

氏名（本籍）	田村 磨聖（茨城県）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7047 号			
学位授与年月	平成26年 3月25日			
学位授与の要件	学位規則第 条第 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Mitochondrial reactive oxygen species and gastric cancer (ミトコンドリア由来活性酸素と胃がん)			
主	査	筑波大学教授	医学博士	松村 明
副	査	筑波大学教授	医学博士	谷中 昭典
副	査	筑波大学講師	博士（農学）	蕨 栄治
副	査	筑波大学講師	博士（医学）	山本 哲哉

論文の内容の要旨

（目的）

活性酸素はがんの増殖、浸潤、転移に関与する因子であることが知られているが、ミトコンドリア由来活性酸素（MDROS）とがんの浸潤の関係は不明瞭である。本研究では、胃がん細胞の浸潤に MDROS が関与するかを検討し、さらに食塩やエタノールによりがん浸潤が促進される可能性を検討した。

（対象と方法）

食塩およびエタノールが活性酸素誘発物質になるかラット由来胃粘膜細胞(RGM)にて検討した。また、誘発される活性酸素の発生源としてミトコンドリアが関与するか検討した。このために活性酸素を直接測定する電子スピン共鳴法(EPR)、活性酸素検出試薬 APF、脂質過酸化の検出試薬 DPPP 蛍光強度を測定した。ミトコンドリアの膜電位測定には JC-1、ミトコンドリアの染色には Mito Red を用いた。

MDROS ががん浸潤に関与するかは正常細胞として RGM、RGM を母株とするがん様変異細胞 RGK を用いた。また、MDROS を特異的に消去することが知られている MnSOD を恒常発現する RGK 細胞(RGK-MnSOD)を用いて In vitro で検討を行った。それぞれの細胞を用いた EPR の測定に加え、細胞の基本的な動きである細胞膜のラフリング頻度、水平方向の移動を示唆する Wound

healing assay、浸潤能の評価として人工細胞間基質(マトリゲル)中への浸潤距離の測定を行った。

(結果)

通常の細胞培養条件の約 2 倍となる 300 mM の NaCl を細胞に曝露すると、曝露 30 分後 EPR シグナルの増強に加え、APF および DPPP の蛍光強度が増加していた。また、MnSOD によりその活性酸素誘導は抑制された。エタノールを 1%、5%含有させた培地に細胞を 30 分曝露すると、NaCl 曝露の結果と同様に EPR シグナルの増強、APF および DPPP の蛍光強度の増加が見られた。このとき、APF と MitoRed による蛍光染色画像を撮像すると、APF 由来の蛍光と MitoRed 由来の蛍光が共局在していた。JC-1 により細胞を蛍光染色した結果、ミトコンドリアに傷害が生じたときに見られる緑色蛍光の増加(ミトコンドリア膜電位低下)が見られた。これらのことから NaCl およびエタノールは、ミ MDROS を誘発する物質であることが示唆された。

一方、RGM および RGK 由来の活性酸素を EPR により測定した結果、EPR シグナルピークの高い順に RGK、RGK-MnSOD、RGM であった。また、ラフリング頻度、Wound healing assay、浸潤能の結果は、EPR シグナルピークの測定結果と同じ順であった。

(考察)

本研究の結果から NaCl による活性酸素誘導はミトコンドリア由来であることが示唆された。エタノールを曝露した細胞は、JC-1 の染色結果からミトコンドリア傷害が生じており、APF と MitoRed の共局在がみられたことから、エタノールによる活性酸素の産生誘導はミトコンドリア由来であると考えられる。一方、MnSOD により MDROS を消去することでがん細胞の浸潤が抑制されており、がんの悪性化にミトコンドリア由来の活性酸素が関与していると示唆された。RGM に比べて RGK の方が活性酸素をより多く産生していること、その差は MnSOD の恒常発現により低減することから、RGK では MDROS が増加していると示唆された。以上の事から、食塩やエタノールは胃がんや肝臓がんの発癌リスクとして MDROS を誘導する環境因子として働き、がんに対して同様の活性酸素誘導によりがんの悪性化を促進する可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では活性酸素産生を誘導する因子として食塩、エタノールを用いてラット由来胃粘膜細胞 (RGM) およびそこから誘導されたがん細胞 (RGK)、さらには活性酸素消去能を有する RGK-MnSOD) を用いてがん細胞における活性酸素の誘導、およびがん細胞の浸潤に関するメカニズムを明らかにした独創性の高い基礎研究であり、博士論文にふさわしい内容と判断される。

平成 26 年 1 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と

審査様式 2 - 1

判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。