



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：山本 久美子

審査委員

主査	教授	稲波	修
副査	教授	石塚	真由美
副査	准教授	池中	良徳
副査	准教授	安井	博宣

学位論文題名

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

古くからがん細胞は酸素が十分存在する条件でも解糖系によるエネルギー代謝が優位であるというワールブルグ効果がある事がよく知られている。また、グルタミンや酢酸をエネルギー源としてTCA回路や電子伝達系がエネルギー代謝に関与する等のがん特異的エネルギー代謝の存在も知られるようになり、近年、これらエネルギー代謝を標的とした処置と放射線や化学療法と組み合わせた新たながん治療法が報告されている。こうしたがんのエネルギー代謝を評価する方法として、放射性同位体あるいは安定同位体、酸素電極やpH電極、フラックスアナライザー等が用いられてきた。磁気共鳴法を用いた非侵襲的方法も開発されてきているが、解像度・感度や特異的プローブの開発などで十分でない点もあり、今後、優れた方法の開発が求められている。本学位申請者山本久美子氏は電子スピン共鳴法（ESR）を用いて、培養細胞系での酸素代謝ならびに糖代謝の高感度評価法の新たな方法を開発し、この方法を中心に様々ながん細胞の放射線応答を評価した。

山本久美子氏は三重項酸素（バイラジカル）と安定ラジカルである酸素プローブ（LiNc-BuO）とのスピンスピン相互作用による緩和時間に依存したESRスペクトルの線幅の変化を指標に細胞当たりの酸素消費率（Oxygen consumption rate: OCR）の測定法を確立した。具体的には開発された方法はガスタイトキャピラリーチューブに既知数の培養細胞と酸素プローブを封入し、37℃保温下で経時的にESRスペクトルをモニターすることで、極めて再現のよいOCR測定法を作成した。さらに、ミトコンドリア呼吸系の脱共役剤CCCP、呼吸複合体阻害剤であるロテノンやアンチマイシン存在下での実験から、フラックスアナライザーのみで可能とされていた各種ミトコンドリア酸素呼吸パラメーターの測定に成功した。山本久美子氏はこの手法に加えて、電子伝達系に関与するセミキノンや鉄-硫黄クラスターの極低温ESR測定、HPLCによる高エネルギーリン酸ヌクレオチドの測定、トリプル四重極質量分析計を用いた細胞の脂質過酸化の定量

等を行い、既に先行研究で報告されていたがん細胞において放射線照射後12時間から24時間後に起きるミトコンドリア電子伝達系の活性化機構の解明に取り組んだ。ヒト子宮頸部がんHeLa細胞を含めて4種類の株化細胞を用いて評価した結果、放射線によるミトコンドリアエネルギー代謝の活性化は、放射線によるミトコンドリア量の増加に伴っておきたものであり、生理的な適応応答の可能性が高いことを明らかにした。また、糖代謝はこれまで放射性同位体で標識した2-デオキシグルコース (2DG) やFDGの取り込みが多く用いられてきたが、山本氏は安定ラジカルR-SGの中性付近でのプロトン化による超微細結合定数の変化による、 ^{14}N の磁性核の三本線の分裂幅の変化に着目し、これを経時的に測定することで培養系でのグルコース代謝に伴う細胞外酸性化速度 (Extracellular acidification rate: ECAR) についての評価法できるのではないかと考えた。この方法の確立には、選択すべき緩衝液に用いる緩衝剤の選択とその濃度、また時間経過とともに低酸素となってしまうことが大きな課題であったが、山本久美子氏は、それぞれ、0.1mMトリシンを用いることと細胞を封入するチューブにガス通気性のテトラメチルペンテン (TPX) 製のキャピラリーチューブを用いることで解決した。山本氏はこの手法を用い、がん細胞のECARの放射線応答を検討した。その結果、放射線照射によりECARは4種類の細胞で大きな変化は示さなかった。一方、放射性標識2-DGや細胞外乳酸濃度測定の結果では放射線照射によって4種類の細胞で有意な増加を示したことから、ECARすべてが糖代謝を反映しているのではない可能性が示唆された。

山本久美子氏は電子スピン共鳴法を用いたOCRならびにECARの新たな測定方法を確立し、培養細胞の代謝評価に用いることが出来ることを示し、放射線によるがん細胞のエネルギー応答を他の方法と組みあわせて多面的に明らかにし、これが放射線に対する細胞の適応応答の1つである可能性を提唱した。また、特にESRを用いたOCR測定は今まで正確な測定が困難とされてきた浮遊細胞やスフェロイドを用いた代謝を標的としたがん治療開発研究で有用な方法論となると考えられる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者山本久美子氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。