



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_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 下 晃 矢

審査委員	主査 教授	岡松 優子
	副査 教授	稲波 修
	副査 准教授	安井 博宣
	副査 講師	青島 圭祐

学位論文題名

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)

固形腫瘍の放射線治療の際に治療抵抗性細胞の出現は臨床現場でしばしば大きな問題となっている。この放射線抵抗性細胞の出現は腫瘍微小環境内に存在する二種類以上の異なる DNA 量を持つ不均一な細胞集団、いわゆる DNA 量不均一性 (DNA Ploidy Heterogeneity) が 1 つの重要な要因と考えられている。こうした DNA 量不均一性を持つがん細胞に分割照射をすると放射線抵抗性細胞が出現する事についての先行研究はあるものの、分割照射によって細胞集団の構成がどのように変化するか、また倍数性と放射線感受性の関係についての詳細な検討は行われていない。これまでの倍数性と放射線感受性に関する多くの先行研究において、がんの種類が異なる患者間の腫瘍間不均一性を調査したものが多く、成長と共に DNA 量不均一性を獲得したがん細胞について、分割照射による抵抗性細胞の出現とその機序を調べた研究は見当たらない。そこで、山下晃矢氏は本研究において DNA 量不均一性をもつヒト大腸がん由来 SW480 細胞に着目し、培地の栄養条件を変化させたときの倍数性の変化を詳細に検討し、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) での継代により生じる DNA 量の多い高異数倍数体 (Hypertetraploid) を多く含む SW480. hu 細胞株を確立した。さらに、山下氏はこの SW480. hu 細胞株に対して分割照射を行ない、その生存細胞から放射線抵抗性株 SW480RR 細胞株を確立すると共にその放射線抵抗性の機構について検討した。

分割照射で得られた抵抗性 SW480RR 株をコロニー形成能（増殖能）の 10% 生存率 (D_{10}) で SW480. hu 株と比較すると、約 1.5 倍の抵抗性を示した。山下氏はこの放射線抵抗性の機序を検討するために、放射線感受性に関する指標として、DNA 量と染色体数、ならびにヨウ化プロピジウム染色によるフローサイトメトリーによ

る細胞周期について検討した。更に、二本鎖 DNA 損傷の修復に関与する 53BP1 タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織染色での DNA 鎖切断の量と修復速度、細胞内還元型グルタチオン量、エネルギー代謝については細胞内 ATP 量、 ^3H -2-デオキシグルコース (^3H -2-DG) の取り込み、ならびにフラックスアナライザーによるミトコンドリアの酸素消費率 (OCR) ならびに解糖系の指標の乳酸産生による酸性化速度 (ECAR) 等について検討した。その結果、親株の SW480.h 細胞株は DNA 量の異なる二種類の細胞集団であり、DNA 量を多量に含む高倍数体の細胞集団が主要であり、DNA 量が高倍数体のほぼ半分の細胞集団が僅かに存在している事が示された。一方、放射線抵抗性 SW480RR 細胞株は DNA 量が半分の集団が主要な割合を占めていることが明らかとなった。一細胞当たりの染色体数の最頻値は SW480.hu は 96 本で、SW480RR は 58 本であった。一方、細胞周期分布と細胞内グルタチオン量については両細胞株間で有意差は認められなかった。DNA 二本鎖切断の指標の 53BP1 の照射直後に形成されるフォーカス数については SW480.hu は 1 細胞当たり 2.39 個、SW480RR は 0.84 個で、SW480RR の方が有意に少なかったが、修復能は両者の間で有意差はみられなかった。また、細胞内グルタチオン濃度も両細胞株で差が認められなかった。

SW480RR 株は SW480.hu 株と比較して、ATP 量、 ^3H -2-DG の取り込み量、ならびに OCR 値すべてにおいて有意に高い値を示した。さらに SW480RR 株以外の抵抗性の 2 つのクローンについても DNA 量、染色体数、ならびに初期放射線誘発 DNA 二本鎖切断量について検討したところ、親株の SW480.hu 株と比較して、少ない傾向を示した。また、山下氏は DNA 量不均一性を示さないヒト大腸がん細胞 HT29 細胞でも分割照射によって抵抗性株を作製し、DNA 量と初期 DNA 二本鎖切断量について検討したところ、親株と抵抗性株について有意な差は見られなかった。

以上の結果は不均一性を獲得したがん細胞において、分割照射により DNA 量と染色体数の少ない放射線抵抗性を示す集団が生き残り、それらの細胞が治療抵抗性細胞となるという新しい治療抵抗性出現機構を明瞭に示したものであり、DNA 量不均一性を示さないがん細胞で既に報告されている放射線抵抗性獲得機構とは異なる機構を示唆するものであった。今回の知見は今後の DNA 量不均一性を持つがん組織の放射線治療抵抗性獲得を理解する上で極めて重要であると考えられる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者山下晃矢氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。