

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 747 号		学位申請者	平野 憂花
審査委員	主査	田松 裕一	学位	博士(歯学)
	副査	笹平 智則	副査	網谷 真理恵
	副査	奥井 達雄	副査	西 恭宏

主査および副査の5名は、令和6年5月13日、学位申請者 平野憂花君に面接し、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。

質問1) Myokineは複数あるとされているが、今回の研究でOncostatin Mを選択した理由は？

(回答) 代表的なmyokineであるIrisinやSPARC, FSTL-1, CXCL1, CCL2についても検討したが、統計学的有意差が得られなかったため今回の論文ではOncostatin Mのみに着目して結果を提示している。

質問2) 現在判明しているmyokineは10種類くらいか？

(回答) 判明しているmyokineは数百種類とされているが、マイクロアレイ解析などでプログラミングされている代表的なmyokineは10-20種類程度である。

質問3) すべてのマウスが自発的に車輪に乗る習性があるのか？

(回答) 自発的に車輪に乗り走行するマウスがほとんどだったが、乗らないマウスも存在したため先行研究を参考に走行距離が0.5km未満のマウスは運動群から除外している。

質問4) 今回の研究では癌移植前の運動が癌の制御に影響していることを示しているのか？

(回答) 腫瘍が大きくなってくると運動不良も生じていることから、本研究は主に移植前の運動に着目して癌の制御に影響していることを示している。

質問5) 手術に適する患者になるために運動ができる人は運動をした方がいいのか？

(回答) 本研究結果からは運動が可能な人は積極的に運動を行うことが推奨される。

質問6) サルコペニアと診断された人は癌治療において予後が悪いのか？

(回答) 先行研究で骨格筋の質と量が悪いサルコペニア群では再発転移のリスクが高いという報告がある。

質問7) がん悪液質のcytokineとmyokineの作用は関係しているのか？

(回答) myokineも癌腫によっては癌の進行に関連するという報告が散見されるため、関係している可能性はある。が、悪液質による骨格筋量減少についても検証が必要ではあるが、今回の研究でマウスの筋肉量等を測定しているが骨格筋量減少は認めておらず悪液質との関連については検証できていない。今後の研究で追及が必要である。

質問8) 筋腐移植時の手技による生着率の違いはないか？また注入部位の違いによる差はないか？

(回答) 手技の差について詳細に検証できていないが、移植は1名の術者が担当しており、移植時に舌全体が液体注入により膨張したことを2名の補助者で観察して行った。またマウスの舌は非常に小さく注入部位の差を観察することは困難だったため、今回の研究ではその点まで検証できていない。

質問9) 生着していないと判断したマウスは結果から省いたのか？

(回答) 生着の関与しない腫瘍体積や生存期間の観察時には生着していないマウスは除外して検証している。

質問10) 今回のin vivoの研究ではOncostatin Mと筋肉の関係については検証したのか？

(回答) 実際に筋肉量に変化があるかを検討するためマウスのお尻筋群を剖出し重量を測定したが2群間で有意差はなくOncostatin Mとの関連については検証できていない。

質問11) Oncostatin Mの作用は癌腫によって異なるのか？

(回答) 癌腫によって本研究と同様にOncostatin Mによる癌の進行抑制の報告もあれば(乳癌や悪性黒色腫等)癌の進行を促進する(肺癌や卵巣癌等)という報告もある。

質問12) 移植後の食事量の変化や運動量の変化もOncostatin Mの影響か？

(回答) 食事量の変化や運動量の変化にOncostatin Mが関与しているかは本研究では検証できていないが、腫瘍が大きくなったことによる影響が一番考えられる。

質問13) Oncostatin Mは臨床応用可能性か？

(回答) 抗癌剤として応用するには増殖抑制効果が低いため、抗癌剤と併用して補助療法としての応用を考えている。

質問14) 人間だと何歳くらいから運動して予防するべきか？

(回答) 今回のマウスモデルは4週齢でも結果が出ていることから、若い世代から運動を行うことが重要と考える。

質問15) 3つの細胞株を選んだ理由は？

(回答) HSC-3とHSC-3-M3およびOSC-19はいずれも悪性度の高い癌細胞株であり、臨床的に悪性度の高い癌に対する病態制御を念頭に置いていたため選択しており、特にHSC-3-M3は高転移株であるためIn vivoにおける転移についても検討するために選択した。今後歯肉癌や口底癌といった細胞株での検討も考えている。

質問16) Oncostatin Mの濃度はヒトだとどれくらいなのか？

(回答) ヒトでも10-100pg/mlの報告もあればIL-6 familyの括りで1-100ng/mlの報告もあり、特に高負荷運動時は安

## 最終試験の結果の要旨

静時と比べ約7倍程度上昇することも報告されている。

質問17) 今回の研究では異種移植を行っているが、それに伴う影響は検証したか？

(回答) 今回の研究では検討できていないため、同種移植が可能な実験体を今後検討する必要がある。

質問18) Oncostatin M の受容体は何か。

(回答) 受容体のI型、II型があり、I型はLIF受容体とgp130の複合体、II型はOncostatin M受容体とgp130の複合体で構成されており、両方の受容体と結合可能で相互作用を示す。

質問19) HSC-3-M3の倍加時間はどれくらいか。

(回答)  $3 \times 10^5$  cell/10cm dishで播種した場合24時間経過した時点で2.5倍程度に増殖するため約15-20時間と考える。

質問20) Oncostatin Mの添加時間や細胞回収のタイミングに対する検証はしたか。

(回答) 細胞周期やタンパク検出を行う際、Oncostatin M添加後24時間、48時間のタイミングで回収し検討も行ったが統計学的有意差は得られなかった。

質問21) マウスの血中のOncostatin M濃度はin vitroで設定したOncostatin M濃度と比較してかなり低い、細胞実験におけるOncostatin M濃度はどのようにして設定したのか。

(回答) ヒトの血中Oncostatin M濃度も10-100pg/mlの報告が多いためin vitroの濃度設定も10-100pg/mlの範囲で検討していたが操作性が悪く、Oncostatin Mを用いたin vitroの先行研究で使用している濃度を参考に設定した。

質問22) Oncostatin Mの由来はどこだと考えているか？

(回答) Oncostatin Mの由来はマウスの下肢筋群由来と考えているが、今回の研究では検証ができていない。

質問23) Oncostatin Mの受容体は口腔癌細胞株に発現しているか？また細胞株自体がOncostatin Mを分泌しているのではないか？その点について検証できているか？

(回答) 口腔癌細胞株のOncostatin M受容体発現はTIMERおよびTCGAデータベースで確認できている。過去の報告で癌細胞自体がOncostatin Mを分泌していることや癌細胞におけるOncostatin M受容体の過剰発現に関する報告があるが今回の研究ではこの点について検証できていない。

質問24) 細胞増殖に関連する他のシグナルについては検証したか？

(回答) RasやAktの経路についてもWestern blotで検証しているがRasは統計学的有意差が得られず、AktについてもOncostatin M群で発現が増加しており今回の考察と逆の結果が得られた。

質問25) 細胞周期についてCDKやcyclinについては確認したか？

(回答) CDK1、CDK2およびCyclinAについても検証したがいずれも統計学的有意差が得られなかった。

質問26) タンパク検出の実験におけるサンプル数は？

(回答) サンプル数はn=3で実験を行った。

質問27) In vivoで腫瘍移植後ではなく、移植前の運動が腫瘍の病態制御に関与することを示唆しているという結果の流れから、in vitroでは腫瘍にOncostatin Mを添加することで増殖が抑制されるという結果の流れになっている。両者の実験で運動の作用のタイミングが異なるが、この点についてはどう考えているか？

(回答) In vitroの結果は癌細胞株を用いているため腫瘍形成後の運動モデルとしての実験となっており、得られる考察が異なっている。この点についての検証はできていないため、今後の研究で移植後の運動効果についての検証を行うことで両方の結果を提示することを考えている。

質問28) 悪液質とサルコペニアの関係についてどう考えているか？

(回答) がん悪液質の結果、骨格筋量が減少してサルコペニアが生じたり、もともとサルコペニアの人では状態が悪化することが予想される。本研究では悪液質については言及していないため明確なことは不明であるが、運動およびmyokineが悪液質とサルコペニアの両方に有効な対応となる可能性が示唆される。

質問29) 適切な運動が癌を予防するのか、それとも癌になった後の運動が予後を改善するのか？

(回答) 本研究からは適切な運動が癌を予防すると考えられる。今後の研究で発癌後の運動の影響を検討する予定である。

質問30) 運動群マウスが腫瘍移植後に走行距離が減った理由は？

(回答) 本研究から明らかかなことは言えないが、腫瘍が増殖したことにより食事量が減少、全身倦怠感などの要素が腫瘍移植後の走行距離の変化に影響したことが考えられる。

質問31) 腫瘍を移植せずHBSSのみ注入する運動群のモデルも設定したほうがいいのではないか？

(回答) 今後の研究の参考にし、腫瘍を移植しないモデルも設定して実験計画を検討する。

質問32) 細胞周期解析で小数点以下の数値が多いため有効限界数値を設定することを検討してみたいか？

(回答) 今後の研究の参考にし、できるだけ分かりやすいデータの掲載を心がける。

質問33) 運動だけでなく筋刺激装置(Six-pad)も腫瘍の制御に有効か？

(回答) 腫瘍の制御については明らかではないが、生体肝移植を受けた寝たきりのサルコペニア患者にSix-padを使用することで筋肉量を改善したとの報告があり、腫瘍への有効性も示唆されるため今後の研究で検討を考えている。

質問34) マウスにおいて腫瘍が生着していないときはどういう所見となるのか？

(回答) 移植時に一度舌が膨らんだ後、舌の腫脹は軽減し、生着したマウスは舌に潰瘍形成や硬結を触れるが生着しなかったマウスでは同様の所見を認めない。

質問35) 過去の研究でアスリートと一般の人における癌と運動の関係について検討した疫学的データはあるのか？

(回答) 運動習慣のあるグループや、運動プログラムを行った患者とそうでない患者における癌と運動の関係やmyokineと癌の関係について検討したデータがあり、運動が癌の予後を改善することが報告されている。

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(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。