



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of radio-resistance mechanisms in cancer stem-like cells isolated from canine tumor cell lines and stem cell-selective radio-sensitizing property of anti-diabetic agent metformin. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	出口, 辰弥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13504号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74783
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuya_DEGUCHI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：出口 辰弥

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Evaluation of radio-resistance mechanisms in cancer stem-like cells
isolated from canine tumor cell lines and stem cell-selective
radio-sensitizing property of anti-diabetic agent metformin

（犬腫瘍細胞株におけるがん幹細胞の放射線耐性機序および
抗糖尿病薬メトホルミンの幹細胞選択的放射線増感効果に関する基礎的研究）

医療、獣医療において腫瘍に対する放射線治療は重要な役割を果たし、体への負担が少ない有用な治療法である。放射線治療はほとんどの患者において、初期は良好な反応を示し、患者の臨床症状を改善することができる。しかし、いずれは腫瘍の再増大、それに伴う臨床症状の再発を認め、最終的には根治には至らず死に至ることが問題となっている。腫瘍の再増大は、腫瘍細胞内に放射線治療抵抗性の細胞が存在し、放射線治療後に生存、再増殖することが起因となっていると考えられる。そのため、それらの放射線治療抵抗性細胞を同定し、根絶することが新たな放射線治療戦略として望まれている。

Cancer stem-like cells (CSCs) は、放射線治療抵抗性細胞として注目されている。CSCs はがん組織の中で非常に少ない集団であるにも関わらず、DNA 損傷修復能や酸化ストレスを回避する能力が高いことから放射線治療に耐性を示す。そのため、治療によって生き残った CSCs が新たながん細胞を生み出すために、完治することなく再発の起因と成っていると考えられている。しかし、イヌ腫瘍における CSCs の特性、放射線抵抗性および放射線抵抗性機序は不明である。そこで本研究では、イヌ腫瘍の放射線治療抵抗性の原因として CSCs の存在を証明し、それらの特性を解析し、治療の標的とすることで、がんのより高い治療効果や新しい治療の発展に寄与することを最終目的としている。第 1 章では、犬の腫瘍細胞株から、Sphere formation を用いて CSCs を分離し、その性質および放射線反応性の検討を行った。第 2 章では、CSCs に有効な薬剤の探索および放射線抵抗性機序の解明のため、メトホルミンを用いて、その放射線増感効果およびその作用機序についての評価を行った。

第 1 章では、イヌの腫瘍細胞株から CSCs を分離し、放射線反応性を明らかにするため、イヌの骨肉腫、メラノーマ、移行上皮癌および肺腺癌の 4 種細胞株から非足場細胞培養である Sphere formation を用いて分離した球状コロニーの細胞 (Spheroid cells、以下 SCs) について、通常条件

の接着培養の細胞 (Adherent cells、以下 ACs) と比較し、以下の検討を行った。CSCs の形質の解析のために、RT-PCR を用いた CSCs マーカーの発現量の評価、およびマウスへの腫瘍移植試験を用いて腫瘍形成能の評価を実施した。続いて、放射線反応性の解析のため、コロニー形成法を用いて X 線暴露下における生存曲線を作製し、p53-binding protein (53BP1) の集積による X 線暴露後の DNA 損傷の蓄積を評価した。Sphere formation を用いて分離培養した SCs は、ACs と比較して CSCs の形質である CD133 を始めとした幹細胞マーカーを高発現しており、高い腫瘍形成能を有していた。また、X 線暴露下の各線量において SCs は ACs と比較して高い生存率を示し、SCs は X 線暴露後の DNA の損傷蓄積が少ない結果となった。これらの結果から、Sphere formation を用いて分離した SCs が CSCs の形質および放射線抵抗性を有する CSCs モデルとして適した細胞群であることが示唆され、イヌの腫瘍において、CSCs が放射線感受性を決定する重要な因子であることが示された。

第 2 章では、CSCs を標的とした治療の確立のため、メトホルミンの放射線増感効果およびその作用機序を解析することを目的とした。メトホルミンはミトコンドリアの呼吸鎖を標的として、AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化による mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の抑制、およびミトコンドリア呼吸鎖の阻害による活性酸素種 (ROS) の増加などの抗腫瘍効果を有するとされてきた。しかし、特に CSCs に対するメトホルミンの放射線増感効果や作用機序は明らかになっていないため、イヌの骨肉腫細胞株から Sphere formation を用いて分離した SCs および対照群として ACs を用い、以下の検討を行った。メトホルミンの放射線増感効果の有無について、コロニー形成法を用いて X 線暴露後の細胞生存率および DNA 損傷蓄積を評価した。また、メトホルミンのミトコンドリアに対する効果を評価するため酸素消費量、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生量および ROS の測定を行った。SCs において、メトホルミンは、放射線照射後の細胞死、および DNA 二本鎖断裂を優位に増加させた。また、放射線増感効果を示した濃度のメトホルミンは、SCs においてミトコンドリアの呼吸活性を優位に抑制し、ミトコンドリア膜電位および ATP 減少させ、細胞内の ROS を増加させることが示された。これらのことから、メトホルミンは SCs に対して、ミトコンドリアの呼吸活性を抑制することで選択的に放射線増感効果を示すことが証明された。さらに、メトホルミンが ACs と比較して SCs に対して放射線増感効果の感受性が高いことについて、ミトコンドリアの呼吸活性について評価を行ったところ、SCs は ACs と比較して呼吸活性が高いことが示された。このことから、ミトコンドリアの呼吸活性は放射線抵抗性に重要な因子となると考えられ、ミトコンドリアを標的としたメトホルミンのような薬剤は CSCs を標的とした治療に有用であることが示唆された。本研究より、イヌの腫瘍において、CSCs は放射線感受性を決定する因子として重要であることが強く示された。また、CSCs の放射線抵抗性においてミトコンドリアを標的としたメトホルミンが放射線増感薬として有効であることが示され、ミトコンドリアの機能が低いことが CSCs の放射線抵抗性に関与している可能性が示された。