

帰国後 2 週間以内に提出してください (厳守) A4 用紙 4 枚以内 下記項目は変更しないでください。

(海外・国内) インターンシップ報告書

2019 年 11 月 20 日提出

氏名	房 知輝
所属	放射線学教室
学年	博士課程 4 年
活動先名	機関名、国名 イギリス グラスゴー大学 Wolfson Wohl Cancer Research Centre, Institute of Cancer Sciences
期間 ① (出発日―帰礼日) ② (インターンシップ 実施開始日―終了日)	① 2019 年 10 月 20 日-11 月 10 日 ② 2019 年 10 月 21 日-11 月 8 日

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

私は放射線生物学を志しており、現在はミトコンドリアの形態・機能変化を中心とした放射線応答を解析している。活動先として選択した Oliver 先生の研究室ではガン代謝に着目しており、メタボロミクス解析を通じてガン細胞のアミノ酸代謝の依存性について著名な研究成果を報告している。そこで、放射線増感のための新たな切り口としてガン代謝分野を自身の研究に取り入れることができるよう、ガン細胞の代謝変化について理解を深めるとともに、今後の研究活動に活かすことができるよう LC/MS 解析についての解析法を身につけることを 1 つの目的として定めた。また、海外の研究機関でグループリダーとして国際的に活躍する Oliver 先生ならびに研究機関に所属している研究者との交流を通じて、自身の研究者としてのキャリアビジョンを明確にすることを本インターンシップの目的とした

・活動内容・成果 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

本インターンシップでは、グラスゴー大学にある Wolfson Wohl Cancer Research Centre に訪問した (右写真)。

実験では、すい臓がん細胞株である CFPAC 細胞および HPAF-2 細胞を使用し、放射線照射前後の代謝変化を LC/MS 解析を用いて評価した。ヌクレオチド、アミノ酸、解糖系基質ならびに TCA 回路の中間代謝物などの代謝産物を評価するため、

p-HILIC カラムを用いた順相液体クロマトグラフィーによる分離を行った。分離後、EQI によってマススペクトルを得た。得られたデータは、MZmine というデータ解析ソフトウェアを用いて解析した。当研究室には、アミノ酸、解糖系をはじめとした多くの代謝産物についてのリテンションタイム(RT)と m/z についてのデータベースが標準サンプルを用いて測定されており、これを用いてサンプルから得られた代謝産物の



↑ Cancer Research Centre 外観

特定を試みた。また、得られたデータから主成分分析(PCA)、部分最小 2 乗判別分析(PLS-DA)ならびに Volcano plot の作製を行った。

インターンシップ期間 1 週目は、CFPAC 細胞を用いて 10 Gy の X 線照射 24 h 後のサンプルを回収した。2 週目には HPAF-2 細胞を用いて 10 Gy の X 線照射 24 h および 48 h 後のサンプルを回収し、これらの代謝産物を LC/MS により解析した。まず、照射サンプルと非照射サンプル間での細胞内の代謝産物を包括的に評価するため、PCA を行ったところ、PCA によって非照射サンプルと照射サンプルを良好に二分することができた。さらに、OPLS-DA ならびに Volcano plot を用いることで、両者の違いをよく反映している代謝産物を特定することを試みた。これらの解析により、変化を反映するいくつか代謝産物の m/z および RT を明らかにすることができた。しかしながら、その多くは研究室のデータベースでは残念ながら特定できなかった。そこで、オンラインで利用できる Human Metabolome Database を活用し、m/z の値からいくつかの代謝産物の候補を挙げた。これらの代謝産物を実際に特定するには、その標準サンプルを入手して実際に測定してみるか、LC/MSMS による詳細な解析が必要となるため、今回は実施できなかった。

次に、実際に得られたマスペクトルから代謝産物を特定し、照射前後における変化を比較した。CFPAC 細胞、HPAF-2 細胞のいずれの放射線照射群においても、解糖系、TCA 回路の代謝中間生成物ならびに多くのアミノ酸が細胞内で増加していることが明らかとなった。その中でも、ペントースリン酸回路やメチオニン・葉酸回路の基質も同様に増加していたことは興味深い結果であった。同時に、ADP、ATP、NADH、NADPH ならびにグルタチオンと GSSG も増加することも明らかとなった。これらの結果から、解糖系や TCA 経路が亢進することで ATP 量が増加するとともに、ペントースリン酸回路などを介して NADPH ならびにグルタチオンが生成されることで、放射線による酸化ストレスに対して適応しているのではないかと推察された。しかし、多くのアミノ酸や CTP といったヌクレオチドが増加している理由については、現時点では明確な回答が得られなかった。この現象は、細胞内での需要と供給のバランスがともに高まった結果なのか、放射線照射によって増殖遅延が生じた結果として需要が減少し蓄積した結果なのかは定かでないためである。今後の課題として、これらの代謝産物の流れを詳細に理解するには、 ^{13}C などでラベルした同位体を用いた経時的な解析などが必要と考えられる。

また、2 週目の 10/28 (月)には Beatson Cancer Research Centre に所属する大学院生の研究発表会に参加した。この研究発表会はランチタイムに行われ、センターに所属する研究員が昼食をとりながら参加するというスタイルで開催されていた。しかし、ラフなスタイルの形式とは打って変わり、中身は非常にタフなもので発表中にも聴衆からは複数の質疑・コメントが飛び交い、白熱した議論が繰り広げられていた。日本で

は自分に自信がなかったり、周囲の研究者に遠慮して意見をする場面が非常に少ないが、実際に海外のエネルギーなやり取りを目の当たりにすると、自分の意見を主張することの重要性にも気づくことができた。

最終週には、得られた結果を報告し、Oliver 先生とディスカスした。今回は、放射線がどのような代謝経路を活性化させるかの評価に留まったが、今後は特定のアミノ酸の代謝推移の標識化合物を用いた評価や、そのアミノ酸欠乏時の放射線感受性の評価などを出来れば面白いと思われる。これまでに Oliver 先生が注目してきたセリン・グリシン代謝はメチオニン回路・葉酸回路を通じてヌクレオチド合成、NADPH 産生ならびにワンカーボン代謝に非常な重要役割を担っており、これらアミノ酸の欠如は ROS 蓄積による細胞障害に繋がる知見がある。そのため、酸化ストレスの一種である放射線にも興味を持っていたようで、ガン代謝の放射線応答についてグラントを獲得し次第研究を進めていきたいという話であった。これもあって、放射線生物学を志していた私のインターンシップ申請を今回は受理してくださったようで、非常に恵まれたタイミングでのインターンシップであった。今回のインターンシップは、研究面での知識だけでなく、海外研究者とのコネクションなど多くのものを収穫することができ、充実したものとなった。



↑ Oliver 先生達との記念写真

・今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

Oliver 先生やセンターに所属するポスドクの研究者たちと、自身の研究課題について様々な観点からの質問をいただいたり、ガン代謝研究について活発に議論しができたことは、自身の研究を深めるきっかけになったとともに、今後海外での研究生活を送る上での自信につながった。また、Oliver 先生にポスドクの受け入れ状況を打診したところ、スカラーシップを獲得してもらえたら研究費はこちらで保証するというお話を頂いた。タイミング的にも来年度からすぐに留学することはできないが、10年後のキャリアパスとして、大学における研究や教育に従事することを希望している自身にとって、今後の共同研究やポスドク先として非常に有意義な人脈形成を行うことができたと感じている。

・後輩へのアドバイス

私は、所属する研究室と既にコネクションのある研究室に訪問したのではなく、自身のメールをきっかけにして海外でのインターンシップを実現した。自身の興味のある研究をしている研究者を探し、コンタクトを取り、インターンシップを受け入れてもらうのは時間がかかる非常なタフな作業となるが、自身の興味のある分野の海外研究者とのコネクションを直接形成できるという点はそれらの労力を凌駕する価値があ

と思われる。私がインターンシップまでに要した期間は7-9ヶ月程度で、博士課程4年目の秋という非常にギリギリのタイミングとなった。修了後の進路にインターンシップ先を考える場合には、もう1年早く行動する必要があると思われる。また、私は英語が苦手が必要に差し迫られるまで後回しにしていたため、思ったように会話ができなかった。英語によるコミュニケーションが苦手な人は早い段階から会話の練習を日頃からすべきである。インターンシップ制度は博士課程研究の進捗状況に左右されるものの、研究者としてのキャリアプランの幅を広める有用な手段だと思うので、是非活用してもらいたい。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 放射線学教室 教授 稲波 修
---------	-----------------------------------

※1 電子媒体を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。

※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。

※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp