



Transcutaneous Application of Carbon Dioxide (CO₂) Induces Mitochondrial Apoptosis in Human Malignant Fibrous Histiocytoma *in vivo*

大西, 康央

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5682

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005682>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Transcutaneous Application of Carbon Dioxide (CO₂) Induces Mitochondrial

Apoptosis in Human Malignant Fibrous Histiocytoma *in vivo*

経皮的炭酸ガス投与はヒト悪性線維性組織球腫においてミトコンドリア系アポトーシスを誘導する

大西 康央、河本 旭哉、上羽 岳志、岸本 健太、原 仁美、
深瀬 直政、戸田 光紀、原田 理沙、蓑田 正也、酒井 良忠、
三輪 雅彦、黒坂 昌弘、秋末 敏宏

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
(指導教員: 黒坂 昌弘教授)

大西 康央

はじめに

悪性線維性組織球腫(MFH)は中高齢者に多く発症する悪性度の高い骨軟部肉腫である。治療として、手術、化学療法、放射線療法を用いた集学的治療が行われているが、いまだ化学療法の効果は乏しく、局所再発や転移により現在でも治療成績は芳しくない。

ミトコンドリアは細胞内エネルギー代謝、アポトーシスに重要な役割を果たす細胞質内器官であり、ミトコンドリアによるエネルギー代謝の減少、ミトコンドリア量の減少などが悪性腫瘍の進行に関与していると言われている。 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α) は、転写因子である mitochondrial transcription factor A (TFAM) を介して、ミトコンドリア生合成を調整する蛋白質である。我々はこれまでに、骨軟部肉腫では良性骨軟部腫瘍に比較してミトコンドリア量が有意に低下していること、ヒト MFH 細胞株において PGC-1 α の強発現がミトコンドリア量を増加させることでミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを確認している。これらの結果は、PGC-1 α を介したミトコンドリア量の調整が骨軟部肉腫の治療に有用である可能性を示唆している。

炭酸ガス (CO₂) 治療は、主にヨーロッパにおいて心、皮膚疾患に対する治療に、炭酸泉として古くから使用されている。治療局所の血流および微小循環の増加、血管新生、ボア効果による局所酸素濃度の増加によって、治療効果を生じると言われている。我々は以前に、ラット筋組織において経皮的炭酸ガス投与が PGC-1 α 発現を増強させ、ミトコンドリア量の増加を引き起こすことを明らかとしている。

これまでの我々の研究結果から、経皮的炭酸ガス投与が骨軟部肉腫においても PGC-1 α 発現を介してミトコンドリア量を増加させ、ミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導するのではないかと仮定し、本研究において、ヒト MFH モデルマウスを用いた、骨軟部肉腫に対する経皮的炭酸ガス投与による腫瘍組織内のミトコンドリア生合成およびアポトーシス誘導に与える影響について検討した。

対象と方法

ヒト MFH モデルマウスの作成と経皮的炭酸ガス投与

ヒト MFH 細胞株 Nara-H (4.0×10⁶ 細胞) をヌードマウスの背部皮下に移植してモデルマウスを作成し、炭酸ガス投与群 (CO₂ 群)、コントロール群の 2 群に分けた。移植後 3 日目より経皮的炭酸ガス投与 (コントロール群には空気を投与) を開始した (Figure S3)。治療は 1 回 10 分間、週 2 回行い、腫瘍サイズと体重を定期的に計測した。移植後 14 日目にマウスから腫瘍組織を採取し、以下の検討を行った。

経皮的炭酸ガス投与による PGC-1 α , TFAM の発現量についての検討

各治療群の腫瘍組織における PGC-1 α , TFAM の mRNA 発現について Real time PCR 法を用いた定量的な解析を行った。

経皮的炭酸ガス投与によるミトコンドリア増殖の評価

ミトコンドリア量として、相対的なミトコンドリア DNA (mtDNA) 量 (核 DNA に対する mtDNA の相対量) を用いて評価した。各治療群それぞれの腫瘍組織から DNA を抽出し、相対的 mtDNA 量について Real time PCR 法を用いて検討した。また、ミトコンドリア膜特異性である蛍光色素 MitoTracker Deep Red FM を用いて、腫瘍組織内におけるミトコンドリア発現について蛍光免疫染色による評価も行った。

経皮的炭酸ガス投与によるヒト MFH 細胞のアポトーシスに対する効果についての検討

各治療群の腫瘍組織内のアポトーシス活性を評価するため、腫瘍組織内の DNA 断片化とアポトーシス関連蛋白の発現について検討した。DNA 断片化は APO-DIRECT Kit を用いて蛍光免疫染色と FACS を行い評価した。アポトーシス関連蛋白の発現については活性型 caspase-3 および-9, PARP について Western blot 法で評価した。さらに、cytochrome C および Bax については、ミトコンドリア分画と細胞質分画を分離してその発現を検討し、ミトコンドリア経路のアポトーシスの状態について評価した。

経皮的炭酸ガス投与によるヒト MFH 細胞の細胞内 Ca イオン濃度への影響についての検討

ヒト MFH 細胞を背部皮下に移植したモデルマウスに対して経皮的炭酸ガス投与を行い、炭酸ガス投与直後 (0hr)、投与 6 時間後 (6hr)、投与 24 時間後 (24hr) に腫瘍を採取し、Calcium Assay Kit を用いて細胞内 Ca イオン濃度を計測した。

統計学的解析

2 群間の比較には t 検定を用い、多群間の比較には ANOVA 検定の post hoc 検定を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結果

経皮的炭酸ガス投与はヒト MFH 細胞の増殖を有意に抑制した

ヒト MFH モデルマウスを用いて経皮的炭酸ガス投与の腫瘍増殖能に対する影響について検討した。CO₂ 群では有意に腫瘍サイズが縮小し、治療終了時ではコントロール群の 48% までの縮小効果を認めた (Figure 1A, B, *p<0.05, **p<0.01)。マウス体重には両群間で有意差をみとめなかった (Figure 1C)。

経皮的炭酸ガス投与はヒト MFH 細胞の PGC-1 α -TFAM-ミトコンドリア経路を賦活化した

治療後の腫瘍組織内の PGC-1 α および TFAM の mRNA 発現量について Real time PCR 法にて検討したところ、PGC-1 α , TFAM ともに CO₂ 群では有意に発現が増加していた (Figure 2A, B, *p<0.05)。さらに、核 DNA に対する相対的 mtDNA 量においても CO₂ 群ではコントロール群と比較して有意に増加しており (Figure 2C, *p<0.05)、蛍光免疫染色においても、CO₂ 群ではミトコンドリアの増加が確認できた (Figure 2D)。

経皮的炭酸ガス投与はヒト MFH 細胞内のミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導した

経皮的炭酸ガス投与によるヒト MFH 細胞のアポトーシスへの影響について検討するため、腫瘍組織内における DNA 断片化とアポトーシス関連蛋白の発現を評価した。蛍光免疫染色では CO₂ 群においてコントロール群よりも DNA 断片化が著明であり (Figure 3A)、さらに FACS による解析でも同様の結果であった (Figure 3B)。また、CO₂ 群においては活性型 caspase-3, -9 および PARP の発現増強をみとめた (Figure 3C)。また cytochrome C と Bax の発現に関しては、CO₂ 群では、cytochrome C はミトコンドリア分画での減弱と細胞質内での増強、Bax はミトコンドリア分画での増強と細胞質分画での減弱を認め、ミトコンドリア経路のアポトーシス誘導の増強が示唆された (Figure 3D)。

経皮的炭酸ガス投与はヒト MFH 細胞内の Ca イオン濃度を増加させた

経皮的炭酸ガス投与によるヒト MFH 細胞内の Ca イオン濃度に対する影響についての検討では、炭酸ガス投与直後および 6 時間後でコントロール群と比較して有意に細胞内 Ca イオン濃度が増加していた (Figure 4, *p<0.05)。投与 24 時間後にはコントロール群と同程度まで低下していた。

考察

種々の癌腫において、ミトコンドリア量の減少が腫瘍の進行に関与しているとの報告がなされており、アポトーシス抵抗性にも関連しているのではないかと考えられている。我々も、骨軟部肉腫においてミトコンドリア量と PGC-1 α の発現が低下しており、PGC-1 α の強発現がヒト MFH 細胞でミトコンドリア量の増加に伴うアポトーシス誘導効果を示すことを確認している。

炭酸ガスの悪性腫瘍への影響は様々な報告があり、大腸癌では腫瘍の増殖、浸潤が亢進し、胃癌、乳癌では逆に腫瘍の増殖を抑制すると報告されているが、骨軟部腫瘍領域における炭酸ガスの影響はまだ明らかとなってはいない。本研究の結果から、経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH 細胞の腫瘍増殖を抑制し、PGC-1 α 、TFAM の発現増強およびミトコンドリア量の増加を伴って、ミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導する事が明らかとなつた。我々は、乳癌細胞株を用いた実験でも、同様の効果を確認しているが (Figure S2)、そのメカニズムについてはまだ不明な点もある。PGC-1 α は主に運動などによる筋収縮の刺激、細胞内 Ca 流入や AMPK などのシグナルキナーゼなどによって発現調整されており、我々も以前の検討で経皮的炭酸ガス投与がラット筋組織において PGC-1 α 発現を増加させたことから、炭酸ガスと PGC-1 α 発現とに関連があるのではないかと考えている。さらに CO₂が様々な細胞で細胞内 Ca イオン濃度を増加させること、細胞内 Ca イオン濃度の増加が PGC-1 α の発現を増強させることも報告されている。本研究でも経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH 細胞内で Ca イオン濃度を増加させることができたことから、Ca イオン濃度の増加に伴って PGC-1 α 発現が増強し、ミトコンドリア量の増加が起きたと考えられる。

本研究の結果から経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH に対してミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。さらなる検討が必要と考えられるが、我々の経皮的炭酸ガス投与は、MFH に対して有効な治療法の一つとなる可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2300 号	氏名	大西 康央
論文題目 Title of Dissertation	経皮的炭酸ガス投与はヒト悪性線維性組織球腫においてミトコンドリア系アポトーシスを誘導する Transcutaneous Application of Carbon Dioxide (CO ₂) Induces Mitochondrial Apoptosis in Human Malignant Fibrous Histiocytoma <i>in vivo</i>		
審査委員 Examiner	主査 <u>南 博信</u> 印 Chief Examiner 副査 <u>梅 岳夫</u> Vice-examiner 副査 <u>井出 邦弘</u> Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

悪性線維性組織球腫 (MFH) は中高齢者に多く発症する悪性度の高い骨軟部肉腫である。炭酸ガス (CO₂) 治療は、局所酸素濃度の増加によって治療効果を生じると言われている。本研究において、ヒト MFH モデルマウスを用いた経皮的炭酸ガス投与による腫瘍組織内のミトコンドリア合成およびアポトーシス誘導に与える影響について検討した。

材料と方法

ヒト MFH 細胞株 Nara-H (4.0×10^6 細胞) をヌードマウスの背部皮下に移植し、炭酸ガス投与群 (CO₂群)、コントロール群の 2 群に分けた。治療は 1 回 10 分間、週 2 回行い、腫瘍サイズと体重を定期的に計測した。移植後 14 日目にマウスから腫瘍組織を採取し、以下の検討を行った。(1) PGC-1α、mitochondrial transcription factor A (TFAM) の mRNA 発現を Real time PCR 法を用いて定量的に解析した。(2) ミトコンドリア量の検討として、相対的 mtDNA 量を Real time PCR 法を用いて解析し、ミトコンドリア膜特異性を示す蛍光色素 MitoTracker Deep Red FM を用いた蛍光免疫染色により評価した。(3) DNA 断片化を APO-DIRECT Kit を用いて蛍光免疫染色と FACS を行い検討した。活性型 caspase-3 および-9、PARP、cytochrome C および Bax を Western blot 法で評価した。(4) 炭酸ガス投与直後 (0hr)、投与 6 時間後 (6hr)、投与 24 時間後 (24hr) に腫瘍を採取し、Calcium Assay Kit を用いて細胞内 Ca イオン濃度を計測した。

結果

- 1) CO₂群ではコントロール群の 48%までの増殖抑制効果を認めた。マウス体重には両群間で有意差を認めなかった。
- 2) 治療後の PGC-1α、TFAM の mRNA 発現量は、ともに CO₂群では有意に発現が増強していた。さらに、相対的 mtDNA 量、蛍光免疫染色による検討でも CO₂群ではコントロール群と比較して有意にミトコンドリアが増加していた。
- 3) 蛍光免疫染色、FACS では CO₂群においてコントロール群よりも DNA 断片化が著明であった。CO₂群においては活性型 caspase-3、-9 および PARP の発現増強を認めた。また cytochrome C と Bax の発現に関しては、CO₂群では、cytochrome C はミトコンドリア分画での減弱と細胞質内での増強、Bax はミトコンドリア分画での増強と細胞質分画での減弱を認め、ミトコンドリア経路のアポトーシス誘導の増強が示唆された。
- 4) 炭酸ガス投与直後および 6 時間後でコントロール群と比較して有意に細胞内 Ca イオン濃度が増加していた。投与 24 時間後にはコントロール群と同程度まで低下していた。

考察ならびに結論

炭酸ガスの悪性腫瘍への影響に関しては様々な報告があるが、骨軟部腫瘍領域における炭酸ガスの影響はまだ明らかとなつてはいない。本研究の結果から、経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH 細胞の腫瘍増殖を抑制し、PGC-1α、TFAM の発現増強およびミトコンドリア量の増加を伴つて、ミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導する事が明らかとなった。CO₂が様々な細胞で細胞内 Ca イオン濃度を増加させること、細胞内 Ca イオン濃度の増加が PGC-1α の発現を増強させることも報告されており、本研究でも経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH 細胞内で Ca イオン濃度を増加させることが明らかとなったことから、Ca イオン濃度の増加に伴つて PGC-1α 発現が増強し、ミトコンドリア量が増加したと考えられる。

本研究は、経皮的炭酸ガス投与のヒト MFH に対する効果について研究したものであるが、従来ほとんど行われていない経皮的炭酸ガス投与がヒト MFH に対してミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことについて重要な知見を得たと同時に、研究者らの経皮的炭酸ガス投与は、MFH に対して有効な治療法の一つとなりうる可能性を示唆する点において価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。