

氏名・(本籍)	いし かわ のり ひさ 石 河 軌 久 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第855号
学位授与の日付	平成26年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Salinomycin sensitizes melanoma spheroids containing slow-cycling cells to the effects of arsenic trioxide (サリノマイシン細胞周期の遅い細胞を含むメラノーマ・スフェロイドの三酸化ヒ素に対する効果を鋭敏化する)
論文審査委員	(主査) 教授 羽 渕 友 則 (副査) 教授 南 谷 佳 弘 教授 柴 田 浩 行 教授 前 沢 千 早 (岩手医科大学)

学位論文内容要旨

Salinomycin sensitizes melanoma spheroids containing slow-cycling cells to the effects of arsenic trioxide

(サリノマイシンは細胞周期の遅い細胞を含むメラノーマ・スフェロイドの三酸化ヒ素に対する効果を鋭敏化する)

申請者氏名 石河 軌久

研究目的

化学療法後の再発は癌による死亡の主要な原因である。皮膚悪性腫瘍であるメラノーマに対する化学療法はこれまで、米国FDAが唯一認可したダカルバジンですら有意に生存率を上げるに至っておらず、多剤併用化学療法においても臨床試験で有効性が検証されたものはない。伝統的な化学療法は細胞周期の早い細胞に作用してきたが、細胞周期の遅い細胞（スローサイクリング細胞）はそれらの薬剤に抵抗性を示し、腫瘍の再発機構の重要な要因となっていることが示唆されてきた。本研究では、将来的に、メラノーマに対するより強固で長期的に使用できる標的治療を可能にするために、3次元構造を持つ球体状のメラノーマ細胞群（メラノーマ・スフェロイド）の特性評価を行い、スローサイクリング細胞を含む細胞集団を標的とした新たな化学療法の選択肢を検討した。

研究方法

生体のメラノーマ腫瘍塊に類似した性質を有する細胞群を得るため、寒天でコートした細胞培養皿を用い、B27 サプリメント、LIF, DIF, bFGF などの増殖因子を添加した DMEM/F12 培地中で、培養メラノーマ細胞株 B16-BL6 を 3 日間培養し、trypsin-EDTA 処理後、同じ培養条件でさらに 3 日間培養することにより、メラノーマ・スフェロイドを作成し、単層培養した細胞との特性を比較した。まず、クローン原性の性質を持つ細胞を同定するため、自己複製能アッセイを用いて、単一細胞より増殖する細胞数を定量した。次いで、スローサイクリング細胞を同定するため、プロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し 7 日間培養後、BrdU を含まない培養条件でさらに 6 日間培養し、BrdU 標識保持細胞を免疫染色により同定した。さらに、化学療法に対する耐性を比較するため、Alamar-blue アッセイを用いて、ドキソルビシン添加後の細胞生存率を定量した。また、ドキソルビシンによる細胞死の機序を解明するため、TUNEL 法 (ApopTag®キット) を用いて、アポトーシスに陥った細胞数を検出した。最後に、メラノーマに対する新規治療法を開発

するため、スフェロイドに対しサリノマイシンあるいは三酸化ヒ素を単剤ないし併用投与し、細胞生存率を Alamar-blue アッセイを用いて定量した。

研究成績

(1) スフェロイドの作成

3次元培養法によりメラノーマ細胞株 B16-BL6 を 3 日間培養し、球体状の構造を持つ細胞集団が形成された。trypsin-EDTA 処理後、同じ培養条件でさらに 3 日間培養することにより、より密な構造を持つ細胞集団が得られた。

(2) 自己複製能アッセイ

自己複製能アッセイにより自己再生能力を評価したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にクローン原性の性質を持つ細胞が多く存在していた。

(3) スローサイクリング細胞の同定

BrdU 保持能より細胞周期の遅い細胞を同定したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中に BrdU を保持したスローサイクリング細胞が多く含まれていた。

(4) 化学療法に対する抵抗性

各濃度のドキソルビシンを添加した細胞の生存率を比較したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にドキソルビシンに対し抵抗性を有する細胞が多く含まれていた。この結果を反映して、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にはドキソルビシンによるアポトーシス誘導に抵抗性を有する細胞が多く含まれていた。

(5) サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用効果

サリノマイシンあるいは三酸化ヒ素を単剤で投与した場合と比較して、併用して投与した方が、スフェロイド細胞の生存率が顕著に減少した。

結論

メラノーマ・スフェロイドは、単層培養細胞と比較して、スローサイクリング細胞を多く含み、また既存の化学療法剤であるドキソルビシンに対しより抵抗性を有することより、生体のメラノーマ腫瘍塊に類似した性質を有していることが実証された。この結果は、メラノーマに対する新規治療法を開発する際に、単層培養細胞と比較して、メラノーマ・スフェロイドがより有益な情報をもたらす可能性を示唆するものである。さらに、この手法を用いた生体に近い条件においても、サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用により、高い抗腫瘍効果が得られたことは注目に値する。

学位論文(博士一甲)審査結果の要旨

主査: 羽瀨 友則

申請者: 石河 軌久

論文題名: **Salinomycin sensitizes melanoma spheroids containing slow-cycling cells to the effects of arsenic trioxide**

(サリノマイシンは細胞周期の遅い細胞を含むメラノーマ・スフェロイドの三酸化ヒ素に対する効果を鋭敏化する)

要旨

化学療法後の再発はメラノーマを初めとした癌による死亡の主要な原因である。伝統的な化学療法は細胞周期の早い細胞に作用してきたが、細胞周期の遅い細胞(細胞周期遅延型細胞)は化学療法に抵抗性を示し、再発の重要な要因となっていることが示唆されてきた。本研究では、将来的に、メラノーマに対するより長期的に強固な効果のある標的治療を可能にするために、3次元構造を持つ球体状のメラノーマ細胞の特性評価を行い、細胞周期遅延型細胞を含む細胞集団を標的とした新たな化学療法の可能性を検討した。

結果として、申請はメラノーマ細胞の球体状細胞集団(スフェロイド)の安定した樹立を確立した。このスフェロイド系を用いて、申請者は、(1) 自己複製能アッセイにより単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にクローン原性の性質を持つ細胞が多く存在すること、(2) BrdU 保持能解析より、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中に BrdU を保持した細胞周期遅延型細胞が多く含まれていること、(3) 単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にドキソルビシンに対し抵抗性を有する細胞が多く含まれ、ドキソルビシンによるアポトーシス誘導に抵抗性を有する細胞が多く含まれていること、(4) サリノマイシンあるいは三酸化ヒ素を単剤で投与した場合と比較して、併用して投与した方が、スフェロイド細胞の生存率が顕著に減少すること、を示した。

メラノーマ細胞のスフェロイドは、単層培養細胞と比較して、細胞周期遅延型細胞を多く含み、また化学療法剤であるドキソルビシンに対しより抵抗性を有することより、生体のメラノーマ腫瘍塊に類似した性質を有していることが示唆された。メラノーマに対する新規治療法を開発する際に、単層培養細胞と比較して、スフェロイドがより有益な情報をもたらす可能性を示唆する。実際に、このモデル条件下で、サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用により、相乗効果が示されたことは興味深い。

1) 斬新さ

腫瘍細胞のスフェロイドは、生体の腫瘍塊に近い性質をもつことに着目し、これを新規治療法を探索する *in vitro* モデルとして用いることができるという仮説の下に、モデルの確立と生物学的特徴を解析するとともに、実験的治療法を検証した点が斬新である。

すなわち、単層培養と比較して、メラノーマ細胞のスフェロイドは、細胞周期の遅い細胞の割合が高く、クローン原性の性質を有し、化学療法に抵抗性がある、などを示した。さらに申請者が、この実験系を用いて、三酸化二ヒ素とサリノマイシンの併用投与による相乗的な抗腫瘍効果を明解に示したことは注目に値する。

2) 重要性

メラノーマ患者の予後は非常に悪く、予後延長や完治を目指せる化学療法や分子標的療法が無いのが現状である。申請者は、メラノーマ細胞のスフェロイドは、生体の腫瘍塊に近い性質をもつこと、これを新規治療法探索の *in vitro* モデルとして用いることができることなどを示し、そのモデルの確立と生物学的特徴を解析するとともに、実験的治療法を検証した。したがって、本研究は新規治療戦略の創生に大きく寄与するものと期待される。

生体の腫瘍塊に近い性質をもつメラノーマ細胞のスフェロイドを用いて、三酸化二ヒ素とサリノマイシンの併用投与が、治療抵抗性のメラノーマに対する新たな化学療法となる可能性を見出した。この結果は、メラノーマに対する新規標的治療を模索する上で端緒となる重要な成果であると考えられ、その重要性は大きいものがある。

3) 研究方法の正確性

本研究は、スフェロイド培養と確立、細胞生物学的解析法、BrdU 標識細胞解析、TUNEL 法、治療薬投与による細胞生存率解析など、分子細胞生物学的な基本的手法の標準法に準じて行われており、正確性や妥当性に問題は無いと判断される。

4) 表現の明瞭さ

抄録、背景、対象と方法、結果、考察、結論、表、図など簡潔で明瞭に記載されている。さらに、すでに学術雑誌に英文論文として掲載受理されており、学位論文として校正、表現など問題ない。

以上のことより、本論文は学位を授与するに十分値する内容と判定された。