

氏名(本籍地) 須藤周作(茨城県)
 学位記および番号 博士(歯学), 第372号
 学位授与の日付 令和2年3月10日
 学位論文題名 「Adaptation to Chronic Acidic Extracellular pH Elicits a Sustained Increase in Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis」
 論文審査委員 (主査) 伊東博司教授
 (副査) 高田 訓教授
 加藤靖正教授

論文の内容および審査の要旨

【目的】がん細胞の微小環境として短期間の細胞外酸性pHは、MMP9分泌促進を伴う上皮間葉系移行を促進することが知られているが、長期間での細胞外酸性pHの影響については不明な点が多い。そこで申請者は、マウスLewis肺癌細胞(LLC細胞)を用いて、酸性耐性株(LLCm1A)を樹立し、長期間酸性条件に曝露されたがん細胞の表現型を調べることを目的とし研究を進めた。

【材料と方法】緩衝剤として15mM HEPESと4mMリン酸, 1g/L重炭酸を添加したDMEM/F12培地を基礎培地とし, NaOHもしくはHClで目的のpHに調整し, 実験に供した。Lewis肺癌細胞株をマウス尾静脈に注射し, 形成された肺転移巣より培養系に戻された細胞(LLCm1細胞)を親株として用い, この細胞を, 段階的にpHを低下させながら継代を約40回繰り返すことで, pH6.2において安定して増殖が得られた細胞を樹立し, これをLLCm1A細胞と名付け以下の実験を行なった。*In vivo*での転移能は, マウス尾静脈に細胞を注入後, 肺に形成されたコロニー数を計測する実験的肺転移モデルにより評価した。mRNAの発現量はreverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)にて定量した。分泌されたmatrix metalloproteinase (MMP)-2およびMMP-9の活性をゼラチンゼイモグラフィにより評価した。細胞運動能はwound healing assayにて, 浸潤能はマトリゲルを用いるBoyden chamber assayにて定量した。

【結果】①親株であるLLCm1細胞ではほとんど増殖できないpH6.2の環境において, 旺盛に増殖できるLLCm1A細胞を樹立した。LLCm1細胞

が敷石状の細胞形態を示したのに対し, LLCm1A細胞は線維芽細胞様の形態を示していた。②*in vivo*実験的肺転移モデルにおいて, LLCm1A細胞はLLCm1細胞より約2倍多く肺へ転移した。③転移促進因子である*Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp9*, *Mmp13*の発現がLLCm1細胞よりもLLCm1A細胞で有意に高く, LLCm1A細胞からのMMP2とMMP9の分泌も高いことが確認された。④LLCm1A細胞では, 線維芽細胞様の形態を示したにも関わらず, 上皮系細胞マーカーである*Krt5*発現の上昇と, 間葉系細胞マーカーである*Acta2*発現の低下がみられ, 遺伝子発現パターンとしては間葉系上皮移行(MET)様の変化が観察された。⑤wound healing assayでの細胞運動能とマトリゲル浸潤能は共にLLCm1細胞よりLLCm1A細胞の方が高い活性を示した。⑥LLCm1A細胞をpH7.4の条件で長く継代(28代)しても, 線維芽細胞様の形態は維持され, 浸潤能に低下傾向が認められたものの, 依然としてLLCm1細胞より有意に高い浸潤能を保持していた。

【結論】LLC細胞において, 酸性pHへの馴化は高い浸潤・転移能の獲得を誘導し, 中性条件下で継代を繰り返しても高い浸潤能は維持されていた。このことは, 原発巣における酸性微小環境が転移性獲得に重要であり, MET様の遺伝子発現パターン獲得は転移巣形成に寄与するものと示唆された。

本論文に関しての審査委員会は令和元年12月18日に開催された。まず論文申請者から論文内容に関する説明がなされ, 論文内容に関する質疑応答があった。主な質問事項としては, 本研究に至った経緯, 背景(一過性と長期間での酸性条件への曝露の違い)や, 実験条件と結果の解釈であった。何れも明確な回答が得られた。特に, 本論文での核心部分であるpH6.2に馴化した細胞をpH7.4で親株と比較している点についての質問については, 確認実験結果を提示しつつ適切な回答がなされた。

本審査会は, 本申請論文ががん細胞周囲の酸性環境長期曝露による転移性獲得という新たな概念を証明した重要な研究であり, 歯科医学の発展に大きく寄与できるものと認め, 申請者に博士(歯学)の学位を授与するのに値すると判定した。

掲載雑誌

Clinical & Experimental Metastasis 37:133-144 2020.