

# 学位論文審査結果の報告書

氏名 岡 尚宏

生年月日 昭和61年12月19日

本籍(国籍) 大阪府

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 医第1338号

学位授与の条件  
(博士の学位) 学位規程第5条該当

## 論文題目

Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin

(アスコルビン酸によるヒト骨肉腫細胞のシスプラチニン感受性増強効果の解明)

学位論文受理日 2020年 10月 30日

学位論文審査終了日 2021年 1月 28日

審査委員(主査) 中川和彦 

(副主査) 西尾和人 

(副主査) 安田卓司 

(副査) 

指導教員 赤木將男 

## 論文内容の要旨

### 【目的】

小児骨肉腫は予後不良の悪性疾患である。多剤併用療法により予後は大幅に改善しているが依然として完全寛解に至らない例もあり更なる抗がん剤治療の発展は必須である。近年 抗酸化物質であるアスコルビン酸(AscA)が活性酸素(ROS)を介し抗腫瘍効果を示す事が報告されているが、その詳細な作用メカニズムに関しては不明な部分が多い。また骨肉腫における AscA 併用療法の検討は十分に為されていない。本研究では骨肉腫の化学療法において重要な抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)と AscA を用いて、骨肉腫に対する ROS 産生を中心とした抗腫瘍効果について細胞の代謝経路に着目して検証した。

### 【方法】

ヒト骨肉腫細胞株(U2OS、143B)とヒト正常細胞株(IMR90)に対する CDDP と AscA による増殖抑制効果を WST アッセイを用いて評価した。CDDP と AscA を単独あるいは組み合わせて使用し、ROS 産生量と ROS により惹起される DNA 二重鎖切断をフローサイトメーターと  $\gamma$ H2AX に対する細胞免疫染色法を用いて検討した。また薬剤投与による U2OS 細胞の糖・エネルギー代謝の変化を細胞外フラックスアナライザーで測定した。次いで代謝制御遺伝子発現の変化を定量 PCR 法にて評価した。さらに腫瘍の抗がん剤耐性化に関係しているとされているがん幹細胞に対する抗腫瘍効果を Sphere 形性能を用いて評価した。

上記とは別に U2OS 細胞を CDDP 濃度を漸増しながら 6 ヶ月以上に渡り継代培養し、CDDP 耐性骨肉腫細胞株(CisLS-U2OS 細胞)を独自に樹立した。CisLS-U2OS 細胞と親株細胞の遺伝子発現を RNA シークエンス法を用いて比較解析し、代謝変化も検討した。

### 【結果】

WST アッセイより増殖抑制効果を検討したところ、CDDP と AscA の併用により U2OS 細胞と 143B 細胞の増殖が相乗的に抑制された。しかしヒト正常細胞である IMR90 細胞では AscA による相乗効果は認められなかった。

CDDP と AscA の併用により濃度・時間依存的に細胞内 ROS 産生量が増加し、それに伴い核内 DNA の損傷が誘導される事が確認された。DNA 損傷は ROS スカベンジャーである NAC の投与により有意に抑制された。

代謝の変化に着目すると、CDDP と AscA の併用により解糖系は亢進したが、逆にミトコンドリア機能は低下した。遺伝子発現解析でも CDDP と AscA の併用により解糖系を制御する遺伝子群の発現量が増加する事が確認された。この遺伝子発現変化は NAC 投与により有意に抑制された。Sphere 形性能の評価では CDDP と AscA の併用はそれらの単独使用に比べて形成される sphere の数・大きさ共に抑制した。

CisLS-U2OS の解析では細胞外フラックスアナライザーおよび RNA シークエンスいずれもミトコンドリア機能と解糖系の亢進を示した。これより U2OS の CDDP 耐性化には細胞の代謝変化が重要である事が示唆された。また AscA 添加により CisLS-U2OS 細胞の CDDP 感受性が回復した。以上より CDDP・AscA 併用療法が抗がん剤耐性株にも有効である事が強く示唆された。

### 【考察および結論】

上記の実験結果より骨肉腫の周術期化学療法において従来の抗腫瘍薬である CDDP に加えて抗酸化物質 AscA を併用する事が有効な治療法となりうる可能性があると考えられる。

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類および名称
	2020年7月29日 公表 (DOI:10.1002/prp2.632)	博士学位論文 Pharmacology Research & Perspectives
	全文	Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin.

## 論文審査結果の要旨

### 1) 論文内容の要旨

【目的】小児骨肉腫は予後不良の悪性疾患である。多剤併用療法により予後は大幅に改善しているが依然として完全寛解に至らない例もあり、更なる抗がん剤治療の発展は必須である。近年 抗酸化物質であるアスコルビン酸(AscA)が活性酸素(ROS)を介し抗腫瘍効果を示す事が報告されているが、その詳細な作用メカニズムに関しては不明な部分が多い。また骨肉腫におけるAscA併用療法の検討は十分に為されていない。本研究では骨肉腫の化学療法において重要な抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)とAscAを用いて、骨肉腫に対するROS産生を中心とした抗腫瘍効果について細胞の代謝経路に着目して検証した。

【方法】ヒト骨肉腫細胞株(U2OS、143B)とヒト正常細胞株(IMR90)に対するCDDPとAscAによる増殖抑制効果を、WSTアッセイを用いて評価した。CDDPとAscAを単独あるいは組み合わせて使用し、ROS産生量とROSにより惹起されるDNA二重鎖切断をフローサイトメーターとγH2AXに対する細胞免疫染色法を用いて検討した。また薬剤投与によるU2OS細胞の糖・エネルギー代謝の変化を細胞外フラックスアナライザーで測定した。次いで代謝制御遺伝子発現の変化を定量PCR法にて評価した。さらに腫瘍の抗がん剤耐性化に関係しているとされているがん幹細胞に対する抗腫瘍効果をSphere形成能を用いて評価した。

上記とは別にU2OS細胞をCDDP濃度を漸増しながら6ヶ月以上に亘り継代培養し、CDDP耐性骨肉腫細胞株(CisLS-U2OS細胞)を独自に樹立した。CisLS-U2OS細胞と親株細胞の遺伝子発現をRNAシークエンス法を用いて比較解析し、代謝変化を検討した。

【結果】WSTアッセイより増殖抑制効果を検討したところ、U2OS細胞と143B細胞の増殖がCDDPとAscAの併用により相乗的に抑制された。しかしひと正常細胞であるIMR90細胞では、CDDPとAscAの併用による相乗効果は認められなかった。CDDPとAscAの併用により濃度・時間依存的に細胞内ROS産生量が増加し、それに伴い核内DNAの損傷が誘導される事が確認された。DNA損傷はROSスカベンジャーであるNeo Adjuvant Chemotherapy(NAC)の投与により有意に抑制された。代謝の変化に着目すると、CDDPとAscAの併用により解糖系は亢進したが、逆にミトコンドリア機能は低下した。遺伝子発現解析でも、CDDPとAscAの併用により解糖系を制御する遺伝子群の発現量が増加する事が確認された。この遺伝子発現変化はNAC投与により有意に抑制された。Sphere形成能の評価ではCDDPとAscAの併用はそれらの単独使用に比べて形成されるsphereの数・大きさ共に抑制した。CisLS-U2OSの解析では、細胞外フラックスアナライザーおよびRNAシークエンス解析のいずれもミトコンドリア機能と解糖系の亢進を示した。これよりU2OSのCDDP耐性化には細胞の代謝変化が重要である事が示唆された。またAscA添加によりCisLS-U2OS細胞のCDDP感受性が回復した。以上よりCDDP・AscA併用療法が抗がん剤耐性株にも有効である事が強く示唆された。

【考察および結論】上記の実験結果より、骨肉腫の周術期化学療法において従来の抗腫瘍薬であるCDDPに加えて抗酸化物質AscAを併用する事が有効な治療法となりうる可能性があると考えられる。

本論文は骨肉腫の化学療法において重要な抗がん剤であるCDDPと代表的な抗酸化物質であるAscAの併用療法が、骨肉腫に対して有効である可能性を論じたものである。骨肉腫は小児に好発する悪性の骨腫瘍であり、治療は手術と周術期の化学療法が行われている。現在 化学療法として広く行われているプロトコールであるNECO-95Jの導入により予後は大幅に改善しているが、依然として治療不応例や副作用などの問題もあり、プロトコールの更なる改善が必要と考えられる。

現在に至るまで、多くの報告でAscAの抗腫瘍効果が指摘されている。また近年その作用機序にROSの関係が示唆されているが、その詳細な機序はまだ不明な点が多い。学位申請者は骨肉腫細胞株に対するCDDP・AscA併用療法の効果と、そのメカニズムの解析を行った。

論文では骨肉腫細胞株を用いて、CDDP・AscA併用により生細胞率の低下を確認した。またその過程でROSが産生されることをフローサイトメトリーを用いて確認し、それに伴うDNA損傷を免疫学的染色により確認した。更に細胞外フラックスアナライザーを用いて、CDDP・AscA併用により細胞のエネルギー代謝が変化(解糖系の亢進及びミトコンドリア機能の低下)することを確認した。

また、癌の再発や抗がん剤耐性に関与するとされている「がん幹細胞」に対してCDDP・AscA併用療法が有効であることを、sphere formation assayを用いて確認した。今回の論文ではin vitroでの実験に留まったが、今後in vivoでも同様の結果が得られれば、実際の骨肉腫治療においてもCDDP・AscA併用療法がその予後改善に大きく寄与する可能性があると考えられる。

更に申請者は、骨肉腫の治療上問題となるCDDP耐性化例に対してもCDDP・AscA併用療法が有効であるか否かを検討するために、独自にCDDP耐性骨肉腫細胞株を樹立した。樹立した骨肉腫細胞株に対してCDDP・AscA併用療法を行ったところ、CDDP単独使用時よりも骨肉腫細胞の生細胞率低下が確認された。更にRNAシークエンスを用いることで、作成したCDDP耐性骨肉腫細胞株の遺伝学的特性を解析した。その結果、CDDP耐性骨肉腫株ではエネルギー代謝（解糖系とミトコンドリア機能）が通常の骨肉腫細胞株よりも亢進していることが明らかになった。他にもMYC関連遺伝子やリボソーム生合成関連の遺伝子も亢進していた。これは過去の報告におけるCDDP耐性腫瘍細胞の特徴に一致しているおり、筆者らの樹立した耐性株がCDDP耐性を獲得した事を裏付ける結果であると考えられる。

## 2) 審査結果の要旨

本論文に対する最終試験は、令和2年12月23日の午後4時から小講堂で実施された。最終試験では申請者から本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察が発表され、それに対して主査である中川、副主査である西尾教授、安田教授がいくつかの疑問点を質問した。中川からは、CDDP耐性骨肉腫株がCDDP・AscA併用により、CDDPに対する感受性が復活する機序に対する考察について質問がされた。西尾教授からは、申請者は論文においてsphere formation assayにより形成された細胞塊をがん幹細胞として論じているが、それは果たして本当に正しいのか、がん幹細胞特有の細胞マーカーなどの検討は行わなかったのか、などの質問がされた。安田教授からは、本研究で使用したCDDPおよびAscAの濃度が実際の臨床において体内の血中濃度として再現可能であるか、またCDDP・AscA併用における骨肉腫細胞のエネルギー代謝の変化に申請者が着目するに至った経緯などが質問された。

これらの質問に対し申請者は、具体的な例を挙げながら極めて的確に応答した。また論文内容から骨肉腫細胞におけるROSの分子生物学的な知識や、それらを実際に実験で解析する技能についても卓越したものを持つことが確認された。

したがって、主査・副主査は合議の上、提出された論文が確かに岡氏の研究成果であること、学位授与にふさわしい研究指導能力を持つものと判断し、最終試験を合格と判定した。

## 3) 最終試験の結果：

合格

## 4) 学位授与の可否：

可