

氏 名（本籍） やす だ ひろ やす  
安 田 浩 康

学位の種類 博 士（医 学）

学位記番号 医 博 第 2 0 1 9 号

学位授与年月日 平 成 1 5 年 3 月 2 4 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科  
（博士課程）内科学系専攻

学位論文題目 Arterial blood carboxyhemoglobin concentrations in patients with advanced lung cancer : relationship to efficacy of chemotherapy  
（進行性肺癌症例における化学療法感受性の予測指標としての動脈血一酸化炭素ヘモグロビン濃度の検討）

（主 査）

論文審査委員 教授 佐々木 英 忠 教授 佐 藤 靖 史

教授 近 藤 丘

# 論文内容要旨

## 背景

誘導型ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は活性酸素等で発現が高まり、他方で HO-1 の代謝産物である一酸化炭素 (CO) は呼気 CO や動脈血一酸化炭素ヘモグロビン (Hb-CO) 濃度として産生量が測定できる。抗癌剤による癌細胞のアポトーシス誘導に細胞内活性酸素の関与が示唆されているため、化学療法に反応して癌細胞の活性酸素産生量が増加する場合に動脈血 Hb-CO 濃度の増加が予想できる。進行肺癌に対する化学療法の実施早期に感受性を予測できる生物学的指標はこれまで報告されていない。

## 目的

動脈血 Hb-CO 濃度が症例毎の化学療法に対する感受性と予後の生物学的指標となることを臨床データと癌細胞を用いた *in vitro* のデータに基づいて示す。

## 方法

化学療法を受けた進行肺癌症例 101 例の治療開始直前、4 日、21 日後における動脈血 Hb-CO 濃度と呼気 CO 濃度を測定し、末梢血リンパ球の HO-1 mRNA の発現を定量 RT-PCR 法により経時的に調べた。また、活性酸素産生の指標として、血清過酸化脂質 (LPO) 濃度と血清過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 濃度を測定した。治療効果は、化学療法前後の胸部 CT の結果により判定され、治療効果のあった CR と PR の症例群を I 群、治療効果のなかった NC と PD の群を II 群として母集団を 2 群に分けた。更に、抗癌剤による HO-1 の誘導に関する機序の解明のために、肺腺癌 A 549 細胞と肺扁平上皮癌 Sq-19 細胞にタキソテルを曝露して、癌細胞から放出された  $H_2O_2$ 、LPO、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の培養液中濃度を経時的に測定した。また、癌細胞のアポトーシスの程度はヒストン/DNA 断片複合体により評価した。そして、抗癌剤に曝露した際の癌細胞放出因子による HO-1 誘導効果を調べるため、癌細胞を抗癌剤で 24 時間処置した後に、交換した培養液を経時的に採取し、それを別の癌細胞の培養液として 24 時間培養し、癌細胞における HO-1 mRNA の発現を定量 RT-PCR 法により定量した。更に、癌細胞から発生した  $H_2O_2$  による HO-1 誘導効果を調べるために、抗酸化剤である catalase, superoxide dismutase (SOD) と diphenylene iodonium (DPI) を培養液に添加し、抑制効果を調べた。

## 結 果

### 臨床結果：

I 群の生存期間はII群よりも有意に長かった。動脈血 Hb-CO 濃度は I 群のみにおいて、組織型や抗癌剤の種類と無関係に、治療開始 4 日後に治療前に比べ有意に増加した。また全例において、治療前と治療 4 日後の動脈血 Hb-CO 濃度差は、治療前後の腫瘍体積の減少量と有意な相関関係を持っていた。

末梢血リンパ球の HO-1 mRNA 発現量と血清 LPO 濃度は I 群においてのみ、治療前に比べ 4 日後に有意に増加した。また、血清 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は全ての検体に於いて検出限界以下であった。

### 癌細胞を用いた in vitro 結果：

A 549 細胞における HO-1 mRNA の発現量は、抗癌剤処置後の培養液の刺激によって経時的に有意に増加した。また、その A 549 細胞では、HO-1 mRNA の発現よりも早期に誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) mRNA の発現が増加したが、HO-2 mRNA の発現量に変化は認められなかった。A 549 細胞と Sq-19 細胞の双方において、培養液上清の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度、LPO 濃度、ヒストン/DNA 断片複合体は、抗癌剤処置後、濃度依存性に経時的に有意に増加した。また、DPI と catalase は、抗癌剤処置後の A 549 細胞における HO-1 mRNA 発現量と HO 活性を有意に抑制した。また、培養液中の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  は抗癌剤処置前後を通して検出感度下限前後であった。

## 考 察

抗癌剤に対して感受性のあった I 群において、治療開始 4 日後の動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は腫瘍体積の縮小量と関係した。また、I 群の生存率が抗癌剤の感受性のない II 群に比べて有意に高かったことより、動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は抗癌剤に対する感受性を反映すると示唆された。I 群症例の末梢血リンパ球と、培養 A 549 細胞で抗癌剤処置後に HO-1 mRNA 発現量が増加した。血清中と細胞培養液中の LPO 濃度と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度、および、ヒストン/DNA 断片複合体が抗癌剤投与後に増加し、更に DPI と catalase は、抗癌剤処置後の癌細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量、HO-1 mRNA 発現量、HO 活性を有意に抑制したことから、抗癌剤による癌細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生が癌細胞のアポトーシスに関与し、癌細胞及び周辺細胞の HO-1 発現の亢進と動脈血 Hb-CO 濃度の増加に関係したと考えられた。

## 結 論

進行肺癌症例において、化学療法開始 4 日後の動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は、抗癌剤に対する化学療法感受性を治療開始早期に予測を可能とする、有用で簡易な生物学的指標となり得る。

## 審査結果の要旨

抗癌剤による治療効果は癌細胞の病理組織型と症例個人により大きな差があり、抗癌剤の選択によっては予後が大きく異なり、症例毎に最適な抗癌剤を早期に選択する必要性が強くなっている。また、これまでに、臨床的に実用的な、化学療法の実施早期に感受性と予後を予測できる生物学的指標は報告されていない。一方、化学療法による癌細胞のアポトーシスに細胞内活性酸素の関与が示唆されている。誘導型ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は活性酸素等で発現が高まり、他方で HO-1 の代謝産物である一酸化炭素 (CO) は呼気 CO や動脈血一酸化炭素ヘモグロビン (Hb-CO) 濃度として産生量が測定できる。本論文では、動脈血 Hb-CO 濃度が症例毎の化学療法に対する感受性と予後の生物学的指標となることを臨床データと癌細胞 (A 549 細胞と Sq-19 細胞) を用いた *in vitro* のデータに基づいて明瞭に示している。

抗癌剤に対して感受性のあった I 群症例において、治療開始 4 日後の動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は腫瘍体積の縮小量と関係した。また、I 群症例の生存率が抗癌剤の感受性のない II 群症例に比べて有意に高かったことより、動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は抗癌剤に対する感受性を反映すると示唆された。I 群症例の末梢血リンパ球と、培養 A 549 細胞で抗癌剤処置後に HO-1 mRNA 発現量が増加した。血清中と細胞培養液中の LPO 濃度と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度および、ヒストン/DNA 断片複合体が抗癌剤投与後に増加し、更に diphenylene iodonium と catalase は、抗癌剤処置後の癌細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量、HO-1 mRNA 発現量、HO 活性を有意に抑制したことから、抗癌剤による癌細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生が癌細胞のアポトーシスに関与し、癌細胞及び周辺細胞の HO-1 発現の亢進と動脈血 Hb-CO 濃度の増加に関係することを明らかにした。以上の結果から、進行肺癌症例において、化学療法開始 4 日後の動脈血 Hb-CO 濃度の増加量は、抗癌剤に対する化学療法感受性を治療開始早期に予測を可能とする、有用で簡易な生物学的指標となり得ることを精力的に示した。

本論文は、学位論文に十分値すると認められた。