

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
佐々木 朗 印	学位論文指導全般
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

口腔顎顔面外科学分野 専攻分野 腫瘍制御科学	身分 大学院生	氏名 長谷川 利聡
<p>Lactate Transporter Monocarboxylate Transporter 4 Induces Bone Pain in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</p> <p>(乳酸輸送体モノカルボン酸トランスポーター4は 論文題名 頭頸部扁平上皮癌における骨痛を誘発する)</p>		
論文内容の要旨 (2000字程度)		
<p>【緒言】</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>		
<p>【方法と結果】</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>		

## 論文内容の要旨（2000字程度）

### 4) in vitro における検討。

i) 増殖能，コンディションメディア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ア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。