



Title	がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀川, 芽衣
Description	配架番号 : 2727
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14980号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85858
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HORIKAWA_Mei_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 (医 学) 氏名 堀川 芽衣

主査 教授 近 藤 亨
審査担当者 副査 准教授 野 田 航 介
副査 准教授 岩 永 ひ ろ み

学 位 論 文 題 名

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解析
(Studies on the effect of cancer cells on the tumor microenvironment and its mechanisms)

本学位論文は、がん細胞の酸性化および糖枯渇への耐性メカニズムの解明を目的として、第1章では細胞内のアルカリ化に寄与する CAIX の解析から細胞内輸送に関わる AMAP1 との相互作用が CAIX の機能に重要であること、第2章では複数の遺伝子を導入した細胞をピューロマイシン単独で選別することができる新たな分割型ピューロマイシン耐性遺伝子(PAC)システムと哺乳類細胞では代謝されないグルコース前駆体をグルコースに変換する酵素群を導入した細胞を新たに構築し、糖充足細胞の代謝産物が共存する欠乏細胞の生存を促進すること(代謝協調)を証明したものである。基本的な分子細胞生物学実験と免疫染色実験を主な研究手法とし、分割型ピューロマイシン耐性遺伝子(PAC)システムと試験管内代謝協調実験系を新たに構築した。

審査にあたり、まず副査の野田准教授から CAIX が MMP-14 と複合体を形成するとあるが、それにより MMP-14 の機能にメリットがあるか質問があり、申請者は MMP-14 は細胞外ドメインの周囲が酸性化されると活性化する分子で、CAIX と共局在することにより CAIX の働きで細胞外に H⁺が汲み出され、MMP-14 が活性化しやすい pH 条件となり、細胞外基質の分解が促進されるため、これらが共局在することは MMP-14 の機能に有利となると回答した。MMP-14 や integrin 以外にも CAIX と複合体を形成している分子はあるかという質問に対して、CAIX は炭酸脱水素酵素であるため、それ単独では細胞内外のイオンのやり取りができず、様々な transporter と協調することで CAIX によって産生された HCO₃⁻が細胞内に取り込まれ、H⁺が細胞外に汲み出される。そのため、MMP-14 や integrin 以外にも様々な transporter と複合体を形成すると考えられると回答した。正常組織でも低酸素であれば CAIX の up-regulation は起こるか、また、それによって細胞によい影響があるかという質問には、CAIX は HIF-1 による制御を受けるので、正常組織が低酸素状態に曝された際にどれだけ HIF-1 α の発現が増強するかに依存すると思われるが、正常組織内でも低酸素下であれば CAIX 発現が増加することは起こり得ると回答した。学位論文にあった CAIX の酵素機能だけを阻害する手法でなく、切断を防ぐことにより治療効果を向上させるのはどういう仕組みかという質問に対して、現在 CAIX に対する抗体による治療が存在するが、CAIX は膜貫通ドメインで切断を受け細胞外に発現する酵素活性を示す領域が細胞から切り離されることでがん細胞に対する抗体製剤の効果が低下するという現象が想定

されるため、細胞を障害する薬剤を付加した CAIX 抗体が CAIX に結合し、細胞内に取り込まれたタイミングで CAIX の細胞膜への recycling を阻害できれば、薬剤を細胞内に留めた状態で細胞に作用させることができ、治療効果が向上すると期待していると回答した。

副査の岩永准教授からは CAIX と AMAP1 の免疫染色で小胞状だけでなく、管状に染まることはあるか、また、染色パターンと似た細胞小器官はあるか質問があり、申請者は小胞自体が tube 状に見えることもあったが、それが他の細胞小器官であるかは判定できなかつたと回答した。代謝協調は正常組織でも起こるかという質問に対し、糖充足細胞と糖枯渴細胞が近接して存在する場合、正常細胞同士でも代謝協調が起こることは有り得ると考える。現在がん細胞のみしか確認していないので、今後正常細胞を使用して解析してみたいと回答した。

最後に主査の近藤教授から他の CA グループの機能について質問があり、申請者は CAIX は細胞外の CO_2 と H_2O から HCO_3^- を産生して細胞内に送り、細胞外に H^+ を汲み出す機能を有し、CAII は細胞内で H^+ と HCO_3^- から CO_2 を産生して細胞外に排出する働きをするが、その他の CA グループの機能の詳細は確認できていないと回答した。CAIX の Western blotting で band が 2 つ認められるが、どちらが main band かという質問に対し、発現量の観点から上の band が main で、下の band は分解を受けたものであると判断したが、抗体によって band の発現パターンが異なることもあり、western blotting の結果のみではどちらが main band かは判断できなかつたと回答した。PAC の切断点をいくつか設定しているが、どのように決めたかという質問には、分割型 PAC を再結合させるため split-intein を用いる際に断片の C 末端側の第一アミノ酸はセリン/スレオニンまたはシステインであることが最適とされるため、PAC のアミノ酸配列の中で、そのような部位を検索し、切断部位とした。また、PAC を 4 分割することを想定していたためより多くの切断部位を検討したく、PAC の類似酵素のアミノ酸配列についても適切な部位を検索し、PAC の配列においてそれに相当する部位を最適なアミノ酸に置き換えた。さらに、代謝協調の及ぶ範囲を特定するような実験は行ったかという質問には、今回用いた 2 次元培養の共培養系ではグルコース濃度の勾配を作ることが難しく、検証することができなかつた。主査から、マトリゲルを用いた培養系で細胞層の厚みを規定しながら実験する方法のアドバイスがあった。

全ての質問に対して申請者は文献的知見と実験結果をもって適切に回答した。また本研究で解明した研究成果の意義、今後解明すべき点を明確に理解し、次段階の研究指針や応用の方向性も十分把握していた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。