



Title	がん細胞集団におけるDNA量不均一性が放射線治療後の放射線抵抗性細胞出現におよぼす影響に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山下, 晃矢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16470号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95486
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koya_Yamashita_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：山下 晃矢

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

がん細胞集団における DNA 量不均一性が放射線治療後の
放射線抵抗性細胞出現におよぼす影響に関する研究
(Study on the Role of DNA Ploidy Heterogeneity
in Cancer Cell Populations
in the Emergence of Radioresistant Cells after Radiotherapy)

がんにおける腫瘍内不均一性 (intratumor heterogeneity) は治療抵抗性と関連する。がんの放射線治療においても、放射線治療後の再発がん患者や放射線分割照射されたがん細胞集団からは放射線抵抗性の高いがん細胞が検出されており、腫瘍内不均一性を背景とした放射線抵抗性がん細胞の存在が治療抵抗性に寄与することが指摘されている。DNA ploidy heterogeneity は、単一の腫瘍内に異なる染色体数または異なる DNA 量を持つ 2 種類以上のがん細胞が存在する状態を指し、腫瘍内不均一性の一種である。実際に、単一の腫瘍の複数部位からサンプリングすることによって、DNA ploidy heterogeneity の存在は確認されている。

DNA は電離放射線の主な標的となるため、細胞の倍数性と放射線感受性との関係が分析されてきた。しかしながら、このような研究は異なるがん種または異なる患者に由来するがん細胞株の包括的な比較に基づいている。一方で、単発性に生じたがん細胞が増殖する過程で生じた腫瘍内不均一性の観点において、DNA 量や倍数性の不均一性が放射線治療への抵抗性におよぼす影響に関しては、情報が限られており十分に明らかになっていない。それゆえ、本研究では単一の腫瘍に由来し DNA 量不均一性を有する細胞集団に注目した。DNA 量不均一性のあるがん細胞集団に治療を模倣した X 線分割照射を行い、放射線抵抗性の細胞株を樹立した。単一腫瘍に由来するがん細胞集団において、DNA 量や染色体数の異なる細胞集団の割合が放射線分割照射によってどのように変化するのか、また DNA 量不均一性が放射線分割照射による放射線抵抗性がん細胞出現にどのように寄与しているのかについて調べるために、親株と放射線抵抗性クローンの性質を比較した。

本研究では、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞を使用した。SW480 細胞は hyper-diploid の細胞が大部分を占めるが、hyper-tetraploid の細胞もわずかに存在しており、DNA 量不均一性を有している。まず初めに、培養環境がこの細胞集団の DNA 量不均一性に及ぼす影響を調べた。DMEM という培地で SW480 細胞を培養すると、より DNA 量の多い hyper-tetraploid の細胞

が優勢な集団となる変化が生じた。推奨されている L-15 培地では、このような集団の割合の変化は起こらなかった。培地の組成の違いに着目し、栄養成分を調整した培地を複数検討したところ、DNA 量の多い細胞が優勢となるのはグルコースを含む培地で培養された場合であることが明らかになった。

DMEM による培養を経て DNA 量の多い細胞が優勢となった細胞集団 SW480.hu 細胞に対し、2.5 Gy×20 回の X 線分割照射を行った。生き残った細胞からクローニングにより放射線抵抗性の SW480RR 細胞を樹立した。SW480RR 細胞の 10%生存線量は 5.0 Gy で、SW480.hu 細胞における 3.4 Gy の約 1.5 倍であった。染色体数および DNA 量の評価により、SW480RR 細胞は hyper-diploid であり、その DNA 量は親細胞集団内の DNA 量が少ない細胞集団と一致することが明らかになった。

放射線誘導性の細胞死について、親株と抵抗性株でアポトーシスや細胞老化の誘導に放射線感受性の差異を説明できるほどの違いは認められなかったが、抵抗性株では放射線照射後のネクロシス細胞の割合が抵抗性株よりも有意に少なかった。DNA 二本鎖切断とその修復について評価したところ、SW480RR 細胞では放射線照射後の初期 DNA 損傷量が親株よりも有意に少なかったが、DNA 修復能の亢進のような抵抗性獲得を示す証拠は得られなかった。また、SW480RR 細胞のエネルギー代謝活性は親株 SW480.hu 細胞よりも低かったが、これが放射線抵抗性に寄与しているという証拠は見いだせなかった。以上の結果から、SW480RR 細胞の高い放射線抵抗性について、放射線照射後の初期 DNA 損傷量が少ないことがその一因となっていると考えられた。このことは、SW480.hu 細胞に分割照射して得られた複数のクローンで確認された。

続いて、SW480RR 細胞の放射線抵抗性が内在性の抵抗性なのか、放射線分割照射の過程で新たに獲得されたものなのかを明らかにするため、照射を経ずに親株 SW480.hu 細胞から直接クローン株を樹立し、DNA 量と放射線感受性の関係について解析した。その結果、SW480.hu 細胞を構成する二集団には分割照射される以前から放射線感受性の差異があり、DNA 量が少ない細胞はより高い放射線抵抗性を有していることが明らかになった。このことから、放射線抵抗性 SW480RR 細胞は、内在性に高い放射線抵抗性を有する細胞が分割照射の過程で生き残り、選択されたものであることが明らかになった。標的論に基づけば、DNA は放射線の主な標的であり、細胞あたりの DNA 量が少ないほど同じ線量の放射線の照射によって生じる初期 DNA 損傷量は少なくなると予想される。さらに、初期 DNA 損傷量の低減は、放射線照射後の高い生存率に寄与すると考えられる。このような、DNA 量の差異を背景とした初期 DNA 損傷量の差異が、SW480RR 細胞の内在性に高い放射線抵抗性の一因になったと考えられた。

本研究はヒト大腸がん由来 SW480 細胞株を用い、放射線分割照射後の放射線抵抗性細胞の出現と intratumor heterogeneity としての DNA ploidy heterogeneity との関連を実例で示すものである。細胞の DNA 量の差は内在性の放射線感受性の差異に寄与し、その結果、放射線分割照射の過程で放射線抵抗性の細胞集団が選択されることになる。DNA 量の不均一性は腫瘍の複数部位からサンプリングを行わないと過小評価されてしまうことが指摘されており、本研究の知見は DNA 量不均一性の評価の適切さの重要性を示唆している。また、DNA 量不均一性のある細胞集団において、異なる放射線感受性を有する細胞の割合が培養環境によって変動したことは、培養がん細胞を用いた研究全般における注意点として、培地の選択の重要性を強調する。本研究の知見は、がん患者の放射線治療への感受性や抵抗性について直接説明するものではないが、治療抵抗性に関連する intratumor heterogeneity としての DNA 量不均一性について潜在的な重要性を強調する。