

論 文 要 旨

Hyperbaric Oxygen as a Chemotherapy Adjuvant in the Treatment of Osteosarcoma

〔 骨肉腫に対する高気圧酸素療法を併用した化学療法についての検討 〕

川添 泰臣

【序論および目的】

骨肉腫は近年治療成績に大きな進歩が見られていない。骨肉腫に対するあらたな補助治療のひとつとして、化学療法に高気圧酸素療法 (HBO) を併用することによる抗腫瘍効果が認められるかマウスを用いて検討した。

【材料および方法】

In vitro study では、マウス骨肉腫細胞株 LM8 を使用し、MTT assay にて腫瘍増殖抑制効果を確認した。また、HBO による骨肉腫細胞の増殖抑制機序について検討するため、DNA ladder の有無を検討した。*In vivo study* では移植した腫瘍のサイズ、肺転移数、生存率についてマウスを用いて検討した。HBO 治療のプロトコールは 100%純酸素、2.5 絶対気圧下で 60 分とした。抗腫瘍薬として carboplatin (CBDCA) を使用した。

【結 果】

In vitro では HBO 単独により有意に腫瘍増殖が抑制された。また、DNA ladder の発現を認め、HBO により骨肉腫細胞株の細胞死が誘導されていることが確認できた。*in vivo* では腫瘍体積と肺転移の数を有意に抑制していた。また、CBDCA を併用することで肺への遠隔転移を抑制し、生存率が有意に改善される結果が得られた。

【結論及び考察】

HBO を併用した放射線療法、化学療法の試みは脳腫瘍の分野では特に盛んに試みられているが、整形外科領域の悪性骨軟部腫瘍においてはほとんど報告がない。とくに骨肉腫に対する HBO 併用療法、さらには HBO 単独療法の効果についてはこれまでに全く報告がなくその意義については不明であった。

HBO 単独療法が悪性腫瘍に及ぼす効果に関しては、HBO が腫瘍の増殖、進展を助長するといった報告と、抗腫瘍効果をもたらすという、相反する結果が報告されてきた。近年、HBO 単独での暴露が局所及び転移巣の腫瘍細胞を刺激し増殖を促進する可能性は低く、むしろ抗腫瘍作用として機能するといった報告がみられ、興味深いことに、HBO の良好な抗腫瘍効果は特に肉腫に対する動物実験で認め

られると分析している。

本研究では、*In vitro* において HBO 単独でも著明な抗腫瘍効果が確認され、その機序が apoptosis を誘導することによる可能性が示唆された。*In vivo* でも CBDCA を併用することで肺への遠隔転移を抑制し、結果として生存率が有意に改善された。これら HBO が骨肉腫の抗腫瘍効果並びに肺転移を抑制した機序については未だ完全には解明されていないが、少なくとも骨肉腫の生命予後を規定する重要な因子である肺転移の制御に関して、現段階では HBO 療法は有利に働くものと考えている。今後、低酸素状態における細胞内シグナル伝達の変化の解析など、分子生物学的な検討、解析が進み、HBO による抗癌剤増強に関する機序を解明していきたいと考える。

(Oncology Reports 2009 Nov;22(5):1045-50 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 112 号	学位申請者	川添 泰臣
審査委員	主査	夏越祥次	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	竹内 亨	副査 古川龍彦
	副査	中川昌之	副査 河野嘉文

Hyperbaric Oxygen as a Chemotherapy Adjuvant in the Treatment of Osteosarcoma

(骨肉腫に対する高気圧酸素療法を併用した化学療法についての検討)

現在の骨肉腫治療は、術前化学療法と局所の手術療法の進歩により、5年生存率は約60%まで改善した。一方、遠隔転移、局所浸潤といった予後不良例に加え、強い化学治療の副作用や抗癌剤耐性の問題もあり、新しい治療方法の開発が必要と考えられる。今回、新たな治療法開発の一つとして、高気圧酸素療法（以下HBO）に着目し、HBO単独効果とHBOと化学療法の併用効果について比較検討を行った。本研究の目的はHBOによる骨肉腫細胞の増殖抑制及び肺転移抑制の機序について検討することである。In vitro studyとして、HBOによる増感効果の評価はMTT assayで行い、HBO単独によるapoptosis誘導の検討はDNA ladderの有無で評価した。In vivo studyはマウスを用いて、腫瘍体積の抑制効果、肺転移の抑制効果、生存率を評価した。また、予備実験として、FACS SCANによる免疫能の評価を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) HBO単独でも腫瘍の増殖を抑制していた。カルボプラチン（CBDCA）にHBOを併用することで抗腫瘍効果の増強がみられ、特に低容量のCBDCA投与時により有意に抑制がみられた。
- 2) HBO単独施行群のみDNA ladderを認め、HBOによる骨肉腫細胞株の細胞死が誘導されていると考えられた。
- 3) HBOの単独使用あるいは併用により、腫瘍体積の増加、肺転移ともに有意に抑制することが確認できた。
- 4) マウス生存率はHBOとCBDCAの併用群で高い生存率を示した。
- 5) 正常コントロール、HBO群ではNK細胞が高頻度に認められたのに対し、HBOを施行しなかったマウスでは悪液質も併発していたため、NK細胞の減少が示唆された。

HBO単独での悪性腫瘍に対する効果に関しては、HBOが腫瘍の増殖や進展を助長する報告が見られる一方で、抗腫瘍効果に働く報告もあり、相反する結果が報告されている。近年の詳細なreviewでは、HBOが腫瘍を抑制したか、もしくは全く影響を与えなかった患者は3000名を超えることを明らかにしている。したがって、HBO単独での暴露が局所及び転移巣の腫瘍細胞を刺激し、増殖を促進する可能性は低く、むしろ抗腫瘍作用として機能すると報告されている。特に肉腫に対する動物実験で、HBOの良好な抗腫瘍効果が認められるという報告もある。今回の研究により、HBOが腫瘍の増殖を遅延させ、肺転移を減少させることが確認できた。また、化学療法との併用により腫瘍の発育、肺転移を抑制することが明らかとなった。また、HBOを施行することで、免疫学的に少なからず良い影響を及ぼしていることが確認できた。以上の知見から骨肉腫治療の新たな選択肢の一つとなり得ると考えられる。

本研究はHBOと化学療法の併用療法が従来の治療を凌駕する可能性を示唆した点で非常に興味深い。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 112 号	学位申請者	川添 泰臣
審査委員	主査	夏越祥次	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	竹内 亨	副査 古川龍彦
	副査	中川昌之	副査 河野嘉文
<p>主査および副査の5名は、平成 22年 11月 24日、学位申請者 川添 泰臣 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) 本研究において、使用する抗癌剤をシスプラチンではなくカルボプラチン (CBDCA) とした理由は？ (回答) カルボプラチンは、悪性脳腫瘍の治療において、HBO との併用効果がすでに証明されており、臨床応用もされている。骨肉腫のキードラッグである白金製剤でもあるため選択した。</p> <p>質問2) 今回の研究では LM8 を使用しているが、LM8 を選択した理由は？また LM8 以外の cell line で腫瘍抑制等の検討を行ったか？ (回答) 本研究ではマウスへの移植、肺転移を検討するため、LM8 が最も適切であったので選択した。また、複数の骨肉腫 cell line を in vitro で検討したが、HBO による腫瘍細胞の増加は認めず、腫瘍抑制効果を確認している。</p> <p>質問3) 本研究で HBO を 2.5 絶対気圧、60 分に設定した理由は？これらの加圧、時間はマウスに対しては適切か？ (回答) HBO の加圧と時間は、臨床にて施行されている治療に準じて設定を行った。また、多くの論文でも、マウスに対し同様の設定で研究が行われており、適切な条件であったと考える。</p> <p>質問4) HBO を施行する上で 60 分、2.5 絶対気圧による副作用の発生はどうか。 (回答) 一般的に HBO の副作用として肺線維症や減圧症等があげられるが、3.0 絶対気圧、90 分を超えなければその危険性は抑えられる。今回の研究では 20 回 HBO 施行した後に肺組織を病理標本で評価したが、全例で肺損傷は確認されず、HBO による副作用はなかったと判断した。</p> <p>質問5) Free radical 産生を促進するアドリアマイシンを使用薬剤に選択しなかった理由は。 (回答) 予備実験としてアドリアマイシンも検討を行った。しかし、薬剤が褐色であり、吸光度測定の際に誤差が出る点、HBO を併用することで心毒性が増強するという点より in vivo での検討は施行していない。</p> <p>質問6) 本研究で DNA ladder が CBDCA 群で確認できなかった理由は？ (回答) 今回の設定濃度は LD30 とした。濃度の調整を行うことで CBDCA 群にも ladder が確認できたと推測される。</p> <p>質問7) 実際に臨床応用が可能となった場合、どの時点で HBO を開始するのが適切と判断するか？ (回答) 腫瘍の有無が確認でき次第、化学療法と HBO 併用で治療開始するのが最適と考える。局所の増殖を抑え、さらに肺転移の抑制にもつながると考える。</p> <p>質問8) 今回の研究では、肺転移の検討を肺表面と最大断面の2項目としているがなぜか？ (回答) 肺転移の病理組織を評価するために最大断面の検討を追加した。肺表面の結節数と2項目検討することで肺転移抑制の効果が十分かつ詳細に確認できたと考える。</p> <p>質問9) 肺表面の結節数に有意差がみとめられたものの、断面の結節数に有意差が認められなかった理由は？ (回答) 最大断面では、結節の数を評価しているために、明らかな有意差が確認できなかった。転移病巣の面積として評価を行った場合には十分な有意差が確認できたと考えられる。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 1 0) 考察でも検討されているが、HBO により血管新生を導き、増殖や転移が促進するとは考えられないか？

(回答) 血管新生が生じたことにより、局所への薬剤作用が増強するとの報告がある一方、腫瘍細胞の増殖を助長する報告もある。その他の論文でも詳細なメカニズムを検討している報告は少ないため、今後の検討課題である。

質問 1 1) NK 細胞の測定を行っているが、これを測定した根拠は？また、NK 細胞の関与を示すデータがあるのか？

(回答) 健常人に対し、HBO を施行すると NK 細胞が増加、維持される実験データが報告されている。腫瘍増殖や肺転移の抑制機序の可能性として、免疫能の評価が重要と考え、今回の予備実験としてマウスの NK 細胞を評価した。

質問 1 2) 外科領域ではイレウスの浮腫予防として使用されているが、in vivo と in vitro での HBO 作用機序に違いはあるか？

(回答) In vitro では培養細胞が直接加圧されるため、加圧という細胞傷害も加わるものと考ええる。

質問 1 3) HBO を施行することでアポトーシスが相乗、増強効果を示す事は確認できたか？またそのメカニズムについて検討をおこなっているか？

(回答) 本研究ではアポトーシスが確認できた点まで評価しており、HBO による効果増強までは評価していない。

質問 1 4) HBO の腫瘍抑制機序としてアポトーシスを評価しているが、それ以外の抗腫瘍効果（細胞遊走能や接着因子）の評価は行っているか。

(回答) 本研究ではアポトーシスのみ評価を行った。予備実験では免疫能の評価として NK 細胞および、CD4, CD8, CD19 の発現を評価した。HBO 施行により NK 細胞の減少を抑制することが確認でき、HBO 施行による免疫能への作用が、腫瘍増殖および肺転移抑制の機序一つとして考えられる。

質問 1 5) In vivo でマウスの腫瘍体積、生存率を 6 週間観察しているが、この観察期間は妥当か。

(回答) 予備実験において、LM8 細胞を移植した control 群のマウスが 6 週目以降はほとんど腫瘍死し、肺転移の評価、採血が不可能であったため、観察期間を 6 週間とした。

質問 1 6) マウスの腫瘍体積を評価しているが、CBDCA 投与群と CBDCA+HBO 群ではグラフ上有意差がないが、相乗効果と言えるか？

(回答) 腫瘍体積上、CBDCA 群と CBDCA+HBO 群間には有意差はなかった。相乗効果とは言えない。

質問 1 7) 今回の HBO の酸素分圧はいくらか。また、100%酸素ではなく、Air のみの加圧での評価は行ったか？

(回答) 本研究では 100%酸素による加圧で評価を行った。Air や酸素分圧を変えての評価は施行していない。

質問 1 8) HBO 施行前後の血中酸素濃度、腫瘍内酸素濃度の評価は施行したか？

(回答) 検討していない。健常人での実験データは報告されているが、マウスでの検討は確認できていない。

質問 1 9) 本研究では、非上皮系腫瘍に対し、HBO の効果が期待できるとの事であったが、上皮系腫瘍でも効果は期待できるか。

(回答) 頸部 SCC に対する HBO 併用では有意差が認められにくいとの報告があり、現時点では sarcoma に対する効果のほうを期待できると考えている。

質問 2 0) 腫瘍体積の評価では control 群以外は腫瘍の増大が抑制されているが、生存率をみると CBDCA+HBO 群以外は低くなっている。この相違はなぜか。

(回答) 腫瘍体積と生存率の乖離は、肺転移が大きく関与していると考ええる。HBO 群、CBDCA 群でも肺転移を一部認めており、このために生存率が低くなったものと考ええる。

以上の結果から、5名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・見識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。