



Title	酸性環境における癌細胞の性質変化ならびに酸性環境をターゲットとした新規抗癌剤の探索
Author(s)	千田, 正
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101540
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (千 田 正)

論文題名 酸性環境における癌細胞の性質変化ならびに酸性環境をターゲットとした新規抗癌剤の探索

論文内容の要旨

【諸言】

口腔癌治療は、主に外科療法・薬物療法・放射線療法の3種類の治療法があり、薬物療法は切除不能や再発症例において重要な役割を担っている。現在、口腔癌治療において、白金製剤、分子標的薬などが用いられているが、他の癌種と比較して治療薬の選択肢は少ない。また、いずれの薬物も癌細胞が作り出す特異的な環境である癌微小環境の影響により、効果が減弱すると考えられている。癌微小環境の特徴の1つに酸性環境が挙げられており、ヒトの扁平上皮癌組織のpHは6前後まで低下することが報告されている。酸性環境の成因は、低酸素環境における解糖系亢進の結果と、Warburg効果として知られる好氣的環境下においても解糖系が亢進するメカニズムによることが明らかにされ、近年では、脂質代謝経路や酸性環境への適応（酸中毒）といった酸性環境特異的な細胞特性が明らかになった。このように癌細胞は酸性環境に適応する事や独自の代謝経路を持つことで、癌細胞自身の生存を可能にしている。新たな口腔癌治療薬を開発する上で、微小環境を考慮する事は重要と考えられるが、薬剤耐性に関連する酸性環境での扁平上皮癌の細胞特性の解明および有用な薬物はほとんど明らかになっていない。

本研究では、癌微小環境の特徴である酸性環境での口腔扁平上皮癌の培養条件を確立し、その細胞特性の変化および既存薬の抗癌活性の変化を明らかにした上で、新たに酸性および中性環境でも抗癌活性を発揮する薬剤をFDA承認薬ライブラリにてスクリーニングすることで、臨床応用が可能な口腔扁平上皮癌の薬剤の同定を行った。

【材料と方法】

（酸性環境下での細胞培養）

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株（HSC3, HSC4）をDMEM培地（10%牛胎児血清）、37℃、5% CO₂下で培養した。DMEM培地のpHを調整しpH7.4（中性環境）と6.8（酸性環境）の培地を作製した。細胞を酸性環境で3日間、中性環境で2日間培養するというサイクルを1か月以上行い、酸性環境に順応させ、その後は酸性環境のみで培養した。そして、酸性環境下における扁平上皮癌細胞の増殖能、遊走能、形態の比較を行った。

（リアルタイムPCR）

酸性pH応答性遺伝子の発現を確認するために、酸性および中性環境下で培養したHSC3, HSC4からmRNAを抽出し、cDNAへと変換させ、リアルタイムPCRを用いて評価した。

（既存の口腔癌治療に使用されている薬剤の酸性環境下での抗癌活性）

酸性および中性環境下でHSC3とHSC4に対するCDDPと5-FUの抗癌活性を細胞増殖試験にて評価した。

（スクリーニング実験）

酸性および中性環境の両環境下で癌細胞の増殖抑制効果を有する薬剤を同定するために、FDA承認薬ライブラリー（1,134種類）を用いて、細胞増殖試験にてスクリーニングを行った。まず、酸性および中性環境下においてHSC3に対して抗癌活性（細胞生存率が-3SD以下）を有する薬剤をFDA承認薬ライブラリーから抽出した。次に、HSC3に対するスクリーニングで抽出した薬剤を用いて、酸性および中性環境下においてHSC4に対して抗癌活性を有する薬剤を抽出した。抽出された薬剤を、酸性および中性環境下で口腔扁平上皮癌に対し、抗癌活性を有する薬剤とした。HSC4に対する薬剤の抗癌活性の有無に関する基準は、HSC3の結果と同程度の細胞生存率とした。

（異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスによるアクリジンオレンジ分布分析）

5～6 週齢の雄性免疫不全BALB/c nu/nuマウスの背部皮下にヒト口腔扁平上皮癌細胞株（SAS）を細胞培養液で懸濁し、注射した。背部への腫瘍の形成を確認し、pH感受性染料であるアクリジンオレンジを尾静脈から注射した。2時間後、マウスを安楽死させ、背部皮下の腫瘍を摘出し、蛍光実体顕微鏡で観察を行った。

（異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにおける Auranofinの評価）

スクリーニングにより抽出された薬剤の1つであるAuranofinの抗癌活性を、異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスの体重と腫瘍体積の経過観察を行うことで評価した。21匹の5～6週齢の雄性免疫不全BALB/c nu/nuマウスの背部皮

下にヒト口腔扁平上皮癌細胞株（SAS-GFP）を細胞培養液で懸濁し、注射した。背部への腫瘍の形成を確認し、腫瘍体積が30～50mm³となった時点でマウスを対照群（PBS群）、CDDP群、Auranofin群の3つの群に分け、尾静脈から薬剤の投与を開始した。薬剤を投与する頻度は1週間に2度、計4回投与した。観察中、腫瘍が形成されなかった個体などを評価の対象から除外したところ、各群いずれも5匹が評価の対象となった。

（統計分析）

実験結果データは、平均値±標準偏差で表し、Student's t検定を用いて統計学的に比較を行った。p<0.05を統計学的有意差ありとした。

【結果】

異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにおけるマウス背部皮下の腫瘍内にアクリジンオレンジの集積が認められ、腫瘍塊内には酸性微小環境が存在することが示された。*in vitro*において、酸性および中性培養を行ったHSC3とHSC4において、酸性pH応答性遺伝子の発現をqPCRにて確認したところ、中性培養に比べて酸性培養を行ったHSC3とHSC4において酸性pH応答性遺伝子の発現が有意に亢進していたことから、HSC3とHSC4の酸性培養条件の確立とした。細胞増殖能は、酸性培養条件下において、HSC3では、播種後2日後から9日後までは中性培養と比較すると、増殖能の低下が認められたが、播種後10日で有意差はなくなった。一方で、HSC4では、中性培養と比較すると、増殖能が低下した。細胞遊走能は、酸性培養下にあるHSC3とHSC4は、いずれも中性培養下よりも遊走能が上昇していた。細胞の形態は、酸性培養下においては、HSC3とHSC4のいずれも細胞間隙が密になり、仮足が伸長し、形態は上皮様から紡錘形に変化する傾向が認められた。酸性培養を行っているHSC3とHSC4と中性培養を行っているHSC3とHSC4に対して、CDDPと5-FUの抗癌活性を細胞増殖試験にて比較したところ、CDDPと5-FUの酸性環境における抗癌活性の低下が示された。FDA承認薬1,134種類の内、HSC3の酸性環境下で抗癌活性を示した薬剤（標準偏差－3SD）は44種類、中性環境下で抗癌活性を示した薬剤は63種類であった。酸性環境下と中性環境下のいずれの条件下でも抗癌活性を示した薬剤は39種類であった。この39種類を用いてHSC4の酸性環境下と中性環境下で抗癌活性を示した薬剤はAuranofinを含む9種類が同定された。異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにてAuranofin投与群は、CDDP群と比較し、体重減少が少なかった。また、癌の体積の変化は、Auranofin群はPBS群と比較すると、有意な増殖抑制が認められた。一方で、CDDP群とAuranofin群の群間比較では癌の体積の変化に有意差は認められなかった。

【考察】

本研究では、口腔扁平上皮癌において、酸性環境下における細胞の変化を観察し、口腔癌治療の既存薬の酸性および中性環境下における抗癌活性の評価をし、酸性および中性環境下で抗癌活性を発揮する薬剤を探索し、異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにて薬剤の生体への影響および抗癌活性の評価を行った。

酸性環境下ではHSC3とHSC4は、増殖能が低下、遊走能が上昇、形態は間葉系様に変化した。これらのことから、酸性環境下において口腔扁平上皮癌細胞は、上皮間葉転換を起こしている可能性が示唆された。

酸性環境は薬物の薬効低下に関与するといわれており、本研究においても、*in vitro*で口腔癌治療において使用されているCDDPと5-FUの抗癌活性の低下を確認することができた。本研究では、アクリジンオレンジ分布分析の結果から、口腔扁平上皮癌組織に酸性環境が存在することが示されており、CDDP、5-FUなどの殺細胞性抗癌剤は、癌組織全体において十分に薬効を示すことができず、酸性環境の部位では癌細胞が残存する可能性が示唆された。

スクリーニングの結果から、酸性・中性環境下で既存薬よりも抗癌活性を示す薬剤が9種類同定され、その中のAuranofinに着目した結果、Auranofinの抗癌活性はCDDPと比較しても非劣性であり、生体毒性が少なく、酸性・中性環境下にて抗癌活性を発揮する薬剤である可能性が示唆された。以上から、Auranofinは、口腔扁平上皮癌に対する新たな治療薬となりうることが示された。

【結論】

本研究では、酸性環境下での口腔扁平上皮癌細胞の培養系を確立し、酸性環境における口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、遊走能、形態変化について検討したところ、酸性環境は口腔扁平上皮癌細胞の増殖能を低下させたが、遊走能を上昇させ、細胞形態においては、上皮様から紡錘形への変化といった間葉系細胞様の変化をきたした。

また、異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにて、腫瘍内には酸性環境が存在することが示され、酸性環境の薬剤耐性として*in vitro*にて口腔癌治療既存薬の抗癌活性が低下することが示された。

さらに、FDA承認薬ライブラリーを用いたスクリーニングから、pHに関わらず抗癌活性を示す薬剤を9種類同定し、その内の1つであるAuranofinの抗癌活性を検証したところ、Auranofinはドラッグリポジショニングによる、新たな口腔扁平上皮癌治療薬になり得ることが示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (千 田 正)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	鵜澤 成一
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	宇佐美 悠
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、癌微小環境の特徴の 1 つである酸性環境での口腔扁平上皮癌細胞の培養法を確立し、酸性環境における癌細胞の性質の変化を観察した。さらに、酸性・中性環境下で FDA 承認薬ライブラリーを用いた大規模スクリーニングを行い、pH 非依存性に抗癌活性を示す薬剤を同定し、異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにてその薬効を検討した。</p> <p>pH 6.8 の培地（酸性培地）で口腔扁平上皮癌細胞の長期培養を可能とする培養系を確立した。さらに、酸性・中性環境において抗癌活性を有する薬剤を 9 種類同定した。その内の 1 つである Auranofin は、異種移植口腔扁平上皮癌モデルマウスにおいて、CDDP と同等の抗癌活性を有していた。</p> <p>以上の研究結果は、今後、酸性環境下での口腔扁平上皮癌の研究に寄与し、口腔扁平上皮癌に対する新規治療薬の開発の一助となることを示している。</p> <p>よって、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			