

氏名	長谷川 利聡
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6155号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Lactate Transporter Monocarboxylate Transporter 4 Induces Bone Pain in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (乳酸輸送体モノカルボン酸トランスポーター4は頭頸部扁平上皮癌における骨痛を誘発する)
論文審査委員	沢 楨彦 教授 岡元 邦彰 教授 松村 達志 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

頭頸部扁平上皮癌は、乳癌、前立腺癌、多発性骨髄腫などと同様に、腫瘍が骨に浸潤し癌性骨痛を誘発することが知られている。がん臨床において癌性骨痛は難治性であり、その制御は患者のQOL向上を考える上で、極めて重要な課題である。

悪性新生物はエネルギー産生を好氣的な条件下においても嫌気性解糖系に依存しており、これはWarburg効果として知られている。嫌気性解糖系の最終代謝産物である乳酸は、monocarboxylate transporter 4 (以下:MCT4) を介して細胞外に放出され、腫瘍周囲の微小環境を酸性にし、組織の酸性化は癌性疼痛の原因の一つであることが知られている。

一方で、近年、中枢神経系において乳酸が重要なエネルギー源であることが明らかとなった。

本研究では、乳酸の細胞外輸送体であるMCT4の発現低下と頭頸部扁平上皮癌の癌性骨痛との関係性を検討した。

【方法と結果】

1) 頭頸部扁平上皮癌と頭頸部正常組織でのMCT4発現の検討。

頭頸部扁平上皮癌と頭頸部正常組織でのMCT4発現を比較するため、頭頸部扁平上皮癌の組織アレイを用いて免疫学的染色を行った。頭頸部正常組織に比較して頭頸部扁平上皮癌ではMCT4が高発現していた。

2) 実験系に用いる口腔扁平上皮癌細胞株の決定。

口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19におけるMCT4発現をウエスタンブロット法により検討した。SASにおいてMCT4が最も高発現していることを確認し、以下の実験はSASを用いて行うこととした。

3) MCT4発現抑制細胞株の作製。

エレクトロポレーション法を用いてSASに対してshRNAを導入しMCT4発現抑制細胞株を作製した。コントロールとして同様にcontrol shRNAを導入した細胞株を作製した。MCT4の発現低下は蛍光免疫学的染色ならびにウエスタンブロット法により確認した。

4) in vitro における検討。

i) 増殖能、コンディションメディウム中の乳酸濃度ならびにpHの測定。

親株、control shRNA導入株、MCT4の発現抑制株をそれぞれ培養し、増殖能に対する検討を行った。また、コンディションメディウム中の乳酸濃度ならびにpHを測定した。増殖

能に有意な差は認めなかったが、MCT4発現抑制株で有意な乳酸濃度の低下とpHの低下抑制を認めた。

ii) 知覚神経への影響の検討。

MCT4発現抑制が知覚神経に与える影響を検討するために、ラット脊髄後根神経節の初代培養株と作製したそれぞれのSASを共培養した。コントロールとして共培養せず脊髄後根神経節のみを培養した群を作製した。5日間培養後、カルセインを用いて染色し蛍光により知覚神経軸索伸長を測定した。親株、control shRNA導入株と比較して、MCT4発現抑制株と共培養した神経細胞の軸索伸長は有意に抑制されていた。

5) in vivo における検討

これまでの結果を踏まえ、BALB/c-nu/nu右脛骨骨髓腔にそれぞれのSASを移植し癌骨浸潤モデルを作製し、MCT4発現抑制が癌性骨痛に与える影響ならびに知覚神経に与える影響に関して検討を行った。コントロールとして同様の手術を行った偽術群を作製した。移植後1日、3日、5日、7日に熱感受性試験を行った。術後7日目で、MCT4発現抑制株を移植した群において、癌性骨痛が有意に抑制されていることが確認された。術後8日の時点で、右脛骨骨髓の腫瘍増大を確認するために軟X線写真を撮影し、ImageJにより骨破壊病変の範囲を測定した。有意差は認めなかったものの、MCT4発現抑制株を移植した群において腫瘍増殖が抑制される傾向にあった。

同日、マウスを屠殺し心臓採血により全身の乳酸濃度の測定を行い、骨髓液採取により腫瘍局所の乳酸濃度の測定を行った。全身の乳酸濃度に有意な差は認めなかったが、腫瘍局所の乳酸濃度は、MCT4発現抑制株移植群で有意に低下していた。

また、脊髄後根神経節を採取し、ウエスタンブロット法ならびに蛍光免疫学的染色にてpERK1/2の発現ならびに、酸感受性受容体 transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (以下:TRPV1)の発現を測定した。MCT4発現抑制株移植群ではpERK1/2ならびにTRPV1の発現が有意に抑制されており、知覚神経の興奮を抑制していることが明らかとなった。

【結論と考察】

口腔扁平上皮癌細胞株であるSASはMCT4を介して乳酸を細胞外に放出することで、腫瘍周囲の微小環境を酸性化していた。周囲微小環境の酸性化あるいは乳酸そのものが、知覚神経に存在する酸感受性受容体であるTRPV1発現の亢進を促し、癌性骨痛の原因の一つとなっている可能性が示唆された。

頭頸部扁平上皮癌の癌性骨痛制御の一つとして、MCT4が治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

今後の研究課題として、MCT4が腫瘍周囲の微小環境酸性化にどの程度寄与しているか、放出された乳酸が知覚神経や周囲微小環境においてどのようにふるまうのかを検討する必要があると考えられた。

論文審査結果の要旨

悪性新生物はエネルギー産生を好氣的な条件下においても、Warburg 効果として知られている嫌気性解糖系に依存している。嫌気性解糖系の最終代謝産物である乳酸は、monocarboxylate transporter 4 (MCT4) を介して細胞外に放出され、腫瘍周囲の微小環境を酸性化する。組織の酸性化は癌性疼痛の原因の一つとされ、頭頸部扁平上皮癌の治療において、腫瘍顎骨浸潤による癌性骨痛は患者の QOL を損なう大きな課題となっている。そこで本研究では、乳酸の細胞外輸送体である MCT4 の発現低下と頭頸部扁平上皮癌の癌性骨痛との関係性を検討した。

組織アレイを用いた免疫染色の結果、頭頸部扁平上皮癌は頭頸部正常組織に比較して MCT4 を高発現していた。また、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19 における MCT4 発現をウエスタンブロット法により解析したところ、SAS において MCT4 の発現が高いことが確認された。そこで、エレクトロポレーション法を用いて SAS に対して shRNA を導入し MCT4 の発現を抑制した細胞株を作製した。MCT4 の発現低下は蛍光免疫染色により確認した。親株、sh control RNA 導入株、MCT4 の発現低下株それぞれを培養し、増殖能に対する検討を行い、培養上清中の乳酸濃度ならびに pH を測定した。増殖能に有意な差は認められなかったが、MCT4 発現抑制株で乳酸濃度の有意な低下と pH の上昇を認めた。

次に、MCT4 発現抑制が知覚神経に与える影響を検討するために、ラット脊髄後根神経節の初代培養株と作製したそれぞれの SAS を共培養した。5 日間培養した後に、カルセインを用いて染色し知覚神経軸索伸長を測定した。親株、sh control RNA 導入株と比較して、MCT4 抑制株と共培養した神経細胞の軸索伸長は有意に抑制されていた。In vivo での解析として、BALB/c-nu/nu 右脛骨に SAS を移植し癌骨破壊モデルを作製し、MCT4 抑制が癌性骨痛に与える影響ならびに知覚神経に与える影響に関して検討した。コントロールとして同様の手術を行った sham 群を作製した。移植後 1 日、3 日、5 日、7 日に熱感受性試験を行ったところ、術後 7 日で MCT4 発現抑制株を移植した群において、癌性骨痛が抑制されていることが確認された。術後 8 日の時点でマウスを屠殺し、心臓採血により全身の乳酸濃度の測定を行い、骨髓液採取により腫瘍局所の乳酸濃度の測定を行ったところ、全身の乳酸濃度に有意な差は認めなかったが、腫瘍局所の乳酸濃度は、MCT4 発現抑制株で有意に低下していた。また、脊髄後根神経節を採取し、ウエスタンブロット法ならびに免疫蛍光染色にて pERK1/2 の発現ならびに TRPV1 の発現を測定した。MCT4 発現抑制株では pERK1/2 ならびに TRPV1 の発現が有意に抑制されており、知覚神経の興奮を抑制していることが明らかとなった。

頭頸部扁平上皮癌は MCT4 を介して乳酸を放出することで周囲微小環境を酸性化させていた。これにより、知覚神経に存在する酸感受性受容体である TRPV1 の発現が亢進し、癌性骨痛の原因の一つとなっている可能性が示唆された。本論文は、頭頸部扁平上皮癌の癌性骨痛制御の一つとして、MCT4 が治療のターゲットとなりうる可能性を示した最初の論文である。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。