

氏名（本籍）	谷 俊明（千葉県）
学位の種類	博士（保健医療科学）
学位記番号	博甲第47号
学位授与年月日	令和5年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	保健医療科学研究科
学位論文題目	神経膠芽腫がん幹細胞を標的としたホウ素中性子捕捉療法（BNCT）開発に向けた基礎的研究

## 学位審査委員

主査	茨城県立医療大学教授	博士（理学）	阿部 慎司
副査	茨城県立医療大学教授	博士（医学）	馬場 健
副査	茨城県立医療大学准教授	博士（保健学）	鹿野 直人
審査員	筑波大学教授	博士（医学）	櫻井 英幸

## 論文の内容の要旨

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT ; Boron Neutron Capture Therapy）の効果はホウ素化合物（BPA ; Boronophenylalanine）の細胞内蓄積量に大きく依存する。BPA は細胞膜の L 型中性アミノ酸トランスポーター1（LAT1 ; L-type amino acid transporter 1）を介して細胞内に取り込まれるが、低酸素環境に存在するがん幹細胞においては LAT1 の発現量が低下することが報告され、がん幹細胞は再発や転移の主要因として考えられている。がん幹細胞において BPA の取り込み量を増やすことで、がん幹細胞に対する BNCT の殺細胞効果を高める必要がある。

本研究では神経膠芽腫の BNCT において、腫瘍内部の低酸素領域に存在するがん幹細胞選択的に LAT1 を過剰発現させ、BPA 取り込み量を増加させ、がん幹細胞選択的に LAT1 を過剰発現させる細胞を用いて作製したスフェロイドに対し熱中性子線を照射し、BPA の取り込み量による殺細胞効果を明らかにすることを目的としている。

神経膠芽腫細胞株のスフェロイド内で低酸素環境特有のタンパク発現状態を確認し、選択的にがん幹細胞の LAT1 を過剰に発現させた細胞でスフェロイドを作製した。そして、スフェロイドにおいて BPA 取り込み量を RI トレーサ法分析し、同様のスフェロイドを BPA で処理した後、中性子線照射による殺細胞効果を調べた。

その結果、スフェロイド内で低酸素環境の細胞に特有のタンパクを発現する箇所一致して CD133 陽性細胞（がん幹細胞）が存在し、かつ、LAT1 発現率は約 30%であり、

遺伝子導入により、スフェロイドにおいても LAT1 が安定的に過剰発現していることを示した。また、LAT1 と CD133 のシグナルは重複していることから、LAT1 はがん幹細胞で過剰に発現していると考えられ、RI トレーサ法において LAT1 を過剰に発現した細胞は、遺伝子導入していない細胞よりも BPA を約 1.5 倍多く取り込むことを明らかにした。さらに、40 ppm の BPA で処理した遺伝子導入細胞で作製したスフェロイドに中性子線照射すると、コントロールのスフェロイドに比べ 40 分照射で 60% の体積退縮が見られた。がん幹細胞選択的に BPA がより多く取り込まれたことで、スフェロイドの中性子線に対する感度が向上し、大きな退縮効果が得られたと考えられた。

以上の研究結果から、腫瘍形態を模擬したスフェロイドを用いて LAT1 を過剰に発現させて BPA の取り込み量を増加させたことによる BNCT の殺細胞効果が明らかにされている。特に、スフェロイドを用いることによる腫瘍形態の再現により、スフェロイド内部に低酸素領域が形成され、CD133 陽性細胞において LAT1 が発現していないことを示している。そして、選択的に CD133 陽性細胞で LAT1 を過剰に発現させることにより、BPA の取り込み量を増加させる手法として遺伝子導入を検討し、ポジティブフィードバックループ機能を有する LAT1 を過剰に発現する細胞の作製に成功している。これまで核医学検査で利用された LAT1 を BNCT に応用し、加えて、遺伝子組み替えを導入した独創的な基礎研究であり、BNCT 治療効果の向上に資するものである。

また、この細胞を用いてスフェロイドを作製し、40 ppm の BPA を投与後に原子炉からの熱中性子で 40 分間照射により約 60% の腫瘍体積を退縮させたことは、より効果的な BNCT が行えることを基礎的に明らかにしたものであり、価値の高い研究と言える。

## 審査の結果の要旨

令和5年1月31日、主査ならびに副査2名、外部審査員1名の計4名の審査委員全員出席のもと、提出された論文に対し公開で研究発表と質疑応答を行い審査した。審査は本研究科の指針に従い、創造性・新規性、論理性、信頼性・妥当性、専門領域の関連性、論文の表現力、倫理的配慮の観点から協議された。以下にその内容を示す。

専門領域の関連性とインパクトについては、遺伝子導入をしたがん幹細胞をターゲットにした放射線治療は、これまでのところ臨床では実現していない。そのため本研究の成果は、今後の基礎研究の指針を当該専門領域に与えるものと考えられる。

論理性については、研究のデザイン、研究手法などは適切に設定され、論理的に研究が進められている。スフェロイドを用いることによる腫瘍形態の再現により、スフェロイド内部に低酸素領域が形成され、CD133陽性細胞においてLAT1が発現していないことを示した。そこで、選択的にCD133陽性細胞でLAT1を過剰に発現させることにより、BPAの取り込み量を増加させる手法として遺伝子導入を検討し、ポジティブフィードバックループ機能を有するLAT1を過剰に発現する細胞を作製した。また、この細胞を用いてスフェロイドを作製し、40 ppmのBPAを投与後に原子炉からの熱中性子で40分間照射により約60%の腫瘍体積を退縮させることを可能としており、より効果的なBNCTが行えることを明らかにしており、論理展開として適切である。

信頼性・妥当性については、本研究は、近年の生物学における研究分野で取り入れられている分子生物学的方法、放射線生物学的方法を用いており、信頼性は十分に有る。また、これまでに、3報（うち1報は筆頭）の査読付き国際誌での報告がされている。

論文の表現力については、文章表現は適切で、得られた結果の制限等を含め概ね説明できている。

倫理的配慮については、細胞レベルの研究であり倫理的問題は無いと判断した。以上より、本論文はより効果的なBNCTが行えることを基礎的に明らかにしたものであり価値の高い研究と考えられた。今後の発展性も期待できる研究であると評価され、審査員全員の合意のもとに、博士論文として十分な内容であり、合格に相当すると判断した。