシブの影響をより詳細に解明できる可能性が高い。

CDDP による体重減少はセレコキシブ併用投与により軽減し、ジクロフェナク併用投与により亢進されることが明らかとなった。この結果は、腫瘍サイズや腫瘍重量と同様の傾向を示しており、CDDP の抗腫瘍効果の増減に関連するものであると考えられる。CDDP による体重減少は摂食障害が原因であることから⁷⁶⁾、体重減少の影響を詳しく評価するためには摂食量や飲水量の評価が必須であり、今後検討していく必要がある。

ジクロフェナクは CIN を増強させないことが明らかとなり、第一章での *in vitro* の結果と一致したことから、CDDP 投与患者でも比較的安全に使用できる NSAIDs であることが示された。ジクロフェナクはがん疼痛で汎用され、がん治療中の発熱にも用いられる⁷⁷⁾。したがって、CDDP 投与患者におけるジクロフェナクの安全性を評価した本検討は、がん患者の QOL の向上につながる重要なエビデンスであると考えられる。

第一章でラットを用いた CDDP 単回投与による検討において、セレコキシブは CIN を軽減させたが、本検討では CIN を増強させなかったものの軽減効果は認められなかった。また、腎臓における Ho-1 の mRNA 量は上昇していたが変動幅が小さく、影響が弱いことが示唆された。CIN を軽減させなかった原因として 4 つの要因が考えられる。第一に、筆者はラットにおいて、CDDP 単回投与と反復投与で CDDP を輸送する腎トランスポータ

一の発現変動が異なることを見出していることから^{14,15)}、CDDP 反復投与である本検討は単回投与の結果とは異なるものであった可能性がある。第二に、NSAIDs を反復経口投与したことに伴い、水分負荷量が上昇したことが考えられる。CIN 予防方法としてハイドレーション法が行われるが³²⁾、これは腎臓に蓄積する CDDP を大量の輸液により水分負荷をかけ、腎臓から CDDP の排泄を促す方法である。したがって、反復経口投与により CIN の程度が低くなった可能性がある。第三に、体重あたりの腎臓重量がラットよりもマウスの方が大きいことや、CIN モデルマウスは CIN モデルラットよりも高用量の CDDP が投与されることから⁷⁸⁾、種差により CIN への影響が異なると考えられる。第四に、担がんによりセレコキシブの体内動態が変化し、腎臓への影響が低下した可能性がある。マウスとラット、単回投与と反復投与でセレコキシブの CIN に及ぼす影響は異なっており、どちらが臨床を反映した結果であるかは不明であることから、今後は臨床研究による検証が必要である。

セレコキシブ併用投与により CDDP の抗腫瘍効果を軽度に減弱させたことから、腫瘍における xCT の mRNA 量を測定したが変動が認められなかった。このことから、本検討で評価した腫瘍では xCT が機能している可能性は低いことが示唆された。一方で、補因子である 4F2hc も同様の結果を示したことから、xCT の細胞膜移行が行われているかが不明であり、mRNA 量だけの評価では不十分である可能性が高い。今後は免疫染色により、xCT の発現量だけでなく、局在についても評価していくことが求められる。

本検討では A549/DDP 細胞を用いて Xenograft モデルを作製した。第二章で樹立した SBC-3/DDP 細胞に関しても同様に、ヌードマウスに移植し、Xenograft モデルの構築を試みたが、1 ヶ月以上経過しても SBC-3/DDP 細胞はヌードマウスに生着しなかった。ヌードマウスは胸腺の欠損により T 細胞系の免疫が抑制されている⁷⁹⁾。しかしながら、他の免疫系は機能していることから、SBC-3/DDP 細胞は本検討で用いたヌードマウスに生着しなかったと考えられる。

結論として、着目した 2 種の NSAIDs のうち、ジクロフェナクは CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs であることが明らかとなり、CDDP を用いたがん薬物療法の最適化において重要な NSAIDs であることが示された。今後は本研究の結果が臨床でも同様に作用するかを臨床研究で評価していく必要がある。

総括

本邦におけるがん罹患数は増加し続けていることから、がん治療において重要な役割を担っている抗がん剤薬物療法はさらなる発展が求められている。近年、新たな抗がん剤の開発が目まぐるしく、特に免疫チェックポイント阻害薬の誕生により、免疫療法と呼ばれる新たながん治療の選択肢が注目を集めている。一方で、多様化する薬物療法の中でも未だに CDDP は様々ながん腫に汎用されており、第一選択薬として用いられることが多いことから、CDDP を用いた薬物療法を最適化することにより、がん治療の発展へつながると考えられる。本研究ではがん疼痛に用いられる NSAIDs に着目し、NSAIDs が CDDP に及ぼす影響を副作用と抗腫瘍効果の両面から検討した。

第一章では、既報を包括的に評価できるメタアナリシスにより、NSAIDs の併用が CIN のリスク因子となることを明らかとした⁴⁵⁾。一方で、limitation として併用した NSAIDs の種類が不明であったことから、どの種類の NSAIDs が CIN に影響を及ぼすかを基礎研究により評価した。その結果、フルルビプロフェンは CIN を増強させ、セレコキシブは CIN を軽減させることが明らかとなった⁴⁶⁾。また、ジクロフェナクを含むいくつかの NSAIDs は CIN を増強させない NSAIDs であることが示された。

第二章では、NSAIDs は抗腫瘍効果を有することが示唆されていたことから、CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs の探索を行った。2 種類の CDDP 耐性肺がん細胞株を樹立し⁷⁵⁾、NSAIDs が CDDP 耐性前後の肺がん細胞に及ぼす影響を検討したところ、セレコキシブ、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸は CDDP 耐性の有無に関わらず殺細胞効果を示すことを見出した。また、これら NSAIDs は CSCs にも効果を示すことが示された。CDDP と組み合わせることで、ジクロフェナク、フルフェナム酸、メフェナム酸はがん細胞と CSCs において CDDP の殺細胞効果を相加的に高めることが明らかとなった。また、セレコキシブはがん細胞において xCT を介し、CDDP の抵抗性を高めることが明らかとなった一方で、CSCs においては CDDP の効果を相加的に高めることを見出した。

第三章では、ジクロフェナクとセレコキシブに着目し、これら NSAIDs が CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高めるかを Xenograft モデルにより評価した。その結果、ジクロフェナクは CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高めた一方で、セレコキシブは CIN を増強させなかったものの CDDP の抗腫瘍効果を軽微に減弱させる傾向を示した。

本研究により、がん疼痛に用いられるジクロフェナクは CIN を増強させずに CDDP の抗腫瘍効果を高める NSAIDs であることを見出した。本研究は CDDP 投与患者でも安全に使用できる NSAIDs を探索したことから、がん患者のがん疼痛の軽減と QOL の向上につながると考えられる。また、本研究は臨床で既に承認されている医薬品に新たな作用を見出す、ドラッグ・リポジショニングの観点から検討を進めたことにより、早期の臨床応

用の実現が期待される。さらに、がん疼痛の軽減と CDDP の抗腫瘍効果の向上を同時に得られるジクロフェナクは、CDDP を用いたがん薬物療法の最適化において重要な NSAIDs であると考えられる。

参考文献

- [1] 平成 29 年全国がん登録罹患数・率報告、国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(全国がん登録)
- [2] 令和元年(2019)人口動態統計月報年計(概数)の概況、厚生労働省
- [3] Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 222: 385–386.
- [4] Pabla N, Dong Z (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 73: 994–1007.
- [5] Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 57: 1229–1235.
- [6] Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR (2012) Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 269: 2455–2459.
- [7] ランダ注 インタビューフォーム、日本化薬株式会社、2018 年 4 月改訂(第 18 版)
- [8] Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB (2010) Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2: 2490–2518.
- [9] Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M (2006) Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*. 100: 65–72.
- [10] Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M (2003) Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int*. 63: 72–82.
- [11] Park MS, Leon MD, Devarajan P (2002) Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*. 13: 858–865.
- [12] de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg MEL, van den Bent MJ, Planting AST, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J (2003) Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer*. 88: 1199–1206.
- [13] Saito Y, Kobayashi M, Yamada T, Kasashi K, Honma R, Takeuchi S, Shimizu Y, Kinoshita I, Hirotohi D-A, Iseki K (2017) Premedication with intravenous magnesium has a protective effect against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Support Care Cancer*. 25: 481–487.
- [14] Saito Y, Okamoto K, Kobayashi M, Narumi K, Yamada T, Iseki K (2017) Magnesium

- attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by regulating the expression of renal transporters. *Eur J Pharmacol.* 811: 191–198.
- [15] Saito Y, Okamoto K, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Yamada T, Iseki K (2017) Magnesium co-administration decreases cisplatin-induced nephrotoxicity in the multiple cisplatin administration. *Life Sci.* 189: 18–22.
- [16] がん疼痛の薬物療法に関するガイドライン 2020年版、日本緩和医療学会、2020年6月
- [17] Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 231: 232–235.
- [18] Loftin CD, Tiano HF, Langenbach R (2002) Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69: 177–185.
- [19] Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7563–7568.
- [20] World Health Organization. (1996). *Cancer pain relief: with a guide to opioid availability*, 2nd ed. World Health Organization.
- [21] Xu H-B, Shen F-M, Lv Q-Z (2016) Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in chemo-resistant gastric cancer xenograft mouse models through a cyclooxygenase-2-dependent manner. *Eur J Pharmacol.* 776: 1–8.
- [22] Liu B, Yan S, Qu L, Zhu J (2017) Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int.* 17: 1.
- [23] Nagaraj AB, Wang QQ, Joseph P, Zheng C, Chen Y, Kovalenko O, Singh S, Armstrong A, Resnick K, Zanotti K, Waggoner A, Xu R, DiFeo A (2018) Using a novel computational drug-repositioning approach (DrugPredict) to rapidly identify potent drug candidates for cancer treatment. *Oncogene.* 37: 403–414.
- [24] Ng K., Meyerhardt JA, Chan AT, Sato K, Chan JA, Niedzwiecki D, Saltz LB, Mayer RJ, Benson AB 3rd, Schaefer PL, Whittom R, Hantel A, Goldberg RM, Venook AP, Ogino S, Giovannucci EL, Fuchs CS (2014) Aspirin and COX-2 inhibitor use in patients with stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 107: 345.
- [25] Kidera Y, Kawakami H, Sakiyama T, Okamoto K, Tanaka K, Takeda M, Kaneda H, Nishina S, Tsurutani J, Fujiwara K, Nomura M, Yamazoe Y, Chiba Y, Nishida S, Tamura T, Nakagawa K (2014) Risk factors for cisplatin-induced nephrotoxicity and potential of magnesium supplementation for renal protection. *PLoS One.* 9: e101902.

- [26] Yoshida T, Niho S, Toda M, Goto K, Yoh K, Umemura S, Matsumoto S, Ohmatsu H, Ohe Y (2014) Protective effect of magnesium preloading on cisplatin-induced nephrotoxicity: a retrospective study. *Jpn J Clin Oncol.* 44: 346–354.
- [27] Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, Moher D, Becker BJ, Sipe TA, Thacker SB (2000) Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA.* 283: 2008–2012.
- [28] Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C (1997) Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 315: 629–634.
- [29] Begg CB, Mazumdar M (1994) Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics.* 50: 1081–1101.
- [30] Mohri J, Katada C, Ueda M, Sugawara M, Yamashita K, Moriya H, Komori S, Hayakawa K, Koizumi W, Atsuda K (2018) Predisposing Factors for Chemotherapy-induced Nephrotoxicity in Patients with Advanced Esophageal Cancer Who Received Combination Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, And 5-fluorouracil. *J Transl Int Med.* 6: 32–37.
- [31] Almanric K, Marceau N, Cantin A, Bertin É (2017) Risk Factors for Nephrotoxicity Associated with Cisplatin. *Can J Hosp Pharm.* 70: 99–106.
- [32] Yamaguchi T, Uozu S, Isogai S, Hayashi M, Goto Y, Nakanishi T, Imaizumi K (2017) Short hydration regimen with magnesium supplementation prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer: a retrospective analysis. *Support Care Cancer.* 25: 1215–1220.
- [33] Sato K, Watanabe S, Ohtsubo A, Shoji S, Ishikawa D, Tanaka T, Nozaki K, Kondo R, Okajima M, Miura S, Tanaka J, Sakagami T, Koya T, Kagamu H, Yoshizawa H, Narita I (2016) Nephrotoxicity of cisplatin combination chemotherapy in thoracic malignancy patients with CKD risk factors. *BMC Cancer.* 16: 222.
- [34] Yokoo K, Murakami R, Matsuzaki T, Yoshitome K, Hamada A, Saito H (2009) Enhanced renal accumulation of cisplatin via renal organic cation transporter deteriorates acute kidney injury in hypomagnesemic rats. *Clin Exp Nephrol.* 13: 578–584.
- [35] Rashtchizadeh N, Argani H, Ghorbanihaghjo A, Sanajou D, Hosseini V, Dastmalchi S, Ahmad SNS (2019) AMPK: A promising molecular target for combating cisplatin toxicities. *Biochem. Pharmacol.* 163: 94–100.
- [36] Kaushal GP, Shah SV (2016) Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int.* 89: 779–791.
- [37] Abdelall EKA, Lamie PF, Ali WAM (2016) Cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase

- inhibition, synthesis, anti-inflammatory activity and ulcer liability of new celecoxib analogues: Determination of region-specific pyrazole ring formation by NOESY. *Bioorg Med Chem Lett.* 26: 2893–2899.
- [38] Trujillo J, Molina-Jijón E, Medina-Campos ON, Rodríguez-Muñoz R, Reyes JL, Loredó ML, Barrera-Oviedo D, Pinzón E, Rodríguez-Rangel DS, Pedraza-Chaverri J (2016) Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct.* 7: 279–293.
- [39] Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Muqbil I, Sahin N, Gencoglu H, Guler O, Padhye SB, Sarkar FH, Mohammad RM (2014) Comparative in vivo evaluations of curcumin and its analog difluorinated curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biol Trace Elem Res.* 157: 156–163.
- [40] Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y, Rakugi H (2012) Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol.* 180: 517–525.
- [41] Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K (2005) Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol.* 70: 1823–1831.
- [42] Wu T-T, Wang Z-G, Ou W-L, Wang J, Yao G-Q, Yang B, Rao Z-G, Gao J-F, Zhang B-C (2014) Intravenous flurbiprofen axetil enhances analgesic effect of opioids in patients with refractory cancer pain by increasing plasma β -endorphin. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15: 10855–10860.
- [43] Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV (2006) Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290: F517–F529.
- [44] Solanki MH, Chatterjee PK, Gupta M, Xue X, Plagov A, Metz MH, Mintz R, Singhal PC, Metz CN (2014) Magnesium protects against cisplatin-induced acute kidney injury by regulating platinum accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 307: F369–F384.
- [45] Okamoto K, Saito Y, Narumi K, Furugen A, Iseki K, Kobayashi M (2020) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are a Risk Factor for Cisplatin-induced Nephrotoxicity: A Meta-analysis of Retrospective Studies. *Anticancer Res.* 40: 1747–1751.
- [46] Okamoto K, Saito Y, Narumi K, Furugen A, Iseki K, Kobayashi M (2020) Comparison of the nephroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cisplatin-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.*

884: 173339.

- [47] Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S (2014) Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 6: 1769–1792.
- [48] Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 4: 307–320.
- [49] Sonogo M, Pellizzari I, Dall’Acqua A, Pivetta E, Lorenzon I, Benevol S, Bomben R, Spessotto P, Sorio R, Gattei V, Belletti B, Schiappacassi M, Baldassarre G (2017) Common biological phenotypes characterize the acquisition of platinum-resistance in epithelial ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 7: 7104.
- [50] Horibe S, Kawauchi S, Tanahashi T, Sasaki N, Mizuno S, Rikitake Y (2018) CD44v-dependent upregulation of xCT is involved in the acquisition of cisplatin-resistance in human lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 507: 426–432.
- [51] Bourguignon LYW, Wong G, Earle C, Chen L (2012) Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*. 287: 32800–32824.
- [52] Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB (2015) Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol*. 42: S3–S17.
- [53] Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 8: 755–768.
- [54] Zhao J (2016) Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol Ther*. 160: 145–158.
- [55] Chen HHW, Kuo MT (2010) Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs*. 2010: 430939.
- [56] Fujibayashi E, Yabuta N, Nishikawa Y, Uchihashi T, Miura D, Kurioka K, Tanaka S, Kogo M, Nojima H (2018) Isolation of cancer cells with augmented spheroid-forming capability using a novel tool equipped with removable filter. *Oncotarget*. 9: 33931–33946.
- [57] Lo M, Wang YZ, Gout PW (2008) The x_c⁻ cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 215: 593–602.
- [58] Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, Gan B (2018) Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 38: 12.
- [59] Bansal A, Simon MC (2018) Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol*. 217: 2291–2298.
- [60] Wada F, Koga H, Akiba J, Niizeki T, Iwamoto H, Ikezono Y, Nakamura T, Abe M,

- Masuda A, Sakaue T, Tanaka T, Kakuma T, Yano H, Torimura T (2018) High expression of CD44v9 and xCT in chemoresistant hepatocellular carcinoma: Potential targets by sulfasalazine. *Cancer Sci.* 109: 2801–2810.
- [61] Otsubo K, Nosaki K, Imamura CK, Ogata H, Fujita A, Sakata S, Hirai F, Toyokawa G, Iwama E, Harada T, Seto T, Takenoyama M, Ozeki T, Mushiroda T, Inada M, Kishimoto J, Tsuchihashi K, Suina K, Nagano O, Saya H, Nakanishi Y, Okamoto I (2017) Phase I study of salazosulfapyridine in combination with cisplatin and pemetrexed for advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 108: 1843–1849.
- [62] Ishii T, Mann GE (2014) Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: critical roles of Nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol.* 2: 786–794.
- [63] Stupp R, Monnerat C, Turrisi AT 3rd, Perry MC, Leyvraz S (2004) Small cell lung cancer: state of the art and future perspectives. *Lung Cancer.* 45: 105–117.
- [64] Skandalis SS, Karalis TT, Chatzopoulos A, Karamanos NK (2019) Hyaluronan-CD44 axis orchestrates cancer stem cell functions. *Cell Signal.* 63: 109377.
- [65] Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, Qian Y, Ikehata K, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H (2018) Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer., *Sci Rep.* 8: 17639.
- [66] Sarlak G, Vincent B (2016) The Roles of the Stem Cell-Controlling Sox2 Transcription Factor: from Neuroectoderm Development to Alzheimer's Disease? *Mol Neurobiol.* 53: 1679–1698.
- [67] Gupta P, Gao H-L, Ashar YV, Karadkhelkar NM, Yoganathan S, Chen Z-S (2019) Ciprofloxacin Enhances the Chemosensitivity of Cancer Cells to ABCB1 Substrates. *Int J Mol Sci.* 20: 268.
- [68] Zhang L, Hanigan MH (2003) Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 306: 988–994.
- [69] Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH (2009) Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 63: 79–85.
- [70] Reid G, Wielinga P, Zelcer N, Haas MD, Deemter LV, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P (2003) Characterization of the Transport of Nucleoside Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.* 63: 1094–1103.
- [71] Chu T-H, Chan H-H, Kuo H-M, Liu L-F, Hu T-H, Sun C-K, Kung M-L, Lin S-W, Wang E-M, Ma Y-L, Cheng K-H, Lai KH, Wen Z-H, Hsu P-I, Tai M-H (2014)

- Celecoxib suppresses hepatoma stemness and progression by up-regulating PTEN. *Oncotarget*. 5: 1475–1490.
- [72] Fogal B, Li J, Lobner D, M. McCullough DM, Hewett SJ (2007) System xc⁻ activity and astrocytes are necessary for interleukin-1 beta-mediated hypoxic neuronal injury. *J Neurosci*. 27: 10094–10105.
- [73] Bridges CC, Zalups RK (2005) Cystine and glutamate transport in renal epithelial cells transfected with human system xc⁻. *Kidney Int*. 68: 653–664.
- [74] Akbarzadeh M, Maroufi NF, Tazehkand AP, Akbarzadeh M, Bastani S, Safdari R, Farzane A, Fattahi A, Nejabati HR, Nouri M, Samadi N (2019) Current approaches in identification and isolation of cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 234: 14759–14772.
- [75] Okamoto K, Saito Y, Narumi K, Furugen A, Iseki K, Kobayashi M (2020) Different mechanisms of cisplatin resistance development in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 530: 745–750.
- [76] Guo F, Xu L, Gao S, Sun X, Zhang N, Gong Y (2019) Effect of orexin-A in the arcuate nucleus on cisplatin-induced gastric side effects in rats. *Neurosci Res*. 143: 53–60.
- [77] Huang R, Jiang L, Cao Y, Liu H, Ping M, Li W, Xu Y, Ning J, Chen Y, Wang X (2019) Comparative Efficacy of Therapeutics for Chronic Cancer Pain: A Bayesian Network Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 37: 1742–1752.
- [78] Perše M, Večerić-Haler Ž (2018) Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Biomed Res Int*. 2018: 1462802.
- [79] Zhang Z, Burnley P, Coder B, Su D-M (2012) Insights on FoxN1 biological significance and usages of the “nude” mouse in studies of T-lymphopoiesis. *Int J Biol Sci*. 8: 1156–1167.

謝辞

本研究は日本学術振興会科研費 JP19J11051 の助成、ならびに日本薬学会長井記念薬学研究奨励金による支援を受け実施されました。

本研究の遂行ならびに学位論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の副査として、ご審査ならびにご指導を受け賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室 菅原 満 教授、同大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室 武田 宏司 教授、ならびに北海道医療大学薬学部 井関 健 教授に深く感謝致します。

本研究にあたり、多くの有益なご助言、ご指導をいただきました北海道科学大学薬学部薬学科臨床薬学部門薬物治療学分野 山田 武宏 教授、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海 克哉 助教、ならびに 古堅 彩子 助教に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くの有益なご助言、ご指導をいただくとともに、学士課程在籍時から多大な協力をいただきました北海道大学病院薬剤部 齋藤 佳敬 博士に深く感謝致します。

学士課程在籍時にご指導を受け賜り、現在の礎を築いて頂いた山形大学大学院医学系研究科創薬科学講座／山形大学医学部附属病院薬剤部 山口 浩明 教授、ならびに 小倉 次郎 准教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、ご協力を頂いた 上田 一奈太 氏、北市 楓美 氏をはじめ、北海道大学薬学部臨床薬剤学研究室での研究室生活を共に過ごした学生一同に謹んで感謝申し上げます。

最後に、10年間に渡る北海道大学での生活を応援してくれた家族に心から感謝申し上げます。

2021年3月
岡本 敬介