

氏名・(本籍)	和田優貴(秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第978号
学位授与の日付	平成30年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Impact of Oxygen Status on ¹⁰B-BPA Uptake into Human Glioblastoma Cells, referring to Significance in Boron Neutron Capture Therapy (酸素状態がヒト膠芽腫細胞の ¹⁰ B-BPA摂取能に与える影響と Boron Neutron Capture Therapy における重要性)
論文審査委員	(主査) 教授 大森 泰文 (副査) 教授 清水 宏明 教授 柴田 浩行

学位論文内容要旨

研究成績

Impact of Oxygen Status on ^{10}B -BPA Uptake into Human Glioblastoma Cells,
referring to Significance in Boron Neutron Capture Therapy

酸素状態がヒト膠芽腫細胞の ^{10}B -BPA 摂取能に与える影響と
Boron Neutron Capture Therapy における重要性

申請者氏名 和田 優貴

研究目的

Boron Neutron Capture Therapy (以下、BNCT) は、腫瘍細胞に準選択的にホウ素薬剤を取
込ませ、照射した熱・熱外中性子とのホウ素中性子捕捉反応により生じる α 線および Li 反跳
核を用いて腫瘍細胞を死滅させる、腫瘍細胞選択的粒子線治療である。臨床使用可能なホウ
素薬剤のうち、 ^{10}B -Boronophenylalanine (以下、 ^{10}B -BPA) は腫瘍細胞に過剰発現する L-type
amino acid transporter 1 (以下、LAT1) によって腫瘍細胞内に準能動的に摂取される。

膠芽腫に対する BNCT 治療はすでに実施されているが、まだ満足のいく結果は得られていな
い。膠芽腫では腫瘍内低酸素環境によって腫瘍細胞が治療抵抗性を獲得していることが報告
されており、BNCT でも同様に低酸素環境による治療抵抗性を生じている可能性がある。そこ
で本研究ではヒト膠芽腫細胞を用いて、低酸素環境が ^{10}B -BPA 摂取能と LAT1 発現に与える影
響を検討した。

研究方法

2 種類のヒト膠芽腫細胞 (T98G、A172) を異なる酸素環境下 (O_2 21%、10%、3%、1%) で 72
時間培養した後、細胞内の ^{10}B 摂取量、および、LAT1 の mRNA 発現量を測定した。 ^{10}B 摂取量
の測定では、各酸素環境で培養した細胞を回収・懸濁し、濃度を段階的に調整した ^{10}B -BPA
含有培地 (0 ppm、10 ppm、20 ppm、30 ppm) に 2 時間曝露後、過塩素酸/過酸化水素混合溶
液で灰化处理し、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES 法) を用いて測定した。
同様の条件で細胞を培養後に回収し、Total RNA を抽出後、qRT-PCR 法を用いて LAT1/2 mRNA
発現量を測定した。

本実験に先立ち、低酸素環境および ^{10}B -BPA 含有培地でも生細胞が得られることを確認し
た。ICP-AES 法を用いた ^{10}B 摂取量測定では、全ての酸素条件下で培地中の ^{10}B -BPA 濃度上昇
に伴い腫瘍細胞内ホウ素量は増加したが、酸素濃度低下に伴い腫瘍細胞内ホウ素摂取量は有
意に漸減する傾向にあり、酸素濃度低下による ^{10}B -BPA 摂取量減少が連続的なものであるこ
とが示唆された。この要因として、酸素濃度低下が LAT1/2 発現量を低下させている可能性、
もしくは、LAT1/2 を不活化させている可能性が考えられた。そこで低酸素環境の LAT1/2 発
現量への影響を qRT-PCR を用いて検討したところ、いずれのヒト膠芽腫細胞でも低酸素環境
で LAT1 の mRNA 発現は有意に低下する一方で、LAT2 の mRNA 発現量はいずれの酸素条件でも
検出限界以下であった。酸素濃度低下による ^{10}B -BPA 摂取量低下の一因として、低酸素環境
による LAT1 の mRNA 量低下の影響があることが支持された。

結論

酸素濃度の低下によりヒト膠芽腫細胞の ^{10}B -BPA 摂取量は連続的に低下し、その一因に
LAT1 発現量低下があることが示された。この結果は、BNCT 治療前に高圧酸素療法などで腫瘍
内低酸素環境を改善させることで腫瘍細胞内ホウ素摂取量の向上が期待できることを示唆す
る。

BNCT 治療の成否は腫瘍細胞のホウ素摂取能に大きく依存しており、腫瘍内低酸素環境の克
服が今後の BNCT 治療成績の向上の要点となりうる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森泰文

申請者： 和田優貴

論文題名： Impact of oxygen status on ^{10}B -BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy
(和訳) 酸素状態がヒト膠芽腫細胞の ^{10}B -BPA 摂取能に与える影響と Boron Neutron Capture Therapy における重要性

要旨

Boron neutron capture therapy (BNCT)は、あらかじめ ^{10}B -boronophenylalanine (^{10}B -BPA)を腫瘍細胞特異的に取り込ませた腫瘍組織を標的に中性子線を照射し、 ^{10}B の崩壊により生じる α 線とリチウム線を腫瘍細胞内から発生させることにより、その細胞自身およびそれに近接する腫瘍細胞を根絶させる治療法である。膠芽腫に対するBNCTの治験はすでに実施されているが、 ^{10}B -BPAの腫瘍細胞への取り込み効率の低さが課題となっている。膠芽腫は低酸素環境に置かれていることから、著者は、腫瘍組織における酸素濃度が ^{10}B -BPAの取り込み効率に強い影響を与えているのではないかと考え、膠芽腫由来培養細胞を用いてこの仮説を検証し、低酸素下で ^{10}B -BPAの取り込みが著減することを見出した。また、 ^{10}B -BPAは細胞膜上のアミノ酸トランスポーターであるLAT1により細胞内に取り込まれることから、低酸素環境下におけるLAT1 mRNAの発現量を測定したところ、低酸素下でLAT1 mRNAの発現が減少しており、低酸素下での ^{10}B -BPA取り込み低下にLAT1の発現低下が関与していることが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

BNCTの原理は長く知られていたが、中性子線照射施設の少なさにより、近年になるまで臨床治験がなされていなかった。今回は治験から得られた ^{10}B -BPAの取り込み不足という喫緊の課題にアプローチしたもので、それ自体に斬新性がある。低酸素による ^{10}B -BPAの摂取能低下はある程度予想されていたものの、低酸素下におけるLAT1 mRNAの発現低下を見出したことにより、 ^{10}B -BPAの摂取能低下のメカニズムを提唱した点も新規の知見といえる。

2) 重要性

原理上その効果が期待されているBNCTの最大の課題が、 ^{10}B -BPAの腫瘍細胞への取り込み率の低さである。本研究は、低酸素環境がLAT1アミノ酸トランスポーターの発現を低下させ、その結果 ^{10}B -BPAの細胞内への取り込みが低下することを様々な実験を通して証明した。すなわち、腫瘍内酸素濃度を高めることにより、 ^{10}B -BPAの腫瘍細胞内への取り込みを改善できるであろうことを示唆しており、BNCTによるがん治療効果を高める方法を提唱し、臨床の現場に研究成果を還元することが期待される。

3) 研究方法の正確性

高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法により、細胞に取り込まれた ^{10}B -BPAを正確に測定している。flowcytometryによる細胞周期の解析や、定量的RT-PCR法によるLAT1 mRNA発現量の定量などもすでに確立された定法にしたがって行われている。いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景と目的、研究方法、実験結果の記載と図表の提示方法は明瞭で理解しやすい。また、考察も論理的に組み立てられているとともに、これからの課題と展望も丁寧に説明されており、高く評価できる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。