



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	がん細胞のミトコンドリア機能を中心としたエネルギー代謝の放射線応答に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	山本, 久美子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14117号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78521
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kumiko_YAMAMOTO_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：山本 久美子

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

がん細胞のミトコンドリア機能を中心としたエネルギー代謝の
放射線応答に関する研究

通常、正常な細胞は好氣的な状態ではエネルギー産生の大部分をミトコンドリア電子伝達系 (ETC) に依存している。一方がん細胞では、酸素が十分にあってもエネルギー産生をミトコンドリア ETC よりも解糖系に依存していることが広く知られている (ワールブルグ効果)。しかし、近年の研究ではがん細胞への X 線照射によってミトコンドリアが活性化することやミトコンドリア阻害剤の処理によってがん細胞の放射線感受性が上昇することが明らかになっており、ミトコンドリアは放射線照射後の細胞の生存において重要な役割を担っている可能性が示されている。そのため、がん細胞においてもミトコンドリアは放射線治療の標的となり得るが、放射線に対するミトコンドリア ETC の役割については不明な点も多い。そこで本研究では、ミトコンドリア ETC を中心とした放射線応答の詳細を明らかにするために、ミトコンドリアエネルギー代謝の新規評価法を確立し、この方法を用いて X 線照射後の代謝応答の評価を行った。

第一章では、がん細胞におけるミトコンドリア ETC のエネルギー代謝の放射線応答について評価を行った。電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた酸素消費率の測定と様々なミトコンドリア標的試薬を組み合わせた新規のミトコンドリア呼吸機能評価法を確立し、ミトコンドリア呼吸機能の放射線応答の評価を行った。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにヒト膵臓がん由来 MIA PaCa-2 細胞への X 線照射後にミトコンドリア呼吸パラメーターが上昇したことから、放射線照射後にミトコンドリア ETC が活性化することが示唆された。また、この活性化のメカニズムを明らかにするために、細胞当たりのミトコンドリア量でミトコンドリア呼吸パラメーターの値を補正したところ、X 線照射後の細胞の値は非照射の細胞の値とほぼ同じであった。さらに、ミトコンドリア ETC において電子の受け渡しを担っているセミキノン (SQ) ラジカ

ルおよび鉄-硫黄 (Fe-S) クラスターを低温条件の ESR 測定により評価した。X 線照射後に SQ ラジカルは上昇したものの、Fe-S クラスターに変化は見られなかった。このことから、X 線照射によってミトコンドリア ETC の電子の流れは活発になり、さらにレドックス状態の不均衡が誘導されていることが示唆され、これが X 線照射後のミトコンドリアからの ROS 産生増加の原因の一つであることが類推された。また、この ROS の増加が細胞損傷に寄与するのかを確かめるために、細胞内アラキドン酸の過酸化物である 8-isoPGF_{2α} および 5-iPF_{2α}-VI の測定を行った。その結果、どちらの化合物も ROS 産生が増加する X 線照射から 24 時間後まで非照射細胞との差はほとんど見られなかった。さらに、細胞内 AMP、ADP、ATP、NAD⁺ ならびに NADH 量の測定を行ったところ、これまでの研究では X 線照射後に ATP のみの上昇が報告されていたが、本研究では X 線照射によって ATP のみならず AMP、ADP ならびに NAD⁺ が上昇し、NADH は一定であることが明らかになった。さらに細胞内のエネルギー状態の指標であるエネルギー充足率 (AEC) を算出したところ、X 線照射後にもかかわらず生理的な条件下の細胞と同レベル 0.76~0.86 の間の値を示した。以上の結果から、放射線照射後にミトコンドリア ETC が活性化することが示唆され、その際に AEC や NADH が生理的条件の範囲内で維持されていたことから、このミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する ATP を必要とする DNA 修復等のための適応応答の一つであることが示された。

がんはワールブルグ効果により解糖系が優位であるといわれているため、第二章ではミトコンドリア ETC のみならず解糖系の放射線応答の評価も HeLa 細胞、SW480 細胞、A549 細胞ならびに MIA PaCa-2 細胞を用いて行った。グルコース代謝の指標の一つである細胞外酸性化速度の ESR 法を用いた新たな評価法を確立し、放射線応答の評価を行った。細胞外酸性化速度については X 線照射の影響は見られなかった。また、グルコース類似体である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の細胞内への取り込みやグルコース代謝の最終産物である乳酸の細胞外への排出に対する X 線照射の影響を評価したところ、2-DG の取り込みおよび乳酸産生の両方で X 線照射後に値が上昇することが示された。以上の結果から、グルコース代謝についても放射線照射後に活性化することが示唆された。

以上の結果をまとめると、放射線照射後のがん細胞のミトコンドリア ETC の活性化は放射線に対する適応応答の一つであり、このミトコンドリアの適応応答は放射線療法における標的となり得ることが示唆された。さらに、本研究ではミトコンドリア電子伝達系のみならず、グルコース代謝についても放射線による活性化が見られた。がん治療の観点から考えると、ミトコンドリア ETC は好氣的な状態であると正常細胞にとっても重要なエネルギー代謝経路であることから、がんの特異的な代謝経路である解糖系とミトコンドリア ETC の両方の阻害を行うことで、よりがん特異的な治療を行えるのではないかと考える。

さらに今回確立した ESR を用いたミトコンドリア呼吸機能の評価法では、少ない細胞数でも再現性の高い評価が可能であり、蛍光による影響も受けなため、GFP を始めとした蛍光物質を発現した細胞の測定やクエンチャーとして作用する試薬の処理も可能である。また、本手法は細胞を浮遊させた状態で測定を行うため、細胞外フラックスアナライザーでは扱いにくい骨髄腫細胞やリンパ球などの浮遊細胞の測定にも適していると考えられる。さらに、少ない細胞数での測定が可能であ

るため、増殖が極めて遅い細胞であっても測定に必要な細胞数の確保ができるといった利点がある。そのため、本手法はあらゆる細胞種におけるミトコンドリアを標的としたがん治療の発展のために有用な評価法であると考えられる。

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学） 氏名：○ ○ ○ ○
Name

Studies on the
(. . . における に関する研究)

[illegible]

- 注 1) 論文の題名が外国語の場合には、日本語訳を（ ）を付して記入すること。
- 2) 要旨は、日本語で 3,000 字以内または英語で 500 語以内で記載すること。
- 3) 学位論文題目は、学位論文及び「論文目録」に記載の学位論文名と完全に一致させること。

- Notes: 1) In the case that the title is in English, also provide a Japanese title in parenthesis.
2) Abstract must be written within either 3,000 Japanese characters or 500 English words.
3) The title of the doctoral dissertation shall be exactly the same as the title of "Doctoral dissertation" and that is on the "List of publications (form 3)"