

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 336 号	学位申請者	馬場 直子
審査委員	主査	堂地 勉	学位
	副査	武田 泰生	副査
	副査	古川 龍彦	副査

**Japanese black vinegar “Izumi” inhibits the proliferation of human squamous cell carcinoma cells via necroptosis**

(日本の黒酢「桒志田泉<sup>\*</sup>」はネクロトーシスを介してヒト扁平上皮癌細胞の増殖を阻害する)

黒酢は調味料や健康食品として広く利用されている。鹿児島県は黒酢の産地である。「桒志田泉<sup>\*</sup>」は霧島市福山町で作られている黒酢であり、有機玄米、有機大豆、麴、軟水をカメ壺に仕込み、1年間かけて発酵させ、その後3年間熟成させた酢である。「桒志田泉<sup>\*</sup>」は、原料に玄米と大豆を使用することにより、アミノ酸総量が米酢の約5.6倍、通常の黒酢の約1.6倍含有されている。黒酢は経験的に食欲増進や疲労回復を目的として飲用されている。

黒酢は抗酸化作用を有することが報告されており抗腫瘍効果も期待される。本論文ではヒト皮膚扁平上皮癌細胞株であるHSC-5に対する、玄米黒酢「桒志田泉<sup>\*</sup>」の癌細胞増殖抑制効果について検討した。その結果、以下の知見が明らかにされた。

1. MTT assayでは、穀物酢、「桒志田泉<sup>\*</sup>」のいずれも細胞増殖を阻害したが、「桒志田泉<sup>\*</sup>」は穀物酢より有意に強く阻害効果を示した。
2. Trypan blue 染色では、「桒志田泉<sup>\*</sup>」はコントロール、穀物酢と比較し死細胞の割合が著明に高く、とくに7日目で高い死細胞の割合を示した。これらの結果から「桒志田泉<sup>\*</sup>」はHSC-5細胞の増殖を抑制することが確認できた。
3. Annexin V /ヨウ化プロビジウム染色では、apoptosis細胞の割合は、control、穀物酢、「桒志田泉<sup>\*</sup>」処理群間において有意差はなく、「桒志田泉<sup>\*</sup>」、穀物酢のいずれもapoptosis細胞の増加は認めなかった。Flow cytometryによる解析においても「桒志田泉<sup>\*</sup>」、穀物酢、PBSの3群間で有意な差は認めず、apoptosisの誘導は確認できなかった。
4. Necroptosisによる作用を考え、key signaling分子であるRIPK3の発現をウエスタンブロット法で確認したところ「桒志田泉<sup>\*</sup>」で刺激したHuman Squamous cell Carcinoma-5 (HSC-5)細胞のRIPK3の発現が増強していた。また、necroptosisの際に細胞外に放出されるDAMPsの1つであるHMGB1の発現を確認したところ培養5日目以後に「桒志田泉<sup>\*</sup>」、穀物酢で刺激したHSC-5細胞培地上清中にHMGB1蛋白質が検出され、「桒志田泉<sup>\*</sup>」による7日間培養においてPBS、穀物酢に比べ有意に多く放出されていた。

近年、プログラム細胞死としてapoptosisと同様に制御されているnecrosisが報告され、necroptosisとも言われている。Necroptosisのkey signaling分子であるRIPK3の発現が「桒志田泉<sup>\*</sup>」により誘導されており、それに伴いHMGB1が放出されることも確認された。本研究により、「桒志田泉<sup>\*</sup>」はnecroptosisを介してヒト皮膚扁平上皮癌細胞の増殖を阻害することが明らかにされた。Necroptosisには、癌細胞死を促進し、腫瘍細胞の抗癌剤治療への感受性を増大させるという報告があり、「桒志田泉<sup>\*</sup>」を抗癌剤治療と併用することでその治療効果を増強させることが期待され非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。



## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 336 号		学位申請者	馬場 直子
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士 (医学)
	副査	武田 泰生	副査	橋口 照人
	副査	古川 龍彦	副査	藤井 一恭
<p>主査および副査の5名は、平成27年6月1日、学位申請者 馬場 直子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のよう な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 酢は 100 倍希釈で使用しているが PH はどうだったか。 (回答) 通常の培地は PH 7.5 であり酢を添加すると PH 7.41、HEPES を添加すると PH 7.5 になり、実験に使用する際 の PH による影響はないと考える。</p> <p>質問 2) 培地を交換する直前の PH は測定したか。 (回答) 測定はしていないが培地の色調はコントロールの PBS と比較して明らかな変化はなかった。</p> <p>質問 3) HMGB1 の western blotting でサンプルとして使用した培地は 2 日ごとに交換したものを使用したのか。 (回答) HMGB1 のサンプル用の培地は交換せずに蓄積した HMGB1 を検出している。</p> <p>質問 4) RIPK3 は穀物酢を含んだ培養液においても HSC-5 細胞に発現しているが穀物酢にも RIPK3 を発現する作用がある のか。 (回答) 穀物酢にもアミノ酸は含有されており、それらの作用で RIPK3 を発現しているのではないかと考える。ただし 栂志田泉<sup>6)</sup>のアミノ酸含有量は穀物酢よりはるかに多いため、その違いが発現量の違いをきたすのではないかと考える。</p> <p>質問 5) 希釈は 1/100 のみにて実験したのか。 (回答) 予備実験で条件決定する際にさらに濃い濃度や薄い濃度で行った。その上で至適濃度は 1/100 と考え、この 濃度で行った。</p> <p>質問 6) アポトーシスとネクローシスの細胞死の形態の違いは観察したか。 (回答) 今回は観察していない。</p> <p>質問 7) アポトーシスのプロセスと RIPK3 の双方が阻害されたらどのように応答すると考えるか。 (回答) 通常のネクローシスにむかうのではないかと考える。</p> <p>質問 8) Figure 1 および 2 で 3 ~ 5 日目で細胞死がはっきりしてくるが、Figure 3 ではなぜ 24 時間でみているのか。 24 時間ではまだアポトーシスやネクローシスの判断はつかないのではないか。 (回答) Positive control のエトポシド群はすぐに死んでしまい、24 時間以上の培養継続が不能であったため 24 時間 の時点での結果を示した。エトポシド以外で 3 日間刺激した細胞でも同様の実験をおこなったが、それでもアポトーシ ス細胞はみられなかった。</p> <p>質問 9) ネクローシスの際は組織に炎症も引き起こすがそれでも癌治療のターゲットになりうると考えた理由は何か。 (回答) アポトーシスをおこしにくい癌細胞もあり、そのような細胞の際はネクローシスを誘導することで新たな治 療につながるのではないかと考える。ネクローシスはある程度コントロールすることも可能であると考えられ、過剰 な炎症を起こさないように調整することで有用な治療になりうると考える。</p> <p>質問 10) 酸度を 4.2% にした理由は何か。 (回答) 穀物酢は酸度 4.2% 以上という規定があり、一般に流通している酢は大体 4.2% であるためその濃度にした。</p> <p>質問 11) HMGB1 蛋白の調整に一晩かけているがもっと短い時間でも回収できるのではないか。 (回答) 川原ら C-reactive protein induces high-mobility group box-1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW264.7 cells. Cardiovasc Pathol 7, 129-138. 2008. の論文に準じて行った。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 12) 既報でのアポトーシスであるという報告とそうではないという報告がある違いはなにか。

(回答) 同じ大腸癌細胞でもアポトーシスの方は Caco2、そうではないほうは LoVo であり、cell line が異なるためではないかと考える。

質問 13) これまでの報告の酢の濃度はどれくらいか。

(回答) 同程度 (10  $\mu$ l/ml) の濃度であった。

質問 14) 接着細胞で実験を行ったのはなぜか。

(回答) 細胞形態を観察できることを期待して行った。

質問 15) 栲志田泉®でネクロトーシスがおこるメカニズムはどのように考えるか。

(回答) アミノ酸やその他含有されている有機物の作用ではないかと考える。

質問 16) 7日間培養しているが confluent ではなかったのか。

(回答) confluent ではなかった。

質問 17) 疫学的に栲志田泉®を飲んでいる人に皮膚癌が少ないという報告はあるのか。

(回答) その様な報告はまだない。

質問 18) 肺癌、乳癌、大腸癌などでアポトーシスによる細胞死の報告があるが、なぜ栲志田泉®ではネクロトーシスが起きたのか。

(回答) これまでに報告された癌細胞株は腺癌であるが HSC-5 は扁平上皮癌であるためではないかと考える。

質問 19) 酢を大量に摂取したらどうなるか。

(回答) 大量摂取した場合も適切な量の酢を摂取した場合と比べ、ネクロトーシスの程度に大きな差はないのではないかと考える。また大量摂取により正常細胞へなんらかの有害な影響をもたらすことも考えられる。

質問 20) ダイエットに効果があるとされる機序は何か。

(回答) 酢にはアミノ酸、クエン酸が豊富に含有されている。アミノ酸は、血流を促し基礎代謝を促すだけでなく、アルギニン、リジン、アラニン、プロリンにおいては脂肪分解リパーゼという酵素を作る手助けをし、リパーゼが脂肪分解をするのを活性化し脂肪燃焼増強するなどの効果がある。また、クエン酸は脂肪をエネルギーに変換するクエン酸回路を円滑にする働きがあり、脂肪がスムーズにエネルギーに変換されるようになるためと考える。

質問 21) 高血圧、高脂血症に効くとされる機序は何か。

(回答) 黒酢には血圧上昇を抑制する ACE が含まれることにより高血圧が改善し、酢に多く含まれる酢酸によるコレステロール合成抑制作用により高脂血症を改善すると考える。また抗酸化作用もあるためそれらの作用によると考える。

質問 22) 栲志田泉®を服用しながら抗癌剤や放射線治療を行った場合、効果が増強されると思うか。

(回答) 効果の増強が期待されると考える。

質問 23) 正常細胞には作用しないのか。

(回答) 別実験で栲志田泉®をヒト線維芽細胞に添加したが、死細胞が明らかに増加するような変化はなかった。

質問 24) 生細胞においても RIPK3 が発現している可能性があるがそれはみていないのか。

(回答) みていない。

質問 25) 増殖している正常細胞には影響しないのか。

(回答) ケラチノサイトなど常時分化しているような細胞には影響があると考えられる。

質問 26) HaKaT 細胞での栲志田泉®による細胞死の効果はみたか。

(回答) みていない。

質問 27) 今後臨床的に展開していく予定はあるか。

(回答) 臨床応用できてこそ意味があるので、コントロールスタディを行っていきたい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。