

食道がん化学療法個別化を考慮した
新規治療戦略構築を目指した基礎的研究

2015 年

峯垣 哲也

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。

- 1) Tetsuya Minegaki, Kohji Takara, Ryohei Hamaguchi, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi: Factors affecting the sensitivity of human-derived esophageal carcinoma cell lines to 5-fluorouracil and cisplatin. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013). [第 1 章]
- 2) Tetsuya Minegaki, Akiko Kuwahara, Motohiro Yamamori, Tsutomu Nakamura, Tatsuya Okuno, Ikuya Miki, Hideaki Omatsu, Takao Tamura, Midori Hirai, Takeshi Azuma, Toshiyuki Sakaeda, Kohshi Nishiguchi: Genetic polymorphisms in SLC23A2 as predictive biomarkers of severe acute toxicities after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci*, **11**, 321-326 (2014). [第 2 章]
- 3) Tetsuya Minegaki, Saori Fukushima, Chihiro Morioka, Hitomi Takanashi, Junki Uno, Shiori Tsuji, Satoshi Yamamoto, Airi Watanabe, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi: Effects of bisphosphonates on human esophageal squamous cell carcinoma cell survival. *Dis Esophagus* (2015). “in press” [第 3 章]

目次

序論.....	1
第1章 ヒト食道がん細胞株における 5-FU 及び CDDP 感受性を規定する因子の探索	
第1節 緒言.....	2
第2節 材料及び方法.....	3
1) 試薬.....	3
2) 細胞及び細胞培養法.....	3
3) 細胞増殖性.....	3
4) 細胞毒性実験.....	3
5) リアルタイム RT-PCR.....	4
6) 統計学的処理.....	4
第3節 結果.....	6
1) ヒト食道がん細胞株の増殖速度.....	6
2) ヒト食道がん細胞株の 5-FU 及び CDDP 感受性.....	6
3) 各種因子の mRNA 発現量と 5-FU あるいは CDDP 感受性との関係.....	7
4) 5-FU 及び CDDP 感受性に及ぼすギメラシル並びに MK571 の影響.....	11
第4節 考察.....	12
第5節 小括.....	14
第2章 食道がん化学放射線療法施行患者における SLC23A2 の遺伝子多型と治療効果の関連	
第1節 緒言.....	16
第2節 材料及び方法.....	17
1) 倫理指針.....	17
2) 対象患者.....	17
3) プロトコル.....	17
4) SNPs の選択.....	17
5) 遺伝子型の判定.....	18
6) 副作用の評価.....	18
7) 完全奏効の判定.....	18
8) 生存期間.....	18
9) データ解析及び統計学的処理.....	19
第3節 結果.....	20
1) 患者背景.....	20
2) CR 率と SNPs との関連性.....	20

3) 長期予後と SNPs との関連性.....	21
4) 重篤な副作用と SNPs との関連性.....	22
第4節 考察.....	23
第5節 小括.....	25
第3章 ヒト食道がん細胞株に対するビスホスホネート系薬物の増殖抑制効果	
第1節 緒言.....	26
第2節 材料及び方法.....	27
1) 試薬.....	27
2) 細胞.....	27
3) 細胞毒性実験.....	27
4) Caspase-3/7 活性の測定.....	27
5) アネキシン Vによるアポトーシスの検出.....	27
6) 細胞周期の測定.....	28
7) Western blot 法.....	28
8) 統計学的処理.....	28
第3節 結果.....	29
1) ヒト食道がん細胞株の増殖に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響.....	29
2) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物によるアポトーシス誘導.....	31
3) KYSE150 細胞における細胞周期に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響.....	32
4) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物による Cyclin D1 タンパク質発現量への影響.....	33
5) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物の 細胞増殖抑制作用に及ぼすメバロン酸経路関連物質の影響.....	34
第4節 考察.....	35
第5節 小括.....	37
総括.....	38
謝辞.....	41
引用文献.....	42

略語表

5-FU	: 5-fluorouracil
ALE	: alendronate
AZT	: 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine
BP	: bisphosphonate
CDDP	: cisplatin
CR	: complete response
D-MEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DPYD	: dihydropyrimidine dehydrogenase
ERK	: extracellular regulated MAP kinase
ETI	: etidronate
FBS	: fetal bovine serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
FOH	: farnesol
FPP	: farnesyl pyrophosphate
GGOH	: geranylgeraniol
GGPP	: geranylgeranyl pyrophosphate
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
mTOR	: mammalian target of rapamycin
N-BP	: nitrogen-containing bisphosphonate
PAM	: pamidronate
PBS	: phosphate buffered saline
PI	: propidium iodide
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RIS	: risedronate
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SNP	: single nucleotide polymorphism
SQ	: squalene
WST-1	: 2-(4-Indophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
ZOL	: zoledronate

序 論

がんは、1981年から本邦における死亡原因の第1位である。2012年には、全死亡者数の3分の1にあたる約36万人ががんで死亡している。なかでも、食道がんは世界的に死亡率の高いがんの一つであり [1]、本邦においては毎年約1万人が食道がんで死亡している [2]。死亡率の高い理由は、初期の自覚症状が乏しく、診断時には既に進行していることが多いためである [3]。

食道がんは、組織学的に扁平上皮がんまたは腺がんの2種類に大別でき、徐々に腺がんの割合が増えつつあるものの、アジア圏では扁平上皮がんが大半を占めている。食道がんの治療は、他の固形がんと同様に外科的切除、抗がん剤を用いたがん化学療法及び放射線療法が単独もしくは組み合わせて行われる。特にがん化学療法は、術前、術後及び再発時など幅広いタイミングで用いられており、その有効性は治療成績を大きく左右する。例えば、同じ消化器がんである大腸がんでは化学療法の進歩が目覚ましく、大腸がんと診断された後の5年生存率は約70%とその治療成績は飛躍的に向上している [2]。しかしながら、食道がん診断後の5年生存率は約35%と低値で治療成績は未だ十分とは言い難い。

この低い治療成績の要因として、食道がん化学療法では薬剤の有効性及び骨髄毒性及び消化器毒性などの副作用の個人差が大きい上、使用できる薬剤も少ないことが挙げられる。食道がんに対するがん化学療法の有効性及び副作用のリスクを事前に予測するための研究が精力的に行われている [4, 5] もの、未だ臨床応用に至っているものは存在しない。また、食道がん化学療法には5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を除き、コンセンサスが十分に得られている薬剤はほとんど存在しない [6]。さらに、Song ら [7] は、5-FU 及び CDDP を含む一次療法に有効性が認められなかった進行食道がん患者では、5-FU 及び CDDP 以外でほとんど唯一コンセンサスが得られているドセタキセルを含む二次治療の有効性も低いことを報告している。すなわち、5-FU 及び CDDP が無効の食道がん患者では、未だ有用な治療法が存在していないことになる。したがって、食道がんの治療成績向上のためには、食道がん化学療法における有効性及び安全性の個人差の要因を明らかにするとともに、食道がんに対して有効な新たな治療薬を見つける必要がある。

そこで本研究では、食道がん化学療法における個人差を考慮した治療戦略構築を目的として5-FU 及び CDDP を用いた食道がん化学療法による治療効果の事前予測に有用な指標を探索するとともに、食道がん化学療法の有効性向上を目指したビスホスホネート系薬物 (BPs) の有用性について検討した。

第1章 ヒト食道がん細胞株における 5-FU 及び CDDP 感受性を規定する因子の探索

第1節 緒言

食道がん治療において、5-FU 及び CDDP を用いたがん化学療法が広く施行されているものの、未だ治療成績は不十分である。その要因として、このがん化学療法は有効性の個人差が大きく、なかには全く効果を示さない患者も存在することが挙げられる [8]。この個人差が生じる要因の一つとして、腫瘍組織を構成するがん細胞自身の抗がん剤感受性の相違が考えられる。すなわち、食道がん細胞において 5-FU と CDDP に対する感受性を規定する因子を明らかにすることは、食道がん化学療法の治療成績を向上させる上で非常に重要である。

5-FU 及び CDDP の感受性に影響を及ぼす要因については、過去にいくつか報告がなされている。例えば、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞における異物排泄トランスポーターである *ABCC5* タンパク質の過剰発現が、5-FU の細胞内蓄積量を減少させ、それにより 5-FU に対する耐性を引き起こすことが報告されている [9]。また、5-FU の代謝酵素であるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (*DPYD*) の mRNA 又はタンパク質発現量は、5-FU を含むがん化学療法を行っている大腸がん患者の治療成績と負の相関性を示すことも報告されている [10, 11]。一方、CDDP の感受性は、DNA 修復関連タンパク質である *ERCC1* の増大によって低下することが知られている [12-14]。このように、5-FU 及び CDDP の感受性に影響する因子は食道がん以外のがん種においていくつか報告されているものの、これら因子が食道がんに対する 5-FU 及び CDDP の感受性を予測し得るバイオマーカーとなるかどうかについては、ほとんど明らかにされていない。

そこで今回、薬物トランスポーター、DNA 修復関連タンパク質並びに代謝酵素を含む 35 種類の機能性タンパク質に着目し、5 種類のヒト食道がん細胞株におけるこれら 35 種類の mRNA 発現量と、細胞の 5-FU または CDDP 感受性との関連性について検討を行った。

第2節 材料及び方法

1) 試薬

5-FU は Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より、CDDP は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。ギメラシル及び MK571 は、それぞれ Tronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, ON, Canada) 及び Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) より購入したものをを用いた。また、細胞生存率の測定に用いた 2-(4-インドフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩 (WST-1) と 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウム メチル硫酸塩は、いずれも株式会社 同仁化学研究所 (熊本) より購入した。

2) 細胞及び細胞培養法

ヒト食道腺がん由来細胞株 OE33 細胞は、DS ファーマバイオメディカル株式会社 (大阪) より購入し、RPMI-1690 培養液 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて培養した。また、ヒト食道扁平上皮がん由来細胞株 KYSE30、KYSE70、KYSE140 及び KYSE150 細胞 [15] は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪) より購入し、培養には Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Life Technologies) を用いた。なお、細胞の培養液にはウシ胎仔血清 (FBS, lot no. 133570 及び 348777, Life Technologies) を終濃度 10% となるように加えた。細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下で 25 cm² 培養フラスコに培養を行い、3 または 4 日ごとに常法に従い継代した。

3) 細胞増殖性

細胞増殖速度の測定は、WST-1 法を用いた。細胞を 96 ウェルプレート (Corning, Corning, NY, USA) に 5×10^3 cells/well/100 μ L の密度で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 0、6、12、18、24、36、48、72 及び 96 時間培養を行った。それぞれの時間培養した後、細胞培養液を 110 μ L の WST-1 溶液含有培養液 (WST-1 溶液 10 μ L + 培養液 100 μ L) に交換し、3 時間反応させた。反応後各ウェルの吸光度 (吸光波長 450 nm、参照波長 620 nm) を、マイクロプレートリーダー (SpectraFluor™, Tecan, Seestrasse, Switzerland) を用いて測定し、細胞数を算出した。また、細胞増殖曲線は、0 時間の細胞数を 100% として作成し、細胞の倍加時間は、以下の式から算出した [16]。

$$\text{倍加時間} = \frac{(t_1 - t_0) \log 2}{\log N_1 - \log N_0}$$

ここで N_0 及び N_1 は、それぞれ時間 t_0 及び t_1 における細胞数 (% of 0 h) を示している。

4) 細胞毒性実験

細胞を 96 ウェルプレート (Corning) に 5×10^3 cells/well/100 μ L の密度で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、細胞培養液を吸引し、5-FU または CDDP 含有培養液を添加し、72 時間培養後の細胞数を WST-1 法により測定した。

5-FU 及び CDDP の細胞増殖抑制作用に及ぼすギメラシル及び MK571 の影響は、上記と同様に細胞播種 24 時間後に、ギメラシル (100 μ M) または MK571 (50 μ M) を添加した 5-FU または CDDP 含有培養液を細胞に処置した。72 時間培養後、WST-1 法を用いて細胞数を測定した。

50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出には Microsoft® Excel のソルバー機能を用い、次式から算出した [17]。

$$E = E_{\max} \times \frac{1 - C^{\gamma}}{C^{\gamma} + IC_{50}^{\gamma}}$$

なお、E 及び E_{max} はそれぞれ細胞生存率 (% of control) 及び最大細胞生存率を示し、C 及び γ はそれぞれ細胞培養液中の薬物濃度及びシグモイド係数を示している。

5) リアルタイム RT-PCR

各細胞を 2×10⁶ cells/dish の密度で 60 mm 培養皿 (旭硝子, 東京) に播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養後、全 RNA を GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich) を用い、プロトコルに従って抽出した。全 RNA (1 µg) は、PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ, 滋賀) 及びサーマルサイクラー (i-Cycler®, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて逆転写を行った。逆転写反応は、40 µL の反応溶液を用い、37°C で 15 分、85°C で 5 秒、次いで 4°C の条件で行った。

リアルタイム PCR には、7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) と SYBR® Premix EX Taq™ (タカラバイオ) を用いた。PCR 反応条件は、95°C で 10 秒の初期変性後、95°C で 5 秒、60°C で 34 秒の伸長反応を 40 サイクル行った。また、伸長反応後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分、95°C で 15 秒の融解曲線分析を行い、PCR 産物を確認した。なお、PCR 反応時に用いたプライマー配列は、Table 1-1 に示す。内標準遺伝子として ACTB を用い、目的遺伝子の mRNA 発現量は 2^{-ΔCt} 値として表した。

6) 統計学的処理

得られた実験値は、全て平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。また、相関解析は、Pearson's correlation coefficient (r) を用いて評価した。

Table 1-1. Sequences of oligonucleotide primers designed for real-time PCR

Function and gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Reference
<i>ACTB</i>	TCATGAAGTGTGACGTGGACATC	TGCATCCTGTCTGGCAATG	16
Transport			
<i>SLC22A1</i>	TCTTCCATCGTCACTGAGTTCAAC	AGAAGCCCGCATTCAAACAG	16
<i>SLC22A2</i>	TCTACTCTGCCCTGGTTGAATTC	ATGCAGCCCAAGGGTAACG	16
<i>SLC22A3</i>	TAGCCCCATTTCTGCTCTTTC	AGATGGATGCCAGGATACCAA	16
<i>SLC23A2</i>	TCTTTGTGCTTGGATTTTCGAT	ACGTTCAACACTTGATCGATTCT	29
<i>SLC31A1</i>	ACAAGTCAGCATTGCTACAATTC	TTGCAGGAGGTGAGGAAAGC	16
<i>ABCB1</i>	TTCTTCACCCAGGCAATG	ATGAGTTTATGTGCCACCAAGTAG	a
<i>ABCC1</i>	CAGTGACCTCTGGTCCTTAAACAA	TTGGCGCATTCTTCTTCC	30
<i>ABCC2</i>	ACTTGTGACATCGGTAGCATGGA	AAGAGGCAGTTTGTGAGGGATGA	a
<i>ABCC3</i>	GTCCGCAGAATGGACTTGAT	TCACCACCTGGGGATCATT	31
<i>ABCC4</i>	GCTCAGTTGCCTATGTGCT	CGGTTACATTTCTCCTCCA	31
<i>ABCC5</i>	CGAAGGGTTGTGTGGATCTT	GTTTCACCATGAAGGCTGGT	a
<i>ABCC6</i>	TGTCGCTCTTTGGAAAATCC	AGGAACACTGCGAAGCTCAT	31
<i>ABCG2</i>	TGACGGTGAGAGAAAACCTTAC	TGCCACTTTATCCAGACCT	32
<i>ATP7A</i>	AGATACTGGGACACTGGAGAAA	AGGTCATCCCTTCCACTTTCA	16
<i>ATP7B</i>	TGATTTATAACCTGGTTGGGATACC	ATGAGAGCACCACAGACACAGA	16
DNA repair			
<i>ERCC1</i>	TACAAGGCCTATGAGCAGAAACCA	TCTCTTGATGCGGGCGATGAG	a
<i>ERCC2</i>	CTGGAGGTGACCAAACCTCATCTA	CCTGCTTCTCATAGAAGTTGAGC	33
<i>ERCC3</i>	TATCCCAGGACACACAGGAAAT	TCACCTTGAAGCTATAACCTTGA	a
<i>XPA</i>	TGCGGCGAGCAGTAAGAAG	TCATGGCCACACATAGTACAAGTC	a
<i>RAD51</i>	TGGGAACTGCAACTCATCTGG	GCGCTCCTCTCTCCAGCAG	34
<i>BRCA1</i>	ACAGCTGTGTGGTGTCTTCTGTG	CATTGTCTCTGTCCAGGCATC	35
<i>BRCA2</i>	TGAAGAGCAGTTAAGAGCCTTGAA	ACGGTTGTGACATCCCTTGATAAA	a
<i>HMGB1</i>	CAAGCGAACAGCAGGGTTAG	CAGATTGAGTCATTTGCTCCTCTTA	a
<i>HMGB2</i>	TGAACATCGCCCAAAGATCA	TCAGACCACATTTACCCAATT	a
<i>MLH1</i>	GATTACCCCTTCTGATTGACA	ACTGAGGCTTTCAAACA	36
<i>MSH2</i>	CAGTATATTGGAGAATCGCA	AGGGCATTGTTTACC	36
<i>PMS2</i>	AGTCAGCGTGACAGATTATT	GACCATTTGGCATACTCCTTCT	a
<i>RPP25</i>	AGAATGGTGGACAGTGGGATT	TACTTCAGGTGCTCTTCGTGAATG	a
Metabolism			
<i>GSTP1</i>	CTGCGCATGCTGCTGGCAGATC	TTGACTGGTACAGGGTGAGGTC	37
<i>GCLC</i>	GGCAAGATACCTTTATGACCAGTT	TGCAGCACTCAAAGCCATAA	38
<i>GCLM</i>	TGACTGCATTTGCTAAACAATTTGA	CGTGCGCTTGAATGTCAGG	39
<i>TYMS</i>	GCCTCGGTGTGCCTTTCA	CCCGTGATGTGCGCAAT	40
<i>DPYD</i>	AATGATTCGAAGAGCTTTTGAAGC	GTTCCCCGGATGATTCTGG	41
<i>UMPS</i>	TAGTGTTTTGGAACTGTTGAGGTT	CTTGCCCTCCCTGCTCTCTGT	42
<i>MTHFR</i>	CGGGTTAATTACCACCTTGTCAA	GCATTGGCTGCAGTTCA	42

a, Primer sequences were designed using Primer Express® software. *ACTB* was used as internal standard. Cited from Table 1 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013)".

第3節 結果

1) ヒト食道がん細胞株の増殖速度

5種類のヒト食道がん細胞株において、細胞の倍加時間は20から25時間と細胞ごとに若干の相違が認められた。倍加時間は、KYSE30細胞が 20.1 ± 1.41 時間と最も短く、OE33細胞が 25.0 ± 0.90 時間と最も長かった (Table 1-2)。

Table 1-2. Doubling times of esophageal carcinoma cell lines

Cell line	Doubling time (h)
OE33	25.0 ± 0.90
KYSE30	20.1 ± 1.41
KYSE70	21.8 ± 0.51
KYSE140	23.3 ± 1.07
KYSE150	20.6 ± 0.53

Each doubling time represents the mean \pm SD (n = 6).

Cited from Table 2 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013)".

2) ヒト食道がん細胞株の5-FU及びCDDP感受性

5-FUの IC_{50} 値は、ヒト食道がん細胞株間で大きく相違し (0.524 - $30.2 \mu\text{M}$)、CDDPにおいても同様であった (2.17 - $19.5 \mu\text{M}$)。また、いずれの薬物においても、OE33細胞の IC_{50} 値は最も低値であり、KYSE30細胞の IC_{50} 値は最も高値を示した (Table 1-3)。

Table 1-3. IC_{50} values for 5-FU and CDDP in esophageal carcinoma cell lines

Cell line	IC_{50} value (μM)	
	5-FU	CDDP
OE33	0.524 ± 0.08	2.17 ± 0.33
KYSE30	30.2 ± 8.29	19.5 ± 3.67
KYSE70	13.1 ± 13.3	5.27 ± 0.36
KYSE140	1.88 ± 0.38	3.09 ± 0.67
KYSE150	4.75 ± 1.46	14.0 ± 1.02

Each value represents the mean \pm SD (n = 4).

Cited from Table 3 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013)".

3) 各種因子の mRNA 発現量と 5-FU あるいは CDDP 感受性との関係

薬物輸送、DNA 修復並びに薬物代謝に関わる各遺伝子の mRNA 発現量は、細胞間で顕著に相違していた。有機カチオントランスポーター (OCT) 3 をコードする *SLC22A3* mRNA は、OE33 細胞でのみ発現が認められた。また、KYSE30 及び KYSE70 細胞においては、多剤耐性関連タンパク質 (MRP) 6 をコードする *ABCC6* mRNA 発現が認められなかった (Table 1-4)。

Table 1-4. Expression levels of mRNA in esophageal carcinoma cell lines

Function and gene	Expression ratio ($2^{-\Delta Ct} \times 10^{-4}$)				
	OE33	KYSE30	KYSE70	KYSE140	KYSE150
Transport					
<i>SLC22A1</i>	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.01 ± 0.003	0.03 ± 0.02	0.12 ± 0.07
<i>SLC22A2</i>	0.49 ± 0.15	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.87 ± 0.45	0.47 ± 0.36
<i>SLC22A3</i>	36.3 ± 9.24	ND	ND	ND	ND
<i>SLC23A2</i>	76.1 ± 13.8	36.6 ± 6.39	59.8 ± 4.66	61.1 ± 43.8	92.9 ± 64.0
<i>SLC31A1</i>	125 ± 26.6	131 ± 10	179 ± 23.4	252 ± 135	244 ± 147
<i>ABCB1</i>	0.53 ± 0.14	0.160 ± 0.027	0.25 ± 0.06	0.54 ± 0.20	0.79 ± 0.59
<i>ABCC1</i>	74.7 ± 11.3	37.0 ± 3.8	246 ± 32.9	123 ± 75.6	67.8 ± 36.6
<i>ABCC2</i>	0.05 ± 0.01	2.57 ± 0.89	1.36 ± 0.07	0.38 ± 0.16	0.38 ± 0.23
<i>ABCC3</i>	80.5 ± 15.1	10.2 ± 2.6	60.7 ± 8.62	40.6 ± 23.3	123 ± 86.7
<i>ABCC4</i>	26.1 ± 2.17	28.9 ± 2.0	52.1 ± 5.53	189 ± 105	92.5 ± 51.3
<i>ABCC5</i>	9.06 ± 1.30	62.1 ± 17	65.38 ± 8.60	22.92 ± 10.6	26.76 ± 19.2
<i>ABCC6</i>	1.79 ± 0.12	ND	ND	0.05 ± 0.05	0.04 ± 0.04
<i>ABCG2</i>	6.25 ± 1.29	4.64 ± 0.21	1.66 ± 0.34	2.47 ± 0.69	33.1 ± 18.3
<i>ATP7A</i>	8.66 ± 1.27	7.99 ± 0.70	4.68 ± 1.20	6.09 ± 3.61	15.4 ± 7.98
<i>ATP7B</i>	1.91 ± 0.25	1.89 ± 0.73	2.21 ± 0.47	5.72 ± 4.77	3.37 ± 2.69
DNA repair					
<i>ERCC1</i>	219 ± 66.1	143 ± 36	96.3 ± 13.2	241 ± 131	296 ± 175
<i>ERCC2</i>	43.9 ± 4.57	35.1 ± 8.0	21.0 ± 2.52	47.9 ± 22.4	52.2 ± 22.6
<i>ERCC3</i>	82.3 ± 11.5	79.3 ± 19	57.4 ± 6.31	134 ± 97.9	185 ± 104
<i>XPA</i>	91.4 ± 16.0	107 ± 17	193 ± 14.8	461 ± 290	283 ± 164
<i>Rad51</i>	3.84 ± 1.03	2.64 ± 0.37	3.67 ± 1.09	6.09 ± 3.07	4.72 ± 1.75
<i>BRCA1</i>	90.5 ± 15.6	61.1 ± 2.5	65.3 ± 4.56	188 ± 116	151 ± 78.8
<i>BRCA2</i>	110 ± 20.4	111 ± 4.0	43.5 ± 3.74	261 ± 165	204 ± 108
<i>HMGB1</i>	35.2 ± 7.29	35.9 ± 1.8	51.4 ± 3.98	79.9 ± 47.8	37.6 ± 19.1
<i>HMGB2</i>	509 ± 87.3	1340 ± 150	1343 ± 129	1980 ± 947	1367 ± 679
<i>MLH1</i>	27.5 ± 4.55	21.3 ± 1.6	23.9 ± 1.83	28.2 ± 18.4	70.9 ± 36.8
<i>MSH2</i>	185 ± 39.8	540 ± 39	331 ± 23.5	338 ± 154	272 ± 114
<i>PMS2</i>	25.3 ± 3.22	34.2 ± 4.2	77.1 ± 12.8	123 ± 81.6	67.0 ± 42.8
<i>RPP25</i>	27.5 ± 4.35	6.32 ± 0.99	0.13 ± 0.03	74.9 ± 59.9	0.744 ± 0.47
Metabolism					
<i>GSTP1</i>	2444 ± 425	2926 ± 644	3421 ± 380	5784 ± 3549	7249 ± 3978
<i>GCLC</i>	5.21 ± 0.51	3.87 ± 1.2	45.0 ± 4.30	10.8 ± 4.41	9.05 ± 5.39
<i>GCLM</i>	8.38 ± 2.61	31.3 ± 4.3	75.1 ± 10.8	33.0 ± 15.4	32.1 ± 22.2
<i>TYMS</i>	54.0 ± 11.6	163 ± 3.1	2511 ± 136	81.8 ± 32.9	216 ± 102
<i>DPYD</i>	5.81 ± 2.03	62.4 ± 6.5	0.82 ± 0.29	1.23 ± 0.87	12.4 ± 9.82
<i>UMPS</i>	85.6 ± 17.4	69.0 ± 3.9	162 ± 20.6	183 ± 108	165 ± 73.2
<i>MTHFR</i>	5.78 ± 1.85	10.0 ± 2.4	18.6 ± 2.72	25.6 ± 23.2	23.7 ± 15.3

ND, not detected. $\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(CTB)$. n = 3.

Cited from Table 4 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, 5, 427-434 (2013)".

5種類の食道がん細胞株における OCT2 をコードする *SLC22A2*、ビタミン C トランスポーター *SVCT2* をコードする *SLC23A2*、P 糖タンパク質をコードする *ABCB1* 及び DNA 修復タンパク質 Rad51 をコードする *RAD51* の mRNA 発現量は、それぞれ 5-FU の IC_{50} 値と強い負の相関関係 ($r < -0.7$) を示した。また、MRP2 をコードする *ABCC2*、DNA ミスマッチ修復に関わるタンパク質をコードする *MSH2* 並びに 5-FU の代謝に関わる *DPYD* の mRNA 発現量は、それぞれ 5-FU の IC_{50} 値と強い正の相関関係 ($r > 0.7$) を示した (Table 1-5, Figure 1-1)。

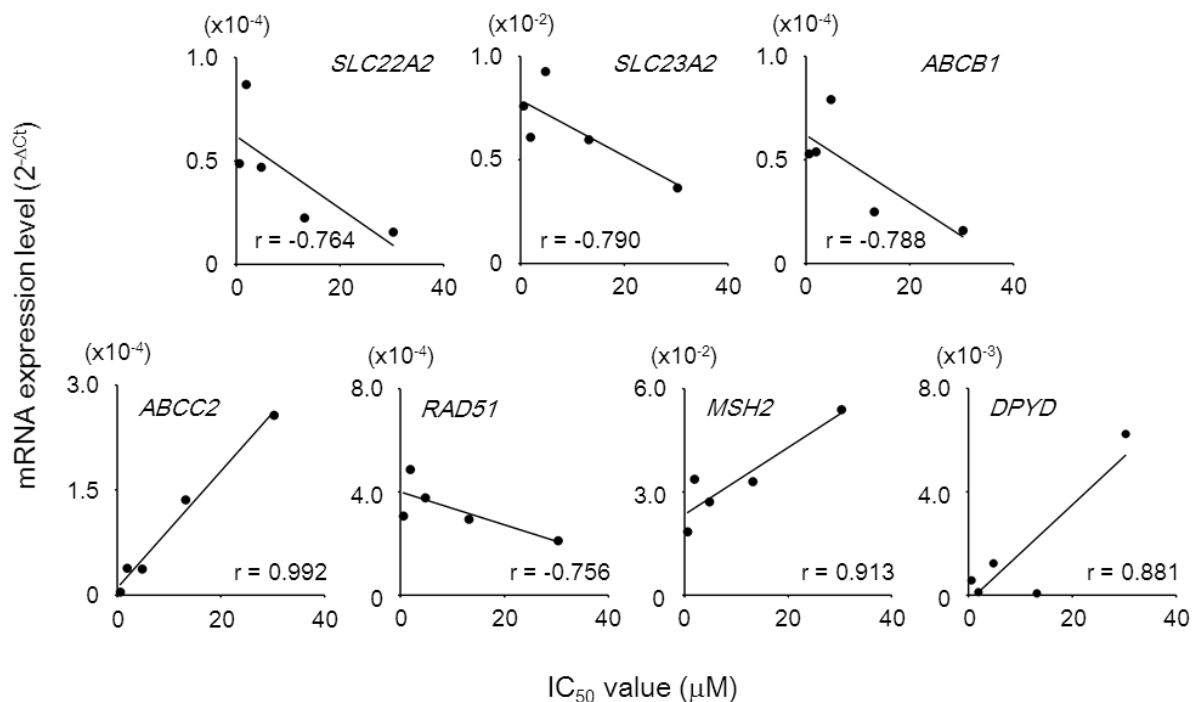


Figure 1-1. Relationship between IC_{50} values for 5-FU and mRNA expression levels in the esophageal carcinoma cell lines

The IC_{50} values for 5-FU were obtained from growth inhibition studies (Table 1-3). The mRNA expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) in the cells were evaluated by real-time RT-PCR assay using SYBR® Green. The threshold cycle (Ct) values were used to quantify the PCR product, and the relative expression level of the target gene was expressed as $2^{-\Delta Ct}$. The ΔCt was calculated by subtracting Ct (*ACTB*; as an internal standard) from Ct (target gene).

Cited from Figure 1 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, 5, 427-434 (2013)".

一方、CDDP の IC_{50} 値は、*ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* mRNA 発現量とそれぞれ強い正の相関関係 ($r > 0.7$) を認めた (Table 1-5, Figure 1-2)。

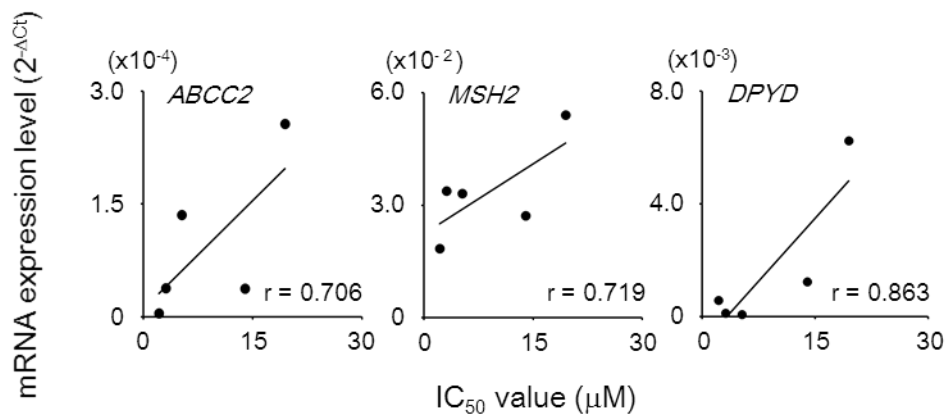


Figure 1-2. Relationship between the IC_{50} values for CDDP and mRNA expression levels in the esophageal carcinoma cell lines

The IC_{50} values for CDDP were obtained from growth inhibition studies (Table 1-3). The mRNA expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) in the cells were evaluated by real-time RT-PCR assay using SYBR® Green. The threshold cycle (Ct) values were used to quantify the PCR product, and the relative expression level of the target gene was expressed as $2^{-\Delta Ct}$. ΔCt was calculated by subtracting Ct (*ACTB*; as an internal standard) from Ct (target gene).

Cited from Figure 2 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, 5, 427-434 (2013)".

Table 1-5. Pearson's correlation coefficient between IC₅₀ values for 5-FU or CDDP and mRNA expression level

Function and gene	Pearson's correlation coefficient (r)	
	5-FU	CDDP
Transport		
<i>SLC22A1</i>	-0.189	0.333
<i>SLC22A2</i>	-0.764	-0.574
<i>SLC22A3</i>	ND	ND
<i>SLC23A2</i>	-0.790	-0.302
<i>SLC31A1</i>	-0.477	-0.132
<i>ABCB1</i>	-0.788	-0.215
<i>ABCC1</i>	-0.150	-0.530
<i>ABCC2</i>	0.992 ^b	0.706
<i>ABCC3</i>	-0.659	-0.179
<i>ABCC4</i>	-0.470	-0.315
<i>ABCC5</i>	0.573	0.234
<i>ABCC6</i>	ND	ND
<i>ABCG2</i>	-0.244	0.398
<i>ATP7A</i>	-0.199	0.451
<i>ATP7B</i>	-0.485	-0.314
DNA repair		
<i>ERCC1</i>	-0.638	-0.041
<i>ERCC2</i>	-0.533	0.019
<i>ERCC3</i>	-0.439	0.187
<i>XPA</i>	-0.463	-0.284
<i>Rad51</i>	-0.756	-0.523
<i>BRCA1</i>	-0.653	-0.274
<i>BRCA2</i>	-0.455	-0.049
<i>HMGB1</i>	-0.341	-0.507
<i>HMGB2</i>	0.010	0.125
<i>MLH1</i>	-0.369	-0.269
<i>MSH2</i>	0.913 ^a	0.719
<i>PMS2</i>	-0.363	-0.365
<i>RPP25</i>	-0.486	-0.561
Metabolism		
<i>GSTP1</i>	-0.401	0.121
<i>GCLC</i>	0.032	-0.321
<i>GCLM</i>	0.287	-0.011
<i>TYMS</i>	0.163	-0.211
<i>DPYD</i>	0.881	0.863
<i>UMPS</i>	-0.522	-0.379
<i>MTHFR</i>	-0.319	-0.074

ND, not detected. ^ap<0.05 and ^bp<0.01 significant correlations between IC₅₀ values and mRNA expression levels.

Cited from Table 5 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, 5, 427-434 (2013)".

4) 5-FU 及び CDDP 感受性に及ぼすギメラシル並びに MK571 の影響

KYSE30 細胞の 5-FU 感受性は、ギメラシルの同時処置によって約 2.3 倍増強した。しかしながら、ギメラシルの同時処置は、他の細胞の 5-FU 感受性に影響を及ぼさなかった。また、CDDP の感受性は、ギメラシルの同時処置により全ての細胞で 30-40% 程度の減弱が認められた (Table 1-6)。

Table 1-6. Relative sensitivity of the esophageal carcinoma cell lines to 5-FU or CDDP with or without gimeracil

Cell line	Relative sensitivity (fold)	
	5-FU	CDDP
OE33	1.10 ± 0.37	0.579 ± 0.06
KYSE30	2.30 ± 0.13	0.710 ± 0.03
KYSE70	1.16 ± 0.19	0.687 ± 0.05
KYSE140	0.989 ± 0.15	0.691 ± 0.10
KYSE150	1.19 ± 0.16	0.788 ± 0.25

Relative sensitivity, the ratio of IC₅₀ value for 5-FU or CDDP without gimeracil to those with gimeracil (100 μM). Each value represents the mean ± SD (n = 4).

Cited from Table 6 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013)".

MK571 の共存は、OE33 細胞及び KYSE150 細胞の 5-FU 感受性を減弱させた。また、KYSE70 及び KYSE140 細胞における CDDP の感受性は、MK571 の共存により減弱する傾向が認められた (Table 1-7)。

Table 1-7. Relative sensitivity of the esophageal carcinoma cell lines to 5-FU or CDDP with or without MK571

Cell line	Relative sensitivity (fold)	
	5-FU	CDDP
OE33	0.0680 ± 0.01	0.852 ± 0.28
KYSE30	0.961 ± 0.06	0.974 ± 0.09
KYSE70	2.36 ± 1.36	0.617 ± 0.06
KYSE140	0.813 ± 0.16	0.803 ± 0.04
KYSE150	0.731 ± 0.11	1.08 ± 0.26

Relative sensitivity, the ratio of IC₅₀ value for 5-FU or CDDP without MK571 to those with MK571 (50 μM). Each value represents the mean ± SD (n = 4).

Cited from Table 7 of "Minegaki et al. *Oncol Lett*, **5**, 427-434 (2013)".

第4節 考察

食道がんは、組織学的に扁平上皮がんと腺がんの2種に大別される。本邦を含む東アジア地域では食道がんの約90%が扁平上皮がんとなっており、喫煙、アルコール摂取などがリスク因子として知られている。一方、腺がんは、本邦における割合は数%と少ないものの欧米では食道がんの約半数を占めており、肥満や胃食道逆流症に伴うバレット食道などがリスク因子とされている[8]。いずれの組織型においても、5-FU及びCDDPは食道がんに対する最もコンセンサスの得られている薬剤の一つである [8, 18]。本研究では、ヒト食道がん由来細胞株として扁平上皮がん及び腺がん由来細胞株をそれぞれ4及び1種類選択し実験に用いた。

5種類のヒト食道がん細胞株の5-FU及びCDDP感受性は、細胞間で大きな相違が認められた (Table 1-3)。なかでも、OE33細胞の感受性は最も高く、KYSE30細胞の感受性は最も低かった。また、細胞の倍加時間は細胞間で若干の相違が認められたものの全ての細胞株で約20-25時間であり (Table 1-2)、抗がん剤感受性ほどの大きな相違は認められなかった。したがって、倍加時間のみでは感受性の相違は説明できず他の何らかの感受性規定因子の存在が示唆された。

検討した5種類の食道がん細胞株において、5-FUの IC_{50} 値は、*ABCC2*、*MSH2*、*DPYD*のmRNA発現量とそれぞれ正の相関関係 ($r > 0.7$) を有していた (Fig. 1-1, Table 1-5)。*ABCC2*及び*DPYD*は、それぞれ薬物排出トランスポーター及び5-FUの代謝酵素をコードしている遺伝子であるため、これらmRNA発現量の増大が5-FU感受性を減弱させている可能性が考えられる。一方で、DNAの修復に関わる*MSH2*は、ヒト大腸がん由来細胞株であるSW420細胞並びにヒト子宮頸がん由来細胞株であるHeLa細胞において、siRNAによるノックダウンが5-FUの感受性に影響を及ぼさないことが報告されている [19] ため、5-FU感受性と直接的に関連している可能性は低いと考えられる。

5-FUの IC_{50} 値は、*SLC22A2*、*SLC23A2*、*ABCB1*、*RAD51*のmRNA発現量とそれぞれ負の相関関係 ($r < -0.7$) を認めた (Fig. 1-1, Table 1-5)。*SLC22A2*は薬物の細胞内取り込みに関与している有機カチオントランスポーターをコードする遺伝子であり [20, 21]、*SLC23A2*はビタミンCを細胞内に取り込むトランスポーターSVCT2をコードする遺伝子であるため、これらmRNA発現量の増大が5-FUの細胞内取り込みを増大させている可能性も推察される。特に、*SLC23A2*は、5-FU耐性大腸がん細胞株においてその発現量の減少が報告されている [22] ため、有力なバイオマーカーの候補であると考えられる。一方で、*ABCB1*は薬物排出トランスポーターをコードする遺伝子であること、*RAD51*を含むDNA修復関連タンパク質の過剰発現がDNAに損傷を与える薬物に対する耐性に関与することが報告されている [23]。すなわち、*ABCB1*及び*RAD51*の発現増大は薬物の耐性化を生み出すと考えられ、mRNA発現量が5-FUの IC_{50} 値と負の相関性を示したというという結果は一致していない。よって、*ABCB1*及び*RAD51*が直接的に5-FUの感受性に関与している可能性は低いと考えられる。

シスプラチンの IC_{50} 値は、*ABCC2*、*MSH2*及び*DPYD*のmRNA発現量とそれぞれ正の相関関係 ($r > 0.7$) を認めた (Fig 1-2, Table 1-5)。すでに、*ABCC2*がシスプラチンの排出トランスポーターとして機能するという [24]、ヒト肺がん組織において*DPYD*mRNAの発現量がCDDPの感受性と相関すること [25] が報告されており、*ABCC2*及び*DPYD*の発現量がシスプラチン感受性に影響することが強く疑われる。また、*MSH2*は口腔がん及び咽頭がん患者において、それらの腫瘍組織における*MSH2*タンパク質

発現量が多いほどシスプラチンによる抗腫瘍効果は高いと報告されている [26] もの、*MSH2* がシスプラチンにより生じた DNA 損傷を修復することも報告 [27] されており、一定の見解が得られていない。いずれにしても、食道がん細胞における *ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* の mRNA 発現量は、いずれも 5-FU、*CDDP* の両感受性と良好な相関関係を示したことから、食道がん患者の 5-FU 及び *CDDP* を用いた化学療法に対する有効性の予測バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

DPYD 阻害剤であるギメラシルが、*DPYD* mRNA 量の最も高い KYSE30 細胞の 5-FU 感受性を増大させた (Table 1-4, 1-6)。この結果は、食道がん細胞株の *DPYD* mRNA 発現量は、5-FU 感受性と高い相関関係を示すという報告 [28] と一致していることから、食道がん細胞における *DPYD* mRNA が 5-FU の有効性予測因子となることが示唆された。また、ギメラシルは全ての細胞株において *CDDP* の感受性を減弱させたことから、そのメカニズムは不明であるものの、*CDDP* が細胞毒性を発揮するためには *DPYD* の活性が必要である可能性が推察された。一方で、*ABCC2* 阻害剤である MK571 は 5-FU 及び *CDDP* の感受性を増強させるものと予想されたが、OE33 及び KYSE150 細胞において 5-FU 感受性を減弱させ、さらに KYSE70 及び KYSE140 細胞において *CDDP* 感受性を減弱させるという結果が認められた (Table 1-7)。したがって、*ABCC2* の感受性予測バイオマーカーとしての有用性は低いものと考えられる。

以上、ヒト食道がん細胞株において 5-FU に対して *DPYD* が有力な感受性を予測するバイオマーカーとなる可能性とともに、5-FU に対しては *SLC22A2* 及び *SLC23A2* が、*CDDP* に対しては *MSH2* がバイオマーカーの候補となる可能性が示唆された。

第5節 小括

ヒト食道がん細胞株を用い、5-FU 及び CDDP の感受性を規定する因子を探索したところ、以下の結果を得た。

1. 5-FU の感受性は、*SLC22A2*、*SLC23A2*、*ABCB1*、*ABCC2*、*RAD51*、*MSH2* 及び *DPYD* の mRNA 発現量と強い相関性を示した。
2. CDDP の感受性は、*ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* の mRNA 発現量と強い相関性を示した。
3. ギメラシル同時処置による *DPYD* の阻害は、5-FU の感受性を増強させた。

以上の結果は、*DPYD* が食道がん化学療法の有効性を予測するバイオマーカーとして最も有力な候補であり、*SLC22A2*、*SLC23A2* 及び *MSH2* についても有効性予測因子として有用となる可能性を示唆している。

第2章 食道がん化学放射線療法施行患者における *SLC23A2* の遺伝子多型と治療効果の関連

第1節 緒言

抗酸化物質であるビタミンCは、細胞内の酸化還元反応の補基質であり、酸化ストレスにより誘導される腫瘍の形成を阻害することが知られている [43, 44]。Tsukaguchi ら [45] は、1999年に2種類のナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターである *SVCT1* 及び *SVCT2* をクローニングし、これらトランスポーターは還元型ビタミンCを細胞内に取り込む働きを持つことを明らかにしている。*SVCT1* は主に小腸、腎臓などに発現し、ビタミンCの消化管吸収、腎臓での再吸収を行っているのに対し、*SVCT2* は全身のあらゆる組織に分布し、細胞の酸化還元状態を維持する働きを担っている [45-48]。

SVCT2 をコードしている *SLC23A2* のSNPsは、リンパ腫 [49]、頭頸部がん [50]、大腸がん [51] 及び胃がん [52] の罹患率との関連性が報告されている。また、Abdel-Latif ら [53] は *in vitro* においてビタミンCの前処置が食道がん細胞株の5-FU及びシスプラチン感受性を増強すること、Karasawa ら [22] はcDNAマイクロアレイ解析により、5-FU耐性大腸がん細胞の *SLC23A2* mRNA 発現量が親株と比較し低レベルであることをそれぞれ報告している。さらに、第1章において *SLC23A2* のmRNA発現量が、5-FUの感受性と高い相関性を有することを示している。以上のことから、*SLC23A2* のSNPsは、食道がん患者における5-FU及びCDDPによるがん化学療法の治療効果の予測に利用可能である可能性が考えられる。

そこで本検討では、治療効果予測因子としての *SLC23A2* のSNPsの有用性を明らかにする目的で、5-FU及びCDDPを含む化学放射線療法を施行した日本人の食道がん患者において、*SLC23A2* のSNPsの保有とがん化学療法の完全奏効 (complete response: CR) 率、長期予後並びに重篤な副作用との関連性を検討した。

第2節 材料及び方法

1) 倫理指針

これまでに、日本人の食道がん患者において 5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法施行時の治療効果、重篤な副作用並びに予後を予測できるバイオマーカーを明らかにするため、一連の研究が行われている [54-60]。これらの研究は、全て神戸大学における倫理委員会の承認を受け、医学研究評議会のガイドラインを順守して行った。また、全対象患者は、これらの試験及び将来の研究のためにゲノム DNA を保管することに同意している。追加の DNA 解析を行う際は、再度神戸大学における倫理委員会の承認を得た上で、DNA 解析は医学研究評議会のガイドラインを順守して行った。なお、DNA 解析を行う前には全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

2) 対象患者

2003 年から 2006 年の間に神戸大学医学部附属病院にて 5-FU/CDDP 併用化学放射線療法を受けた食道がん患者 49 名を対象とした。患者の選択基準は以下の通りである。

1. 国際対がん連合 (UICC) による TNM 分類で T1-T4、N0-N1、M0-M1 であること
2. 85 歳未満であること
3. ECOG におけるパフォーマンスステータスが 0-2 であること
4. 骨髄、腎及び肝機能に異常が無いこと
5. がん化学療法の治療歴が無いこと
6. 重篤な合併症が無いこと
7. 他に活動中の悪性腫瘍が無いこと (早期のものは除く)
8. インフォームドコンセントが入手可能であること

3) プロトコル

1 コースは、5-FU の 5 日間持続点滴静脈内投与 (1-5 日目及び 8-12 日目、400 mg/m²/day)、CDDP の点滴静脈内投与 (1 日目及び 8 日目、40 mg/m²/day) 並びに放射線照射 (1 日 1 回 2 Gy、5 日間連続照射 ; 1-5 日目、8-12 日目及び 15-19 日目) から成り、2 週間の休薬期間の後、2 コース目を行う。グレード 3 または 4 の血液毒性が出現した場合、基準値に回復するまで化学放射線療法は延期し、次回治療は減量の上施行した。またグレード 2 以上の発熱が認められた場合、改善するまで治療は延期した。腎毒性が認められた場合は、毒性の程度に合わせ CDDP の投与量を減量した。放射線照射は、化学療法に伴う重篤な血液毒性もしくは非血液毒性が認められた場合に延期したが、総照射量については原則変更していない。

4) SNPs の選択

SLC23A2 の SNPs の選択基準は、以下の通りとした。まず、がんと関連が報告されているもの [49-52]、かつ NCBI の SNPs データベース (dbSNP) にてマイナーアレルの頻度が 40%以上のものを選択し

た。なお、アレル頻度の閾値を 40%に設定したのは、5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法の完全奏効率が 46.9%であり、グレード 3 以上の好中球減少症の発現頻度が 42.9%であるためである。上記基準と合致した、intron 2 上に存在する rs2681116 及び rs13037458、intron 3 上の rs1715364、intron 8 上の rs4987219 並びに exon 11 上の rs1110277 の 5 種類を選択した。

5) 遺伝子型の判定

rs13037458、rs1715364、rs4987219 及び rs1110277 の解析には、血液中の DNA を TaqMan® Sample-to-SNP™ kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によりプロトコルに従って抽出することで行った。これら SNPs は、TaqMan® MGB probe-based PCR 及び StepOne™ real-time PCR System (Applied Biosystems) によって決定した。rs2681116 は QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN, 東京) を用い、血液中から DNA を抽出後ダイレクトシーケンス法により解析した。rs2681116 を含む配列を Takara EX Taq® (タカラバイオ) 及び GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いた PCR 法にて増幅した。この PCR 反応に用いたプライマー配列は以下に示す。

Forward: 5'-CCAGTTGTGTTTCCTTTTCCTTTTCT-3'

Reverse: 5'-GTAGAAGGATCACATAAGCCCAGTAG-3'

PCR 反応は、94°C、3 分→(94°C、20 秒→61°C、20 秒→72°C、30 秒)×35 サイクル→72°C、5 分→4°C で行い、PCR 産物 (131 bp) は 3%アガロースゲル電気泳動により明瞭な単一のバンドであることを確認した。PCR 産物は、BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) 及び ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いシーケンス反応を行った。DNA 配列は sequencing analysis software v3.7 (Applied Biosystems) を用いて解析した。

6) 副作用の評価

5-FU と CDDP を併用する化学放射線療法の主な急性毒性は、白血球減少、口内炎及び口唇炎である。これら化学放射線療法による毒性は、National Cancer Institute Common Toxicity Criteria を基に定められている日本臨床腫瘍研究グループの基準により評価した。治療開始時から治療終了後 2 週間 (治療開始後 70 日目) までの間に発現した副作用を急性毒性とし、グレード 3 以上を重篤な急性毒性として評価した。

7) 完全奏効の判定

治療後の病理学的な評価は、Ohtsu ら及び Kumekawa らの方法に従った [61-65]。すなわち、化学放射線療法終了 1 か月後に、内視鏡による生検並びに胸腹部の CT スキャンによって病変が認められなかった場合、CR とした。この評価は、治療終了後 3 か月目まで 1 か月ごとに繰り返し、3 か月後まで病変が認められなかった場合に CR と確定した。

8) 生存期間

生存期間は、治療開始から何らかの理由により死亡するまで、もしくは観察期間終了までの期間とした。

9) データ解析及び統計学的処理

得られたデータは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。分割表の統計解析には、Fisher's exact test、生存曲線の比較には log-rank test を用い、危険率 5%未満 (両側検定) を有意差ありとした。

第3節 結果

1) 患者背景

患者 49 名 (平均年齢 64.5 ± 7.4 歳) が解析対象であり、その内訳は男性 46 名並びに女性 3 名であった。TNM 分類の内訳は、それぞれ 16/6/15/12 (T1/T2/T3/T4)、22/27 (N0/N1) 及び 41/8 (M0/M1) であった。化学放射線療法後の CR 率は 46.9% (23/49) であり、その 5 年生存率は 42.9% (21/49) であった。重篤な白血球減少、口内炎及び口唇炎の発生率は、それぞれ 42.9% (21/49)、14.3% (7/49) 及び 16.3% (8/49) であった。

2) CR 率と SNPs との関連性

Table 2-1 には、検討した *SLC23A2* の 5 種類の SNPs と CR 率との関連性を示した。統計学的に有意ではなかったものの、rs2681116 (p=0.114) に T アレルを保有する被験者、並びに rs13037458 (p=0.085) に A アレルを保有する被験者において、それぞれ CR 率が高い傾向が認められた。

Table 2-1. Association between *SLC23A2* genotypes and the clinical response in 49 patients after treatment with a definitive 5-FU/CDDP-based chemoradiotherapy

		Total	CR	non-CR	p value
rs2681116	TT	9	7	2	0.144
	TC	27	11	16	
	CC	13	5	8	
rs13037458	AA	12	9	3	0.085
	AC	31	12	19	
	CC	6	2	4	
rs1715364	TT	4	1	3	0.758
	TC	25	12	13	
	CC	20	10	10	
rs4987219	GG	2	1	1	0.480
	GC	15	5	10	
	CC	32	17	15	
rs1110277	GG	2	0	2	0.438
	GA	19	8	11	
	AA	28	15	13	

The rate of the complete response (CR) was 46.9% (23/49). Frequencies in patients with CR were compared with those with non-CR. Significance was assessed using Fisher's exact test.

Cited from Table 1 of "Minegaki et al. *Int J Med Sci*, 11, 321-326 (2014)".

3) 長期予後と SNPs との関連性

Figure 2-1 には、*SLC23A2* の 2 種類の SNPs (rs2681116 及び rs13037458) と長期予後との関連性を示した。rs2681116 に T アレル ($p = 0.142$)、rs13037458 に A アレル ($p = 0.056$) を有する被験者は、それぞれ長期予後が良い傾向が認められた。

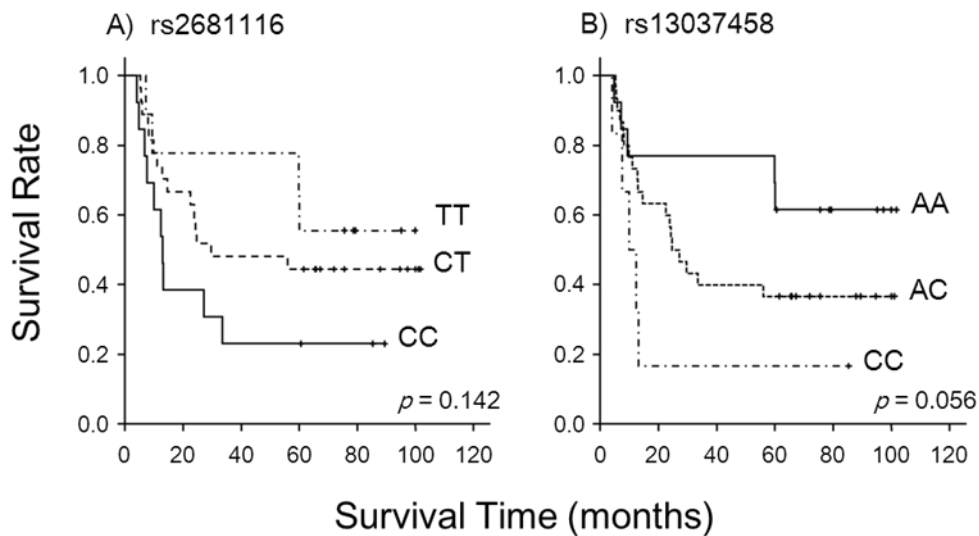


Figure 2-1. Association between the *SLC23A2* genotypes of rs2681116 and rs13037458 and long-term survival in 49 patients following treatment with a definitive 5-FU/CDDP-based chemoradiotherapy

Long-term survival was possibly associated with these genotypes (the log-rank test).

Cited from Figure 1 of "Minegaki et al. *Int J Med Sci*, 11, 321-326 (2014)".

4) 重篤な副作用と SNPs との関連性

Table 2-2 は、*SLC23A2* の SNPs とグレード 3 以上の白血球減少、口内炎または口唇炎の発症との関係を示している。rs4987219 及び rs1110277 の SNPs は、それぞれ白血球減少 ($p = 0.025$) 及び口内炎 ($p = 0.019$) と有意な相関関係が認められた。

Table 2-2. Association between *SLC23A2* genotypes and severe acute leukopenia, stomatitis, and cheilitis in 49 patients after treatment with a definitive 5-FU/CDDP-based chemoradiotherapy

		Leukopenia			Stomatitis			Cheilitis		
		severe	not severe	p	severe	not severe	p	severe	not severe	p
rs2681116	TT	4	5	0.540	2	7	0.291	1	8	0.250
	TC	13	14		2	25		3	24	
	CC	4	9		3	10		4	9	
rs13037458	AA	6	6	0.446	3	9	0.399	1	11	0.070
	AC	14	17		3	28		4	27	
	CC	1	5		1	5		3	3	
rs1715364	TT	1	3	0.123	0	4	0.832	0	4	0.344
	TC	8	17		3	22		6	19	
	CC	12	8		4	16		2	18	
rs4987219	GG	2	0	0.025	1	1	0.168	1	1	0.105
	GC	3	12		3	12		4	11	
	CC	16	16		3	29		3	29	
rs1110277	GG	0	2	0.612	2	0	0.019	1	1	0.062
	GA	9	10		2	17		5	14	
	AA	12	16		3	25		2	26	

The rate of severe acute leukopenia, stomatitis, and cheilitis were 42.9% (21/49), 14.3% (7/49), and 16.3 (8/49), respectively. Frequencies in patients with these toxicities were compared with those without. Significance was assessed using Fisher's exact test.

Cited from Table 2 of "Minegaki et al. *Int J Med Sci*, 11, 321-326 (2014)".

第4節 考察

第1章において、食道がん化学療法の適否を判断する基準の一つとして患者の腫瘍組織における *DPYD* mRNA の発現量測定が有用である可能性を示した。この評価法は、大腸がんにおけるセツキシマブ投与に対する *KRAS* の遺伝子検査と同様に有用であるのかも知れない。しかしながら、がん化学療法施行前に腫瘍組織の *DPYD* mRNA 発現量を評価することは、侵襲度の高い生検を必要とするため容易ではない。そこで、生検が不可能な場合の代替法として、血液を用いたゲノム DNA の遺伝子多型をもとに評価する方法が考えられる。例えば大腸がんでは、UDP グルクロン酸転移酵素 1A1 の欠損患者では、イリノテカンの副作用である白血球減少のリスクが高いことが報告されている。

本章では、*SLC23A2* の SNPs である rs2681116 及び rs13037458 は、5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法に奏効する食道がん患者を予測できる可能性が示された (Table 2-1)。また、これら SNPs は、長期予後とも相関する傾向が認められた (Fig. 2-1)。同一の患者群での CR 率は、長期予後と有意に相関するという報告と一致している [59]。イントロン 2 に存在する rs2681116 及び rs13037458 の役割については不明なままであるが、これらの SNPs により *SVCT2* の発現または機能に変動が生じており、その結果、ビタミン C または 5-FU の細胞内蓄積量が変化し、5-FU や CDDP の感受性に影響を及ぼしていると推察される。

イントロン 8 に存在する rs4987219 またはエクソン 11 に存在するシノニマス変異の rs1110277 は、それぞれグレード 3 以上の重篤な白血球減少症または口内炎と有意な相関性を示すことが明らかとなった (Table 2-2)。*SVCT2* は細胞内へのビタミン C 取り込みを介して細胞内の酸化還元状態の維持を担っており [47]、がん化学療法時の正常組織での毒性発現には、細胞内の酸化還元状態の乱れが関与している [66]。また、5-FU による骨髄抑制は酸化ストレスの増大により生じており [67]、ビタミン C 及びビタミン E が酸化ストレスの増大で生じる 3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジンによる白血球減少症の発症率を低下させることがマウスを用いた *in vivo* において証明されている [68-71]。したがって、これら SNPs がビタミン C の細胞内取り込み能に関与し、細胞内の酸化還元状態が乱れることで化学放射線療法による副作用が発現している可能性が考えられる。rs4987219 と rs1110277 において、それぞれ異なる組織に副作用が生じたことから、これら SNPs が *SVCT2* の輸送活性に及ぼす影響は組織依存的である可能性が推察される。

これまでに、*SLC23A2* の遺伝子上にアミノ酸変異を伴う SNPs は報告されていない [72]。また、*SLC23A2* の各 SNPs が示す表現型に関して明らかにされていない。本検討において、5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法の有効性及び安全性との関連が示唆された 4 種類の SNPs は、イントロンの変異もしくはエクソン上のシノニマス変異であった。例えば免疫系に関与する転写因子である *IRF4* のイントロンに存在する SNP は、*IRF4* の転写活性を変動させることが報告されている [73]。また、P 糖タンパク質をコードしている *ABCB1* 遺伝子上のシノニマス変異は、アミノ酸変異は伴わないもののコドン変化によりタンパク質への翻訳速度が変化することで、その後のフォールディングに影響を与え輸送機能に影響する可能性が報告されている [74]。したがって、本検討において認められた 4 種類の SNPs が、*SVCT2* の発現もしくは機能に直接影響を及ぼしている可能性が考えられた。ただし、これらの SNPs が *SLC23A2* 遺伝子上の他の遺伝子変異と密接に関連していることも推察され、その変異による輸送活性の低下をこれら 4

種類の SNPs で間接的に評価している可能性も否定できない。

以上、*SLC23A2* の SNPs は、5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法の有効性及び安全性を予測する指標となり得る可能性が示唆された。

第5節 小括

5-FU 及び CDDP を含む化学放射線療法施行時の食道がん患者における、CR 率、長期予後並びに重篤な副作用発現と *SLC23A2* の SNPs との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. rs2681116 及び rs13037458 は、いずれも CR 率及び長期予後を予測できる傾向があることを示した。
2. rs4987219 及び rs1110277 は、それぞれ化学放射線療法施行後の重篤な白血球減少及び口内炎の発症と有意な関連があることを示した。

以上の結果は、*SLC23A2* の遺伝子多型が食道がん化学放射線療法施行患者の CR 率、長期予後並びに副作用の発現の予測に利用可能である可能性を示唆している。

第3章 ヒト食道がん細胞株に対するビスホスホネート系薬物の増殖抑制効果

第1節 緒言

抗がん剤を含む新薬の開発には、時間、費用などの膨大なコストがかかることが知られている。開発候補化合物の選別に要するコストは、ハイスループットスクリーニングなどの手法を導入することにより徐々に改善されてきている。しかしながら、臨床試験でのドロップアウトや、臨床試験では予測できない副作用が上市後に顕在化するなど、新薬の開発に関わる問題点は依然として少なくない。このような新薬開発に関わるリスクを回避する目的で、安全性の保証されている既存の医薬品が持っている、別の疾患に対する新たな有効性を見出す研究も行われている [75]。その一例が、サリドマイドであり、睡眠導入剤として使用されていたが、抗腫瘍作用を持つことが見出され多発性骨髄腫の治療薬として用いられている [76]。

今回著者は、食道がんにおける新規治療薬として BPs に着目した。BPs は、すでに骨粗鬆症、ページェット病、がんの骨転移などの骨疾患に対し広く臨床使用されている。BPs はその構造中に含まれる窒素原子の有無で、2種類のグループに分類できる [77]。窒素原子を含まない第一世代の BPs は、ATP アナログに代謝され破骨細胞のアポトーシスを誘導し骨吸収を抑制する [78]。一方、窒素原子を有する第二及び第三世代の BPs (N-BPs) は、破骨細胞におけるメバロン酸経路内の重要な代謝酵素であるファルネシルピロリン酸 (FPP) 合成酵素を阻害し、その下流の代謝産物 FPP 及びゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を枯渇させることによりアポトーシスに導く [78]。これら FPP 及び GGPP のようなイソプレノイドは細胞の生存、増殖、分化または運動性に関する細胞内シグナル伝達に関与している。近年、N-BPs が乳がん [79-81]、肺がん [82, 83]、大腸がん [84]、腎がん [85] 及び前立腺がん [86] の細胞増殖を抑制することが *in vitro* 及び *in vivo* において証明されている。したがって、食道がん細胞においても N-BPs が新規の抗がん活性を有する薬剤の候補として挙げられる。

そこで本検討では、第一、第二及び第三世代の BPs がヒト食道がん細胞株に対して細胞増殖抑制作用を有するか否かを明らかにし、そのメカニズムについても *in vitro* において検討した。

第2節 材料及び方法

1) 試薬

アレンドロン酸 (ALE)、エチドロン酸 (ETI) 及びリセドロン酸 (RIS) は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) より、また、パミドロン酸 (PAM) 及びゾレドロン酸 (ZOL) は Toronto Research Chemicals より購入した。また、ファルネソール (FOH) とゲラニルゲラニオール (GGOH) は Sigma-Aldrich より購入した。スクアレン (SQ) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入したものをを用いた。

2) 細胞

KYSE30、KYSE150 並びに KYSE170 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) [15] の培養には、10% FBS (lot no. AWD12933, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 含有 D-MEM を用い、第1章と同様に行った。

3) 細胞毒性実験

BPs 処置後の各細胞の生存率は、CellQuanti-Blue™ Cell Viability Assay kit (Bio Assay Systems, Hayward, CA, USA) を用いて測定した。細胞を 96 ウェルプレート (Corning) に 5×10^3 cells/well/100 μ L の密度で播種し、24 時間後に培養液を BP 含有のものに入れ替え、37°C、5% CO₂ 条件下で 72 時間培養を行った。培養液を吸引後、110 μ L の CellQuanti-Blue™ 溶液含有培養液 (CellQuanti-Blue™ 試薬 10 μ L + 細胞培養液 100 μ L) を添加し 4 時間反応させた後、マイクロプレートリーダー (GENios™, Tecan) により各ウェルの蛍光強度 (励起波長: 535 nm、測定波長 595 nm) を測定した。なお IC₅₀ 値の算出は、第1章と同様に行った。

BPs の細胞増殖阻害作用に及ぼす SQ、FOH 並びに GGOH の影響は、前述同様 CellQuanti-Blue™ 法を用いた。なお、FOH 及び GGOH は、それぞれ FPP 及び GGPP の細胞膜透過性の前駆体であり、細胞内に取り込まれた後、FPP 及び GGPP に変換される[87]。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した後、SQ (20 μ M)、FOH (10 μ M) または GGOH (10 μ M) を添加した BP 含有培養液を 72 時間処置した。

4) Caspase-3/7 活性の測定

BPs 処置後の KYSE150 細胞における Caspase-3/7 活性は、Caspase-Glo™ 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用い、プロトコルに従って測定した。細胞を 96 ウェルプレート (Corning) に播種 (1×10^4 cells/well) し、24 時間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。その後、ALE (50 μ M)、ETI (1 mM)、PAM (50 μ M)、RIS (50 μ M) または ZOL (50 μ M) 含有培養液を添加し、さらに 24 時間培養を行った。その後、Caspase-Glo™ 3/7 試薬 (100 μ L) を各ウェルに添加し、2 時間室温で反応させた後、96 ウェル白色プレートに溶液を全量移し、マイクロプレートリーダー (GENios) にて各ウェルの発光強度を測定した。

5) アネキシン V によるアポトーシスの検出

KYSE150 細胞を 1.5×10^5 cells/well で 6 ウェルプレート (Corning) に播種し、24 時間後に ALE (50 μ M)、

ETI (1 mM)、PAM (50 μ M)、RIS (50 μ M) または ZOL (50 μ M) を添加し、48 時間処置した。浮遊及び接着した細胞を全て回収し、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)-結合 アネキシン V (アネキシン V, BioLegend, San Diego, CA, USA) 及びヨウ化プロピジウム (PI, 50 μ g/mL, 和光) を反応させた後、FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) にて細胞の蛍光強度を測定した。データの解析は、CELLQuest™ Ver. 3.3 (Becton Dickinson) にて行った。

6) 細胞周期の測定

KYSE150 細胞を 60 mm 培養皿 (旭硝子) に播種 (3×10^5 cells/dish) し、24 時間培養後、ALE (50 μ M)、ETI (1 mM)、PAM (50 μ M)、RIS (50 μ M) または ZOL (50 μ M) を 24 時間または 48 時間処置した。BP 処置後の細胞は、70%エタノールを用いて-30°C にて固定を行い、PI/RNase buffer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) で 15 分間室温にて反応させることで、細胞の DNA を染色した。PI の蛍光強度は、FACSCalibur™ (Becton Dickinson) にて測定し、CELLQuest™ Ver. 3.3 (Becton Dickinson) を用いて解析を行った。

7) Western blot 法

KYSE150 細胞を 2×10^6 cells/dish の密度で 100 mm 培養皿 (旭硝子) に播種し、24 時間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。その後、ALE (50 μ M)、ETI (1 mM)、PAM (50 μ M)、RIS (50 μ M) または ZOL (50 μ M) を 24 時間処置し、CellLytic™-M (Sigma-Aldrich) を用いて細胞からタンパク成分を抽出した。得られたタンパク成分は、Lowry 法 [88] を用いて定量し、10 μ g を 10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミド電気泳動に用いた。電気泳動後のタンパク成分は、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (ClearTrans® SP PVDF membrane, 和光) に転写し、1% スキムミルク (和光) 含有リン酸緩衝性生理食塩水 (PBS-T) にて 1 時間、室温で反応することでブロッキングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜は、PBS-T にて 2000 倍に希釈したマウス抗 Cyclin D1 抗体 (Cell Signaling Technology Japan, 東京) または 1000 倍に希釈した抗マウス β -actin 抗体 (和光) にて 4°C、オーバーナイトにて一次抗体反応を行った。その後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼで標識した抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare Japan, 東京) で 1 時間、室温にて二次抗体反応を行った。イムノスター® LD (和光) により PVDF 膜を暗所にて 5 分間反応させ、VersaDoc 5000 MP imaging system (Bio-Rad) にてバンドを撮影した。なお、Cyclin D1 の発現量は、画像を ImageJ (National Institutes of Health) を用いて解析し、 β -actin を内標準タンパク質として Cyclin D1 量を補正した。

8) 統計学的処理

得られた実験値は、全て平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。2 群間並びに多群間の比較は、それぞれ Student's t-test 並びに一元配置分散分析 (ANOVA) 後の Tukey honest significant difference test を用い、危険率 5% 未満 (両側検定) を有意差ありとした。

第3節 結果

1) ヒト食道がん細胞株の増殖に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響

第一世代の BPs である ETI は、検討した 3 種類のヒト食道がん細胞株において増殖抑制作用は示さなかった。一方、第二世代の BPs である ALE 及び PAM、並びに第三世代の BPs である RIS 及び ZOL は、濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示した (Figure 3-1)。

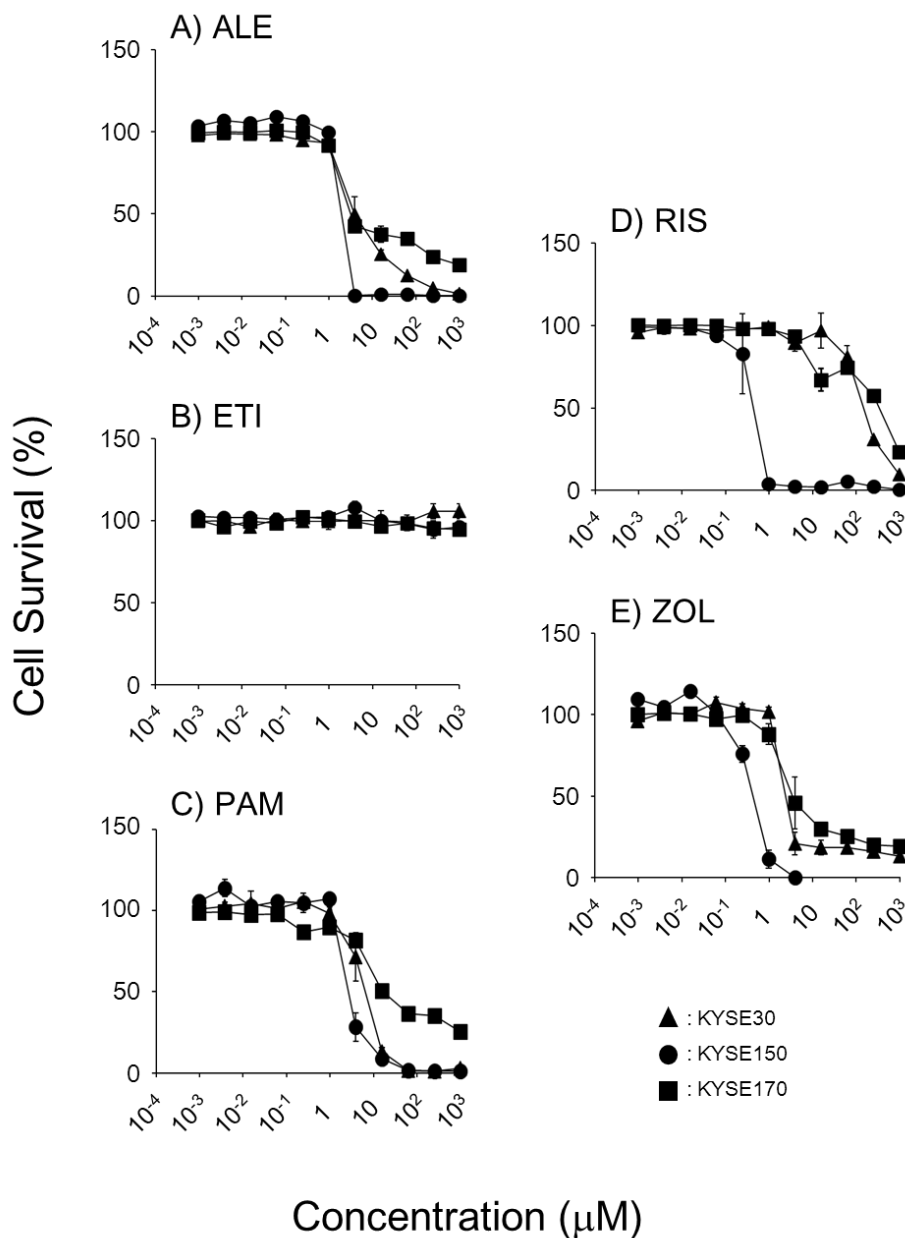


Figure 3-1. Bisphosphonate-mediated inhibitory effects on cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma cell lines

Cells were treated with culture media containing various concentrations of alendronate (ALE), etidronate (ETI), pamidronate (PAM), risedronate (RIS), or zoledronate (ZOL) for 72 h. Cell viability was determined by CellQuanti-Blue™ assay. Data are presented as the mean \pm SD (n = 4).

Cited from Figure 1 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

BPの細胞増殖抑制作用の程度は薬物間で相違し、いずれの細胞においてもZOLのIC₅₀値が最も低値を示した。さらに、細胞間においてもBPの細胞毒性に差が認められ、なかでもKYSE150細胞はBPに最も高い感受性を示した (Table 3-1)。

Table 3-1. IC₅₀ values for bisphosphonates in esophageal carcinoma cell lines

Bisphosphonates	IC ₅₀ value (μM)		
	KYSE30	KYSE150	KYSE170
Alendronate	5.30 ± 1.6	1.54 ± 0.061	8.36 ± 1.2
Etidronate	NC	NC	NC
Pamidronate	5.97 ± 1.5	3.33 ± 0.64	35.0 ± 4.8
Risedronate	163 ± 16	0.461 ± 0.18	234 ± 39
Zoledronate	2.98 ± 0.62	0.364 ± 0.050	6.15 ± 1.8

NC, not calculated. Each value represents the mean ± SD (n = 4).
Cited from Table 1 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

2) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物によるアポトーシス誘導

ETI を除く全ての BPs は、コントロールと比較し KYSE150 細胞の Caspase-3/7 活性を有意に上昇させた (Figure 3-2A)。さらに、アネキシン V 陽性細胞の比率は、ALE、PAM 及び ZOL の 48 時間処置により有意に上昇し、RIS については 48 時間では有意な上昇が認められなかったものの 72 時間処置で有意に上昇した。一方で、ETI の 48 時間処置はアネキシン V 細胞の比率に影響しなかった (Figure 3-2B)。

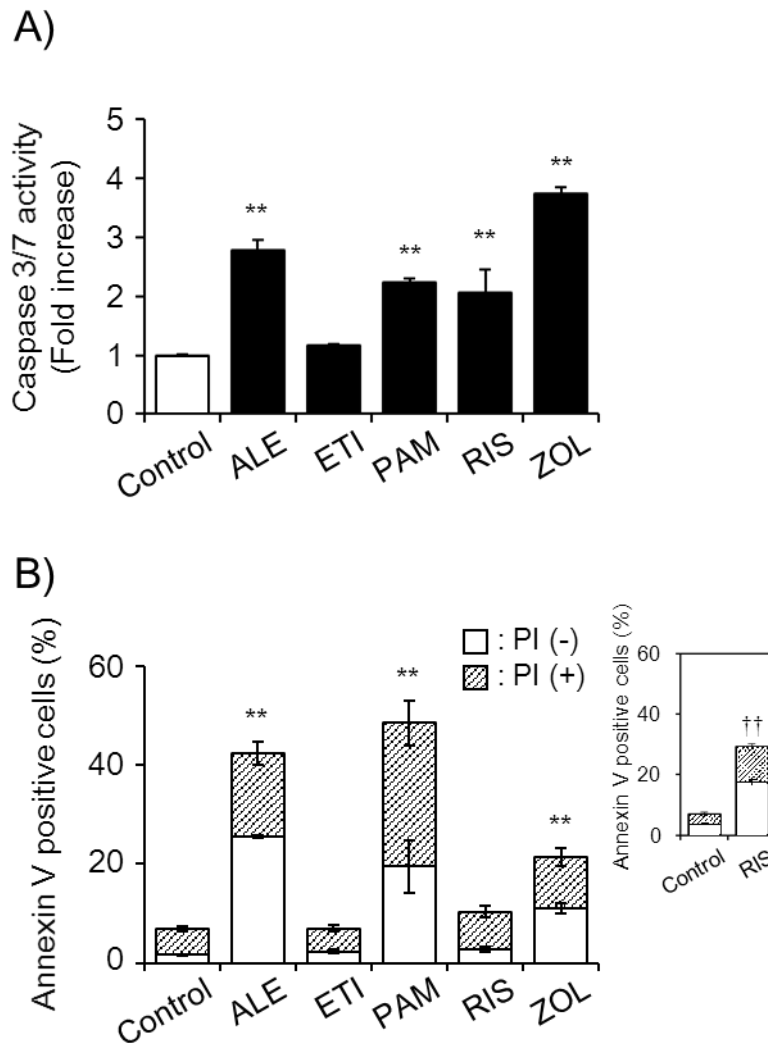


Figure 3-2. Evaluation of apoptosis after bisphosphonate treatment in KYSE150 cells

Cells were incubated with alendronate (ALN, 50 μ M), etidronate (ETI, 1 mM), pamidronate (PAM, 50 μ M), risedronate (RIS, 50 μ M), or zoledronate (ZOL, 50 μ M). After 24 h, caspase-3/7 activities were measured by Caspase-Glo™ 3/7 assay kit. (B) Cells were treated with ALN (50 μ M), ETI (1 mM), PAM (50 μ M), RIS (50 μ M), or ZOL (50 μ M) for 48 h, or RIS (50 μ M) for 72 h (inset). Then, floating and adherent cells were harvested and stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Apoptotic cells were detected using flow cytometry. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). Significant differences between mean values were determined by Student's *t*-test (B inset, ††p < 0.01) or analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey honest significant difference test (A and B, **p < 0.01 compared to control).

Cited from Figure 2 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

3) KYSE150 細胞における細胞周期に及ぼすビスホスホネート系薬物の影響

第二世代の BPs である ALE 及び PAM の 24 時間処置は、KYSE150 細胞における G0/G1 期の割合を有意に増加させ、G2/M 期の割合を有意に減少させた。また、BPs の 48 時間処置においては第二世代だけでなく第三世代である RIS 及び ZOL でも G0/G1 期における細胞数が増加し、S 期及び G2/M 期の両方またはいずれかの細胞数が減少した。一方で、ETI は KYSE150 細胞の細胞周期に有意な影響を及ぼさなかった (Figure 3-3)。

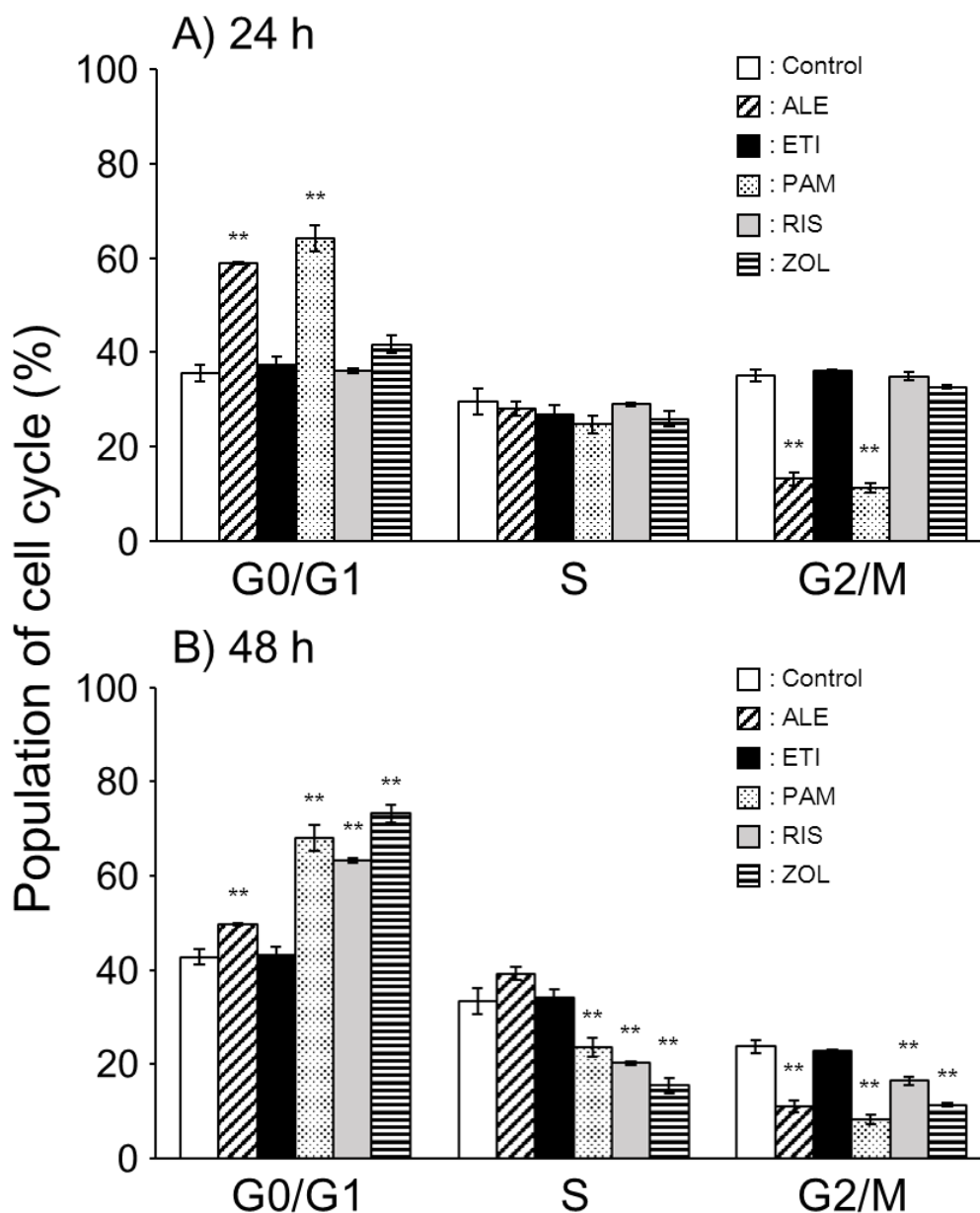


Figure 3-3. Cell cycle distribution after bisphosphonate treatment in KYSE150 cells

Cells were treated with alendronate (ALN, 50 μ M), etidronate (ETI, 1 mM), pamidronate (PAM, 50 μ M), risedronate (RIS, 50 μ M), or zoledronate (ZOL, 50 μ M) for 24 or 48 h. Then, cells were fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. DNA content was detected by flow cytometry. The data are presented as the mean \pm SD (n = 3-4). Significant differences between the mean values were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey honest significant difference test (**p < 0.01 compare control).

Cited from Figure 3 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

4) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物による Cyclin D1 タンパク質発現量への影響

ALE、PAM 及び ZOL 処置 24 時間後の KYSE150 細胞における Cyclin D1 タンパク質の発現量は、有意に減少した。一方で、RIS 及び ETI 処置後の細胞では有意な違いは認められなかった (Figure 3-4)。

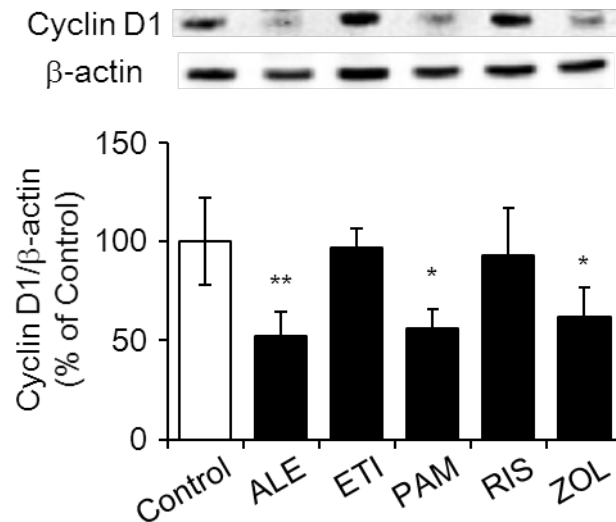


Figure 3-4. Cyclin D1 protein expression levels detected by western blot after bisphosphonate treatment in KYSE150 cells

Cells were treated with alendronate (ALN, 50 μ M), etidronate (ETI, 1 mM), pamidronate (PAM, 50 μ M), risedronate (RIS, 50 μ M), or zoledronate (ZOL, 50 μ M) for 24 h. Then, total protein was extracted from the cell, and western blots were performed. β -actin was used as an internal standard protein. The data are presented as mean \pm SD (n = 4). A representative blot from four independent experiments is shown. Significant differences between the mean values were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey honest significant difference test (*p < 0.05, **p < 0.01 compared to control).

Cited from Figure 4 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

5) KYSE150 細胞におけるビスホスホネート系薬物の細胞増殖抑制作用に及ぼすメバロン酸経路関連物質の影響

SQ は、全ての BPs の細胞増殖抑制作用に影響を及ぼさなかった。また、FPP の前駆体である FOH は、PAM 及び RIS の細胞増殖抑制作用をわずかに減弱させた。一方、GGPP の前駆体である GGOH は、検討した全ての BPs の細胞増殖抑制作用を有意に減弱させ、第三世代の BPs である RIS 及び ZOL においては、それらの増殖抑制作用をほぼ完全に消失させた (Figure 3-5)。

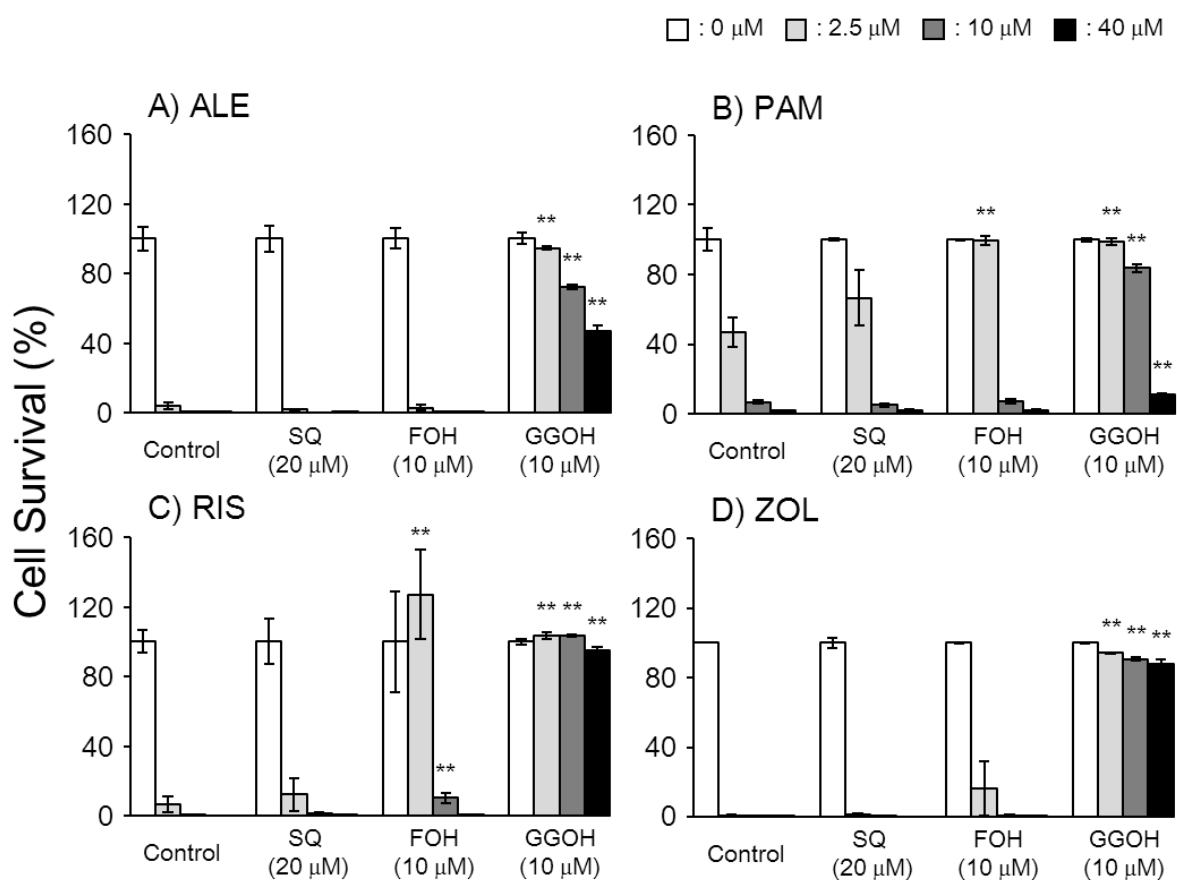


Figure 3-5. Effects of mevalonate pathway intermediates on bisphosphonate cytotoxicity in KYSE150 cells

Cells were incubated with culture media containing 2.5, 10, and 40 μM alendronate (ALE), etidronate (ETI), pamidronate (PAM), risedronate (RIS), or zoledronate (ZOL) in the absence or presence of squalene (SQ, 20 μM), farnesol (FOH, 10 μM), or geranylgeraniol (GGOH, 10 μM) for 72 h. Cell viability was evaluated with the CellQuanti-Blue™ assay. The data are presented as the mean ± SD (n = 3). Significant differences between the mean values were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey honest significant difference test (**p < 0.01 compared to control).

Cited from Figure 5 of "Minegaki et al. *Dis esophagus*, in press".

第4節 考察

第1章及び第2章において、がん細胞の *DYPD* mRNA 発現量の測定、並びに患者ゲノムにおける *SLC23A2* の SNP 解析が、化学療法の有効性及び安全性を予測できる可能性を示唆した。ここで、効果が認められないと予測される患者群に対する有効な治療方法がなければ、食道がんの治療成績は向上しないと考えられる。しかしながら、現在、食道がん化学療法における二次治療法の確立を目指した臨床試験が精力的に行われているものの、いずれも効果は限定的であり未だコンセンサスの得られた有効な治療法の確立には至っていない [6]。したがって、新たな食道がん治療薬の開発は急務である。本検討では、4種類の N-BPs が、ヒト食道がん細胞株において濃度依存的な増殖抑制作用を有することを示した (Fig. 3-1, Table 3-1)。また、最も BPs に対して感受性の高い KYSE150 細胞において、これら N-BPs によるアポトーシス誘導が認められた (Fig. 3-2)。よって、N-BPs が新たな食道がん治療薬の候補となることが示唆された。

N-BPs は、KYSE150 細胞の Caspase-3/7 活性並びにアネキシン V 陽性細胞の比率をそれぞれ増大させた (Fig. 3-2)。また、N-BPs は、細胞周期を G0/G1 期で停止させ (Fig. 3-3)、細胞周期制御因子である Cyclin D1 のタンパク質発現量を減少させた (Fig. 3-4)。これまで、食道がん以外のがん細胞において、N-BPs がアポトーシスを誘導することにより細胞毒性を示す細胞 [79, 84, 89, 90] と、アポトーシスを誘導することなしに細胞毒性を示す細胞 [91] とに分かれることが報告されている。また、例えば ZOL は、非小細胞肺癌細胞では G0/G1 期で細胞周期を停止させる [83] 一方で、他の多くのがん細胞株では S 期で停止させることが報告されている [89, 90, 92, 93]。すなわち、N-BPs によるがん細胞増殖抑制作用は、アポトーシスの有無のみならず、アポトーシスへの過程も含めて強い細胞特異性が存在すると考えられる。本検討において、食道がん細胞では、N-BPs は Cyclin D1 の発現を抑制することで細胞周期を G0/G1 期で停止させてアポトーシスを誘導するというメカニズムを有することが明らかとなった。

RIS は Caspase-3/7 活性を増大させ (Fig. 3-2)、72 時間処置時にアネキシン V 陽性細胞率を有意に上昇させた (Fig. 3-2B inset)。しかしながら、RIS の 48 時間処置はアネキシン V 陽性細胞の割合を増大させず (Fig. 3-2)、24 時間処置は他の N-BPs とは異なり Cyclin D1 のタンパク質発現量を変動させなかった (Fig. 3-4)。この結果と一致して、骨肉腫細胞において RIS は、48 時間処置ではアポトーシスの指標である DNA を断片化させず、72 時間処置で DNA を断片化させると報告されている [94]。このように RIS で反応が遅い原因として、N-BPs 間での細胞内取り込み速度の差が考えられる。実際、N-BPs の側鎖に存在する N 原子は、生理的 pH である 7.4 において、ALE 及び ZOL では正に帯電しているのに対し、RIS では負に帯電している [95]。細胞膜の透過は、一般的に正の帯電を有しているカチオンの方が早いことから、RIS は他の N-BPs よりも取り込み速度が低い可能性が考えられる。

N-BPs は、メバロン酸経路の重要な酵素である FPP 合成酵素 [78] 並びに GGPP 合成酵素 [96] を阻害することが報告されている。細胞内の FPP や GGPP の欠乏は、Ras、Rac、Rap1 並びに Rho といった低分子量 G タンパク質のプレニル化を減少させる [97, 98]。本研究において、SQ や FOH の共存は、食道がん細胞の BPs 感受性にほとんど影響しなかったのに対して、GGOH は N-BPs の細胞毒性をほぼ完全に阻害した (Fig. 3-5)。これらの結果は、異なる細胞種の過去の報告と一致しており [97, 99]、食道がん細胞株における N-BPs の細胞毒性は細胞内 GGPP の欠乏に起因することを示唆している。Ras スーパーファ

ミリーの一つである Rap1 は、ゲラニルゲラニル化され細胞生存に重要な MAPK/ERK 経路を活性化することが知られている [100, 101]。Tsubaki ら [102] は、N-BPs である ALE が、造血器腫瘍細胞において ERK と mTOR 経路を抑制しアポトーシスを誘導すること、並びにこのアポトーシス誘導は GGPP の添加によって消失することを報告している。また、Cyclin D1 の発現は、MAPK/ERK や mTOR 経路によって正に制御されていることも報告されている [103, 104]。したがって、食道がん細胞において、N-BPs によるアポトーシス誘導並びに細胞周期の停止には、MAPK/ERK 及び mTOR シグナルの阻害が関与している可能性が推察される。

BP は、非加水分解性のピロリン酸誘導体であり、カルシウムイオンと容易にキレート化合物を形成することが知られている [105]。一方で、カルシウムイオンは、細胞内におけるシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして機能することがよく知られていることから、BP によって細胞外カルシウムイオンがキレート化され種々のシグナル伝達に影響を及ぼすことで、ヒト食道がん細胞株の増殖が抑制された可能性も考えられる。今回、第一世代の BP である ETI においてはヒト食道がん細胞株に対する増殖抑制作用が認められなかった (Fig. 3-1, Table 3-1)。また、Inoue ら [106] は、ZOL ではヒト口腔がん細胞株に対する細胞増殖抑制作用が認められたものの、カルシウムキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸では細胞増殖への影響は認められないこと報告している。したがって、本検討において認められた N-BPs の細胞増殖抑制作用は、細胞外カルシウムイオンとのキレート化合物の形成により引き起こされている可能性は低いと考えられる。

Koto ら [107] は、ヒト線維肉腫細胞を用いた *in vitro* での検討により、N-BPs である ZOL が 5-FU 及び CDDP の細胞増殖抑制作用を増強させることを報告している。また、ZOL は、乳がん細胞のシスプラチン感受性を増強させることが報告されている [108]。さらに、ALE や PAM が、5-FU を 5-FUMP に変換する酵素であるホスホリボシルトランスフェラーゼの活性を増大させ、その結果 5-FU の細胞増殖抑制作用を増強させる可能性が報告されている [109]。したがって、N-BPs は、ヒト食道がん細胞株に対し単独で細胞増殖抑制作用を示すだけでなく、5-FU、CDDP といった抗がん剤と併用することにより、相加または相乗的な細胞増殖の抑制が期待できると考えられる。

以上、N-BPs はヒト食道がん細胞株に対して細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。そのメカニズムとして、メバロン酸経路の阻害による Cyclin D1 の発現抑制を介して細胞周期を G0/G1 期で停止させ、アポトーシスに導くことが示唆された。したがって、N-BPs は食道がんに対する新たな治療薬となり得る可能性が考えられる。

第5節 小括

ヒト食道がん細胞株の増殖に対する BPs の影響について検討を行い、以下の結果を得た。

1. 第二及び第三世代の BPs は、ヒト食道がん細胞株に対し細胞増殖抑制作用を示した。
2. N-BPs の細胞増殖抑制メカニズムは、メバロン酸経路の GGPP 合成阻害に基づく細胞周期停止を伴うアポトーシスの誘導である可能性を示した。

以上の結果は、第二及び第三世代の BPs が、食道がん化学療法に応用できる可能性を示唆する重要な基礎的知見である。

総 括

食道がんに対するがん化学療法は、術前・術後や再発時など幅広く用いられており、その有効性は治療成績に大きく影響する。しかしながら、同じ消化器がんである大腸がんでは、診断後の5年生存率が約70%と治療成績の向上が著しいのに対して、食道がんでは5年生存率が約35%であり、未だ十分とは言えない。

食道がん化学療法の治療成績が悪い要因として、薬剤の有効性や副作用の個人差が大きい上、使用できる薬剤も少ないことが挙げられる。食道がんに対するがん化学療法の有効性及び副作用のリスクを事前に予測するための研究が精力的に行われているものの、未だ臨床応用に至っているものは存在しない。また、食道がん化学療法には5-フルオロウラシル (5-FU) 及びシスプラチン (CDDP) を除き、コンセンサスが十分に得られている薬剤はほとんど存在しない。したがって、食道がんの治療成績向上のためには、食道がん化学療法における有効性及び安全性の個人差の要因を明らかにするとともに、食道がんに対して有効な新たな治療薬を見つける必要がある。

そこで本研究では、食道がん化学療法における個人差を考慮した治療戦略を構築することを目的として5-FU 及び CDDP を用いた食道がん化学療法による治療効果の事前予測に有用な指標を探索するとともに、食道がん化学療法の有効性向上を目指したビスホスホネート系薬物 (BPs) の有用性について検討し、以下の結論を得た。

第1章 ヒト食道がん細胞株における5-FU 及び CDDP 感受性を規定する因子の探索

食道がん化学療法の個人差を引き起こす要因の一つとして、腫瘍組織中におけるがん細胞自身の抗がん剤感受性の相違が考えられる。本研究において、5-FU 及び CDDP に対する感受性は、5種類のヒト食道がん細胞株間で大きな相違が認められた。次に、これらヒト食道がん細胞株における5-FU 及び CDDP に対する感受性と、薬物トランスポーター、DNA 修復関連タンパク質及び代謝酵素を含む35種類の機能性タンパク質の mRNA 発現量との関連性について検討した。その結果、5-FU の感受性は、*ABCC2* (排泄トランスポーター: MRP2)、*MSH2* (DNA ミスマッチ修復遺伝子) 及び *DPYD* (5-FU の代謝酵素) の mRNA 発現量とそれぞれ強い正の相関性を示し ($r > 0.7$)、*SLC22A2* (有機カチオントランスポーター)、*SLC23A2* (ビタミンC トランスポーター)、*ABCB1* (P糖タンパク質) 及び *RAD51* (DNA 修復因子) の mRNA 量と負の相関性を示した ($r > -0.7$)。また CDDP の感受性は、*ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* の mRNA 発現量と強い正の相関性を示した ($r > 0.7$)。以上のことから、5-FU 及び CDDP 両方の感受性と相関性を有した *ABCC2*、*MSH2* 及び *DPYD* mRNA が食道がん化学療法の有効性を予測するバイオマーカーの候補として考えられた。

ABCC2 阻害剤である MK571 の同時処置は、ヒト食道がん細胞株の5-FU 及び CDDP 感受性を増強しなかったものの、*DPYD* 阻害剤であるギメラシルは *DPYD* mRNA の発現量が最も高値であった KYSE30 細胞の5-FU 感受性を増強させた。以上の結果より、食道がん細胞における *DPYD* の mRNA 発現量が食道がん化学療法の有力な感受性予測因子の候補遺伝子であり、*SLC22A2*、*SLC23A2* 及び *MSH2* についてもその候補となり得ることが示唆された。

第2章 食道がん化学放射線療法施行患者における *SLC23A2* の遺伝子多型と治療効果の関連

ビタミンCの抗酸化能は、酸化ストレスにより誘導される腫瘍形成を阻害することが知られている。また、ビタミンCを細胞内に取り込むトランスポーターSVCT2をコードする*SLC23A2*のSNPsは、種々のがん罹患率と関連することが報告されている。さらに*in vitro*において、ビタミンCが食道がん細胞株の5-FU及びCDDP感受性を増強すること、5-FU耐性大腸がん細胞の*SLC23A2* mRNA発現量が親株と比較し低レベルであること、*in vivo*において酸化ストレスが5-FUの骨髄抑制発現に関与することがそれぞれ報告されている。以上のことから、*SLC23A2*のSNPsは食道がん患者における5-FU及びCDDPによるがん化学療法の治療成績に影響している可能性が考えられる。そこで本検討では、5-FU及びCDDPを含む化学放射線療法を施行した49例の日本人の食道がん患者を対象として、5種類の*SLC23A2*のSNPs(rs2681116、rs13037458、rs1715364、rs4987219及びrs1110277)と化学放射線療法の完全奏効(CR)率、長期予後並びに重篤な副作用との関連性を検討した。化学放射線療法施行後のCR率及び長期予後は、統計学的に有意ではないもののrs2681116並びにrs13037458と相関する傾向が認められた。また、rs4987219及びrs1110277は、それぞれ重篤な白血球減少症($p = 0.025$)及び口内炎($p = 0.019$)の発症と有意な関連性が認められた。したがって、これらSNPsがSVCT2のビタミンCの取り込み能に関与し化学放射線療法の有効性や副作用に影響したことが推察される。以上より、食道がん化学放射線療法の有効性予測に*SLC23A2*のrs2681116及びrs13037458が、安全性予測にrs4987219及びrs1110277が利用可能である可能性が示唆された。

第3章 ヒト食道がん細胞株に対するビスホスホネート系薬物の増殖抑制効果

近年、第二及び第三世代のビスホスホネート系薬物(N-BPs)が、乳がんや肺がんなどを用いた基礎的検討において細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている。したがって、食道がん細胞においてもN-BPsが新規の抗がん活性を有する薬剤の候補として挙げられる。本検討では、ヒト食道がん細胞株に対するN-BPsの細胞増殖抑制作用並びにそのメカニズムを検討した。4種類のN-BPs(アレンドロン酸、パミドロン酸、リセドロン酸及びゾレドロン酸)は、3種類のヒト食道がん細胞株に対し濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示した。また、これらN-BPsは、ヒト食道がん細胞株のカスパーゼ3/7活性を上昇させるとともに、アポトーシスの指標であるアネキシンV陽性細胞の比率を増大させた。さらに、N-BPsは細胞周期制御因子であるCyclin D1のタンパク質発現量を有意に減少させ、細胞周期をG0/G1期で停止させた。よって、N-BPsの食道がん細胞に対する細胞増殖抑制作用に、アポトーシスの誘導及び細胞周期の停止が関与することが示唆された。次に、N-BPsの細胞増殖抑制作用メカニズムの解明を行った。N-BPsの細胞増殖抑制作用は、細胞内でメバロン酸経路の中間体であるグラニルグラニルピロリン酸(GGPP)に変換されるグラニルグラニオールを共存させることにより、ほぼ完全に抑制された。したがって、N-BPsの細胞増殖抑制作用は、細胞内GGPPの枯渇に起因していることが示唆された。以上のことから、N-BPsは食道がん細胞に対し細胞増殖抑制作用を有し、そのメカニズムは、メバロン酸経路の阻害に基づくGGPPの枯渇に伴い生じるG0/G1期での細胞周期停止、及びアポトーシスの誘導であるということが考えられた。

以上本研究の結果から、腫瘍組織の生検が可能な場合は腫瘍組織の *DPYD* mRNA の発現量により、不可能な場合は血球などを用いた *SLC23A2* の SNP 判定により食道がん化学療法の有効性及び安全性を予測できる可能性が示唆された。さらに、食道がん化学療法の有効性及び安全性が低いと予測された患者には N-BPs をがん化学療法に応用する食道がんに対する新規治療戦略の可能性が示唆された。

これらの研究成果は、食道がん化学療法の個人差を考慮した、治療選択肢の拡大につながる重要な基礎的知見になるものと考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終止ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 西口工司教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行及び本稿の作成におきまして、様々な御助言と御指導を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 辻本雅之講師に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、種々の有益な御助言と御指導を賜りました神戸大学医学部附属病院薬剤部 平井みどり教授、神戸大学医学部消化器内科学分野 東 健教授、京都薬科大学薬物動態学分野 栄田敏之教授、近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門 田村孝雄教授、姫路獨協大学薬学部 高良恒史教授、中村 任教授、兵庫県立がんセンター消化器内科 三木生也博士、武庫川女子大学薬学部 栞原晶子准教授、山森元博講師、近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門 奥野達哉助教並びに広島大学病院薬剤部 大松秀明博士に深謝致します。

本研究に多大な御協力を頂きました京都薬科大学臨床薬学分野 濱口良平博士（現 武庫川女子大学薬学部 助教）並びに臨床薬学分野の諸氏に深謝致します。

最後に終始暖かいご支援を頂きました家族に心から感謝致します。

引用文献

- 1) Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Global cancer statistics, 2012, *CA Cancer J Clin*, **65**, 87-108 (2015).
- 2) National Cancer Center: Cancer statistics in Japan 2013.
http://ganjoho.jp/public/statistics/backnumber/2013_jp.html. Accessed March 14, 2015.
- 3) Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J Clin*, **65**, 5-29 (2015).
- 4) Kawasaki Y, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Sasaki K, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S, Nrf2 is useful for predicting the effect of chemoradiation therapy on esophageal squamous cell carcinoma, *Ann Surg Oncol*, **21**, 2347-2352 (2014).
- 5) Cheng JC, Graber MS, Hsu FM, Tsai CL, Castaneda L, Lee JM, Chang DT, Koong AC, High serum levels of vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor- β 1 before neoadjuvant chemoradiotherapy predict poor outcomes in patients with esophageal squamous cell carcinoma receiving combined modality therapy, *Ann Surg Oncol*, **21**, 2361-2368 (2014).
- 6) Thallinger CM, Raderer M, Hejna M, Esophageal cancer: a critical evaluation of systemic second-line therapy, *J Clin Oncol*, **29**, 4709-4714 (2011).
- 7) Song Z, Zhang Y, Second-line docetaxel-based chemotherapy after failure of fluorouracil-based first-line treatment for advanced esophageal squamous cell carcinoma, *Onco Targets Ther*, **13**, 1875-1881 (2014).
- 8) Sakaeda T, Yamamori M, Kuwahara A, Nishiguchi K, Pharmacokinetics and pharmacogenomics in esophageal cancer chemoradiotherapy, *Adv Drug Deliv Rev*, **61**, 388-401 (2009).
- 9) Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W 3rd, Dantzig AH, The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites, *Mol Cancer Ther*, **4**, 855-863 (2005).
- 10) Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Sträter J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Häusler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH, Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil, *Clin Cancer Res*, **9**, 4116-4124 (2003).
- 11) Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM, Cassano A, La Torre G, Barone C, Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil, *Oncology*, **70**, 366-377 (2006).
- 12) Larminat F, Bohr VA, Role of the human ERCC-1 gene in gene-specific repair of cisplatin-induced DNA damage, *Nucleic Acids Res*, **22**, 3005-3010 (1994).
- 13) Andersson BS, Sadeghi T, Siciliano MJ, Legerski R, Murray D, Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs, *Cancer Chemother Pharmacol*, **38**, 406-416 (1996).
- 14) Hsu DS, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Chang SY, Tsai TL, Chang CC, Tzeng CH, Wu KJ, Kao JY, Yang MH, Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head

- and neck cancer, *Clin Cancer Res*, **16**, 4561-4571 (2010).
- 15) Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T, Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines, *Cancer*, **69**, 277-284 (1992).
 - 16) Kitada N, Takara K, Minegaki T, Itoh C, Tsujimoto M, Sakaeda T, Yokoyama T, Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines, *Cancer Chemother Pharmacol*, **62**, 577-584 (2008).
 - 17) Takara K, Sakaeda T, Yagami T, Kobayashi H, Ohmoto N, Horinouchi M, Nishiguchi K, Okumura K, Cytotoxic effects of 27 anticancer drugs in HeLa and MDR1-overexpressing derivative cell lines, *Biol Pharm Bull*, **25**, 771-778 (2002).
 - 18) Bosset JF, Lorchel F, Manton G, Buffet J, Créhange G, Bosset M, Chaigneau L, Servagi S, Radiation and chemoradiation therapy for esophageal adenocarcinoma, *J Surg Oncol*, **92**, 239-245 (2005).
 - 19) Pettersen HS, Visnes T, Vågbo CB, Svaasand EK, Doseth B, Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE, UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation, *Nucleic Acids Res*, **39**, 8430-8444 (2011).
 - 20) Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T, Inui K, Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1, *Drug Metab Pharmacokin*, **20**, 379-386 (2005).
 - 21) Filipiński KK, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A, Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2, *Clin Cancer Res*, **14**, 3875-3880 (2008).
 - 22) Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C, Sasaki I, Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells, *Cancer Sci*, **100**, 903-913 (2009).
 - 23) Takenaka T, Yoshino I, Kouso H, Ohba T, Yohena T, Osoegawa A, Shoji F, Maehara Y, Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer, *Int J Cancer*, **121**, 895-900 (2007).
 - 24) Noma B, Sasaki T, Fujimoto Y, Serikawa M, Kobayashi K, Inoue M, Itsuki H, Kamigaki M, Minami T, Chayama K, Expression of multidrug resistance-associated protein 2 is involved in chemotherapy resistance in human pancreatic cancer, *Int J Oncol*, **33**, 1187-1194 (2008).
 - 25) Takizawa M, Kawakami K, Obata T, Matsumoto I, Ohta Y, Oda M, Sasaki T, Watanabe G, *In vitro* sensitivity to platinum-derived drugs is associated with expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human lung cancer, *Oncol Rep*, **15**, 1533-1539 (2006).
 - 26) Fujieda S, Tanaka N, Sunaga H, Noda I, Sugimoto C, Tsuzuki H, Saito H, Expression of hMSH2 correlates with *in vitro* chemosensitivity to CDDP cytotoxicity in oral and oropharyngeal carcinoma, *Cancer Lett*, **132**, 37-44 (1998).
 - 27) Lan L, Hayashi T, Rabeya RM, Nakajima S, Kanno S, Takao M, Matsunaga T, Yoshino M, Ichikawa M, Riele H, Tsuchiya S, Tanaka K, Yasui A, Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 complexes

- for resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in mammalian cells, *DNA Repair (Amst)*, **3**, 135-143 (2004).
- 28) Ando T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Sugito N, Mori R, Ogawa R, Katada T, Fujii Y, Relationship between expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in esophageal carcinoma cell lines, *Dis Esophagus*, **2**, 15-20 (2008).
- 29) Reidling JC, Subramanian VS, Dahhan T, Sadat M, Said HM, Mechanisms and regulation of vitamin C uptake: studies of the hSVCT systems in human liver epithelial cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **295**, 1217-1227 (2008).
- 30) Nishimura M, Koeda A, Morikawa H, Satoh T, Narimatsu S, Naito S, Comparison of inducibility of multidrug resistance (MDR)1, multidrug resistance-associated protein (MRP)1, and MRP2 mRNAs by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes, *Biol Pharm Bull*, **31**, 2068-2072 (2008).
- 31) Maubon N, Le Vee M, Fossati L, Audry M, Le Ferrec E, Bolze S, Fardel O, Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR, *Fundam Clin Pharmacol*, **21**, 659-663 (2007).
- 32) Dauchy S, Miller F, Couraud PO, Weaver RJ, Weksler B, Romero IA, Scherrmann JM, De Waziers I, Declèves X, Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells, *Biochem Pharmacol*, **77**, 897-909 (2009).
- 33) Shimizu J, Horio Y, Osada H, Hida T, Hasegawa Y, Shimokata K, Takahashi T, Sekido Y, Yatabe Y, mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines, *Respirology*, **13**, 510-517 (2008).
- 34) Sliwinski T, Krupa R, Majsterek I, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Zadrozny M, Blasiak J, Polymorphisms of the BRCA2 and RAD51 genes in breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, **94**, 105-109 (2005).
- 35) Amirrad M, Al-Mulla F, Varadharaj G, John B, Saji T, Anim JT, BRCA1 gene expression in breast cancer in Kuwait: correlation with prognostic parameters, *Med Princ Pract*, **14**, 67-72 (2005).
- 36) Müller A, Zielinski D, Friedrichs N, Oberschmid B, Merkelbach-Bruse S, Schackert HK, Linnebacher M, von Knebel Doeberitz M, Büttner R, Rüschoff J, Reduced mRNA expression in paraffin-embedded tissue identifies MLH1- and MSH2-deficient colorectal tumours and potential mutation carriers, *Virchows Arch*, **453**, 9-16 (2008).
- 37) Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL, Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics, *Mol Carcinog*, **45**, 164-174 (2006).
- 38) Uthus EO, Reeves PG, Saari JT, Copper deficiency decreases plasma homocysteine in rats, *J Nutr*, **137**, 1370-1374 (2007).
- 39) Hoang YD, Avakian AP, Luderer U, Minimal ovarian upregulation of glutamate cysteine ligase expression in response to suppression of glutathione by buthionine sulfoximine, *Reprod Toxicol*, **21**, 186-196 (2006).
- 40) Gustavsson B, Kaiser C, Carlsson G, Wettergren Y, Odin E, Lindskog EB, Niyikiza C, Ma D, Molecular determinants of efficacy for 5-FU-based treatments in advanced colorectal cancer: mRNA expression for 18 chemotherapy-related genes, *Int J Cancer*, **124**, 1220-1226 (2006).

- 41) Yoshinare K, Kubota T, Watanabe M, Wada N, Nishibori H, Hasegawa H, Kitajima M, Takechi T, Fukushima M, Gene expression in colorectal cancer and *in vitro* chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens, *Cancer Sci*, **94**, 633-638 (2003).
- 42) Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, Moriwaki T, Shimoda T, Kajiwara T, Nakajima TE, Kato K, Hamaguchi T, Shimada Y, Okayama Y, Oka T, Shirao K, Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer, *Br J Cancer*, **98**, 832-839 (2008).
- 43) Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG, Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, *Mutat Res*, **711**, 193-201 (2011).
- 44) Byers T, Guerrero N, Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention, *Am J Clin Nutr*, **62**, 1385S-1392S (1995).
- 45) Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA, A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters, *Nature*, **399**, 70-75 (1999).
- 46) Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G, Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *Br J Pharmacol*, **157**, 1097-1110 (2009).
- 47) Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV, SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake, *Amino Acids*, **34**, 347-355 (2008).
- 48) Savini I, Rossi A, Catani MV, Ceci R, Avigliano L, Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes, *Biochem Biophys Res Commun*, **361**, 385-390 (2007).
- 49) Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, Nieters A, Hubbard A, Paynter RA, Skibola DR, Agana L, Becker N, Tressler P, Forrest MS, Sankararaman S, Conde L, Holly EA, Smith MT, Polymorphisms in the estrogen receptor 1 and vitamin C and matrix metalloproteinase gene families are associated with susceptibility to lymphoma, *PLoS One*, **3**, e2816 (2008).
- 50) Chen AA, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, McClean MD, Smith JF, Bryan JT, Posner MR, Nelson HH, Kelsey KT, Genetic variation in the vitamin C transporter, SLC23A2, modifies the risk of HPV16-associated head and neck cancer, *Carcinogenesis*, **30**, 977-981 (2009).
- 51) Erichsen HC, Peters U, Eck P, Welch R, Schoen RE, Yeager M, Levine M, Hayes RB, Chanock S, Genetic variation in sodium-dependent vitamin C transporters SLC23A1 and SLC23A2 and risk of advanced colorectal adenoma, *Nutr Cancer*, **60**, 652-659 (2008).
- 52) Wright ME, Andreotti G, Lissowska J, Yeager M, Zatonski W, Chanock SJ, Chow WH, Hou L, Genetic variation in sodium-dependent ascorbic acid transporters and risk of gastric cancer in Poland, *Eur J Cancer*, **45**, 1824-1830 (2009).
- 53) Abdel-Latif MM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds JV, Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro, *J Chemother*, **17**, 539-549 (2005).
- 54) Miki I, Tamura T, Nakamura T, Makimoto H, Hamana N, Uchiyama H, Shirasaka D, Morita Y, Yamada H, Aoyama N, Sakaeda T, Okumura K, Kasuga M, Circadian variability of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and

- CLOCK T3111C genetic polymorphism in patients with esophageal carcinoma, *Ther Drug Monit*, **27**, 369-374 (2005).
- 55) Okuno T, Tamura T, Yamamori M, Chayahara N, Yamada T, Miki I, Okamura N, Kadowaki Y, Shirasaka D, Aoyama N, Nakamura T, Okumura K, Azuma T, Kasuga M, Sakaeda T, Favorable genetic polymorphisms predictive of clinical outcome of chemoradiotherapy for stage II/III esophageal squamous cell carcinoma in Japanese, *Am J Clin Oncol*, **30**, 252-257 (2007).
- 56) Sakaeda T, Yamamori M, Kuwahara A, Hiroe S, Nakamura T, Okumura K, Okuno T, Miki I, Chayahara N, Okamura N, Tamura T, VEGF G-1154A is predictive of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese patients, *Ther Drug Monit*, **30**, 497-503 (2008).
- 57) Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Tamura T, Kadoyama K, Okamura N, Nakamura T, Sakaeda T, TNFRSF1B A1466G genotype is predictive of clinical efficacy after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma, *J Exp Clin Cancer Res*, **29**, 100 (2010).
- 58) Miki I, Nakamura T, Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Tamura T, Okuno T, Omatsu H, Mizuno S, Hirai M, Azuma T, Sakaeda T, THRB genetic polymorphisms can predict severe myelotoxicity after definitive chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Int J Med Sci*, **9**, 748-756 (2012).
- 59) Kuwahara A, Yamamori M, Kadoyama K, Nishiguchi K, Nakamura T, Miki I, Tamura T, Okuno T, Omatsu H, Sakaeda T, Effects of plasma concentrations of 5-fluorouracil on long-term survival after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma, *J Exp Clin Cancer Res*, **30**, 94 (2011).
- 60) Tamura T, Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Nakamura T, Okuno T, Miki I, Manabe Y, Sakaeda T, VEGF-634C/G genotype is predictive of long-term survival after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Int J Med Sci*, **9**, 833-837 (2012).
- 61) Tahara M, Ohtsu A, Hironaka S, Boku N, Ishikura S, Miyata Y, Ogino T, Yoshida S, Clinical impact of criteria for complete response (CR) of primary site to treatment of esophageal cancer, *Jpn J Clin Oncol*, **35**, 316-323 (2005).
- 62) Ohtsu A, Boku N, Muro K, Chin K, Muto M, Yoshida S, Satake M, Ishikura S, Ogino T, Miyata Y, Seki S, Kaneko K, Nakamura A, Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus, *J Clin Oncol*, **17**, 2915-2921 (1999).
- 63) Kaneko K, Ito H, Konishi K, Kurahashi T, Ito T, Katagiri A, Yamamoto T, Kitahara T, Mizutani Y, Ohtsu A, Mitamura K, Definitive chemoradiotherapy for patients with malignant stricture due to T3 or T4 squamous cell carcinoma of the oesophagus, *Br J Cancer*, **88**, 18-24 (2003).
- 64) Ishikura S, Nihei K, Ohtsu A, Boku N, Hironaka S, Mera K, Muto M, Ogino T, Yoshida S, Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus, *J Clin Oncol*, **21**, 2697-2702 (2003).

- 65) Kumezawa Y, Kaneko K, Ito H, Kurahashi T, Konishi K, Katagiri A, Yamamoto T, Kuwahara M, Kubota Y, Muramoto T, Mizutani Y, Imawari M, Late toxicity in complete response cases after definitive chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma, *J Gastroenterol*, **41**, 425-432 (2006).
- 66) Doroshow JH, Redox modulation of chemotherapy-induced tumor cell killing and normal tissue toxicity, *J Natl Cancer Inst*, **98**, 223-225 (2006).
- 67) Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, Yamamoto M, Yoshida T, Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **108**, 40-45 (2011).
- 68) García-de-la-Asunción J, Gómez-Cambronero LG, Del Olmo ML, Pallardó FV, Sastre J, Viña J, Vitamins C and E prevent AZT-induced leukopenia and loss of cellularity in bone marrow. Studies in mice, *Free Radic Res*, **41**, 330-334 (2007).
- 69) de la Asunción JG, del Olmo ML, Sastre J, Millán A, Pellín A, Pallardó FV, Viña J, AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. Prevention by antioxidant vitamins, *J Clin Invest*, **102**, 4-9 (1998).
- 70) de la Asunción JG, del Olmo ML, Sastre J, Pallardó FV, Viña J, Zidovudine (AZT) causes an oxidation of mitochondrial DNA in mouse liver, *Hepatology*, **29**, 985-987 (1999).
- 71) de la Asunción JG, del Olmo ML, Sastre J, Pallardó FV, Viña J, AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C and E, *Life Sci*, **76**, 47-56 (2004).
- 72) Eck P, Erichsen HC, Taylor JG, Yeager M, Hughes AL, Levine M, Chanock S, Comparison of the genomic structure and variation in the two human sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1 and SLC23A2, *Hum Genet*, **115**, 285-294 (2004).
- 73) Do TN, Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Morrison BA, Dorak MT, An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males, *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 292-300 (2010).
- 74) Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM, A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science*, **315**, 525-528 (2007).
- 75) Banno K, Iida M, Yanokura M, Irie H, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D, Drug repositioning for gynecologic tumors: A new therapeutic strategy for cancer, *Scientific World Journal*, **2015**, 341362 (2015).
- 76) Aragon-Ching JB, Li H, Gardner ER, Figg WD, Thalidomide analogues as anticancer drugs, *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **2**, 167-74 (2007).
- 77) Stresing V, Daubiné F, Benzaid I, Mönkkönen H, Clézardin P, Bisphosphonates in cancer therapy, *Cancer Lett*, **257**, 16-35 (2007).
- 78) van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S, Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates, *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 108-111 (1999).

- 79) Senaratne SG, Mansi JL, Colston KW, The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells, *Br J Cancer*, **86**, 1479-1486 (2002).
- 80) Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I, Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines, *Cancer Lett*, **246**, 308-312 (2007).
- 81) Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW, Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines, *Br J Cancer*, **82**, 1459-68 (2000).
- 82) Matsumoto S, Kimura S, Segawa H, Kuroda J, Yuasa T, Sato K, Nogawa M, Tanaka F, Maekawa T, Wada H, Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines, *Lung Cancer*, **47**, 31-39 (2005).
- 83) Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, Barone C, Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line, *Cell Prolif*, **44**, 139-146 (2011).
- 84) Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Sato K, Matsumoto S, Nogawa M, Yuasa T, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Ottmann OG, Maekawa T, p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid, *Cancer Sci*, **95**, 186-192 (2004).
- 85) Fujita M, Tohi M, Sawada K, Yamamoto Y, Nakamura T, Yagami T, Yamamori M, Okamura N, Involvement of the mevalonate pathway in the antiproliferative effect of zoledronate on ACHN renal cell carcinoma cells, *Oncol Rep*, **27**, 1371-1376 (2012).
- 86) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Kuroda J, Segawa H, Sato K, Yokota A, Koizumi M, Maekawa T, Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells, *Oncol Res*, **15**, 1-9 (2005).
- 87) Crick DC, Andres DA, Waechter CJ, Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation, *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 483-487 (1997).
- 88) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**, 265-275 (1951).
- 89) Kubista B, Trieb K, Sevelde F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, Elbling L, Sutterlüty H, Scotlandi K, Kotz R, Micksche M, Berger W, Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells, *J Orthop Res*, **24**, 1145-1152 (2006).
- 90) Iguchi T, Miyakawa Y, Saito K, Nakabayashi C, Nakanishi M, Saya H, Ikeda Y, Kizaki M, Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells, *Int J Oncol*, **31**, 285-291 (2007).
- 91) Romani AA, Desenzani S, Morganti MM, La Monica S, Borghetti AF, Soliani P, Zoledronic acid determines S-phase arrest but fails to induce apoptosis in cholangiocarcinoma cells, *Biochem Pharmacol*, **78**, 133-141 (2009).

- 92) Koto K, Murata H, Kimura S, Sawai Y, Horie N, Matsui T, Ryu K, Ashihara E, Maekawa T, Kubo T, Fushiki S, Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced apoptosis against human fibrosarcoma cells by inhibiting radioadaptive signaling, *Int J Oncol*, **42**, 525-534 (2013).
- 93) Chuah C, Barnes DJ, Kwok M, Corbin A, Deininger MW, Druker BJ, Melo JV, Zoledronate inhibits proliferation and induces apoptosis of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells, *Leukemia*, **19**, 1896-1904 (2005).
- 94) Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, Ueno Y, Minami S, Yokouchi M, Komiya S, Efficacy of the third-generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines, *Anticancer Res*, **28**, 2147-2154 (2008).
- 95) Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ, Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy, *Osteoporos Int*, **19**, 733-759 (2008).
- 96) Guo RT, Cao R, Liang PH, Ko TP, Chang TH, Hudock MP, Jeng WY, Chen CK, Zhang Y, Song Y, Kuo CJ, Yin F, Oldfield E, Wang AH, Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases, *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 10022-10027 (2007).
- 97) Li S, De Souza P, Ras isoprenylation and pAkt inhibition by zoledronic acid and fluvastatin enhances paclitaxel activity in T24 bladder cancer cells, *Cancers (Basel)*, **3**, 662-674 (2011).
- 98) Ho CL, Wang JL, Lee CC, Cheng HY, Wen WC, Cheng HH, Chen MC, Antroquinonol blocks Ras and Rho signaling via the inhibition of protein isoprenyltransferase activity in cancer cells, *Biomed Pharmacother*, **68**, 1007-1014 (2014).
- 99) Goffinet M, Thoulouzan M, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Weinbaum C, Faye JC, Séronie-Vivien S, Zoledronic acid treatment impairs protein geranyl-geranylation for biological effects in prostatic cells, *BMC Cancer*, **6**, 60 (2006).
- 100) Stork PJ. Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends Biochem Sci*, **28**, 267-275 (2003).
- 101) Holstein SA, Wohlford-Lenane CL, Hohl RJ, Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins, *Biochemistry*, **41**, 13698-13704 (2002).
- 102) Tsubaki M, Itoh T, Satou T, Imano M, Komai M, Ogawa N, Mukai J, Nishida S, Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of Ras signaling pathways and Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway, *Biochem Pharmacol*, **85**, 163-172 (2013).
- 103) Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouysségur J, Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway, *J Biol Chem*, **271**, 20608-20616 (2013).
- 104) Ezra A, Golomb G, Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption, *Adv Drug Deliv Rev*, **42**, 175-195 (2000).
- 105) Inoue S, Arai N, Tomihara K, Takashina M, Hattori Y, Noguchi M, Extracellular Ca²⁺-dependent enhancement of cytotoxic potency of zoledronic acid in human oral cancer cells, *Eur J Pharmacol*, **761**, 44-54 (2015).
- 106) Advani SH, Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy, *Indian J Med Paediatr Oncol*, **31**, 132-136 (2010).

- 107)Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Ryu K, Sakabe T, Itoi M, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T, Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents, *Oncol Rep*, **24**, 233-239 (2010).
- 108)Ibrahim T, Liverani C, Mercatali L, Sacanna E, Zanoni M, Fabbri F, Zoli W, Amadori D, Cisplatin in combination with zoledronic acid: a synergistic effect in triple-negative breast cancer cell lines, *Int J Oncol*, **42**, 1263-1270 (2013).
- 109)Pérez-Zúñiga FJ, Günther Sillero MA, Sillero A, Bisphosphonates activate the 5-fluorouracil/uracil phosphoribosyltransferase activity present in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts: implications for tumor treatments, *Biochem Pharmacol*, **76**, 825-830 (2008).