

氏名	弘田祐己
(ふりがな)	(ひろた ゆうき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成26年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation (線エネルギー付与の高い(High LET)放射線を用いた脳腫瘍幹細胞様細胞に対する放射線抵抗性の克服)
論文審査委員	(主) 教授 鳴海善文 教授 廣瀬善信 教授 東 治 人

学位論文内容の要旨

《緒言》

神経膠芽腫は、開頭術後に化学放射線療法を行う標準治療が確立されているものの、その生存期間中央値は約1年と極めて予後不良な疾患である。様々な報告がある中で、最近では脳腫瘍幹細胞の存在が示唆されており、この細胞のもつ放射線抵抗性の克服が昨今の大きな課題と言われている。一方、我々はこれまで神経膠芽腫に対して硼素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を施行し、優れた成績を残してきた。BNCTは、硼素化合物を腫瘍細胞に選択的に取り込ませて中性子を照射することで腫瘍細胞のみを破壊する細胞標的粒子線治療であり、High Linear-Energy-Transfer (LET)放射線に分類される。過去の報告の、脳腫瘍幹細胞の放射線抵抗性は主にX線やγ線といったLow LET

放射線での評価であったが、これまでの BNCT による治療成績から、High LET 放射線であれば脳腫瘍幹細胞の治療抵抗性を克服できるのではないかという仮説が立てられる。そこで今回我々は、ヒト脳腫瘍細胞株から樹立した脳腫瘍幹細胞様細胞 (Glioma stem-like cells : GSLCs) を用いて Low LET 及び High LET 放射線照射を施行し、その感受性について評価を行った。

《方 法》

ヒト脳腫瘍細胞株である A172 を幹細胞培地 (無血清培地) で培養し、GSLCs を作成した。この幹細胞性に関しては Western blot 及び Fluorescence-activated cell sorting analysis (FACS) を施行し、幹細胞マーカーを同定することで確認した。これらの細胞と、通常血清入り培地で育てた同種の細胞 (Control cells : CCs) に対し、Low LET 放射線として γ 線を、また細胞照射により High LET 放射線であるプロトン粒子を発生させる中性子線を使用し、それぞれの放射線照射後の生存率を colony forming assay (CFA) で評価した。CFA により得られた生存率曲線を使用し、それぞれの放射線照射により生存率を照射前の 10% に減少させるのに必要な線量 (D_{10} 値) を計算した。そして放射線抵抗性の評価のために、それぞれの放射線照射後の Resistance ratio (GSLCs の D_{10} 値 / CCs の D_{10} 値) を計算し、比較した。また各放射線照射後の DNA 修復能の評価を行うために、 γ -H2AX assay を用いてそれぞれの放射線照射後に誘発される DNA 二重鎖切断 (Double strand breaks : DSBs) の比較を行った。

《結 果》

GSLCs を得るために、A172 を無血清培地で 1 週間培養すると、神経幹細胞に似た spheroid の形態へ変化した。western blot にて神経幹細胞マーカーである Sox2 と Musashi の発現を検討したところ、CCs と比較し無血清培地で得られた培養細胞ではそれらの発現が高まっていた。しかしながら CD133 発現には両細胞間で差異が見られなかったため、培養日数を延長して CD133 陽性細胞の推移を FACS で観察すると、その割合が

無血清培地で得られた培養細胞で日毎に増加する傾向が確認された。得られた GSLCs と CCs に対して γ 線照射を行うと、GSLCs の方が CCs よりも有意に生存率が高かったが、中性子線においてはその生存曲線において GSLCs と CCs に差がほとんど認められなかった。A172 の Resistant ratio を計算すると、 γ 線照射後は 1.318 であったが、中性子線照射後では 0.936 と減少していた。それぞれの放射線照射後 24 時間において γ -H2AX assay を行うと、 γ 線では GSLCs の γ -H2AX foci 数は CCs に比して有意に少なかったが、中性子線照射ではそれら細胞間で有意差は認められなかった。それぞれの放射線照射による γ -H2AX foci の違いに関しては、GSLCs 及び CCs 共に中性子線照射後の foci の方がサイズが大きく、輝度も高い傾向にあった。

《 考 察 》

神経膠芽腫の治療には、脳腫瘍幹細胞の放射線抵抗性を克服することが肝要である。今回我々は、ヒト脳腫瘍細胞株を無血清培地で培養することで樹立した、幹細胞性を有する GSLCs を用いて照射実験を行った。GSLCs は CCs に比べて Low LET 放射線に対して抵抗性であることが示され、そのメカニズムとしては GSLCs の方が CCs より高い修復能を持つ可能性が示唆された。一方で、High LET 放射線照射を行うと両細胞における放射線感受性の差が無くなり、修復不能な DNA DSBs が Low LET 放射線よりもより多く引き起こされる傾向にあった。すなわち、放射線抵抗性を有する脳腫瘍幹細胞に対しても、High LET 放射線であれば治療効果が期待できる可能性を示したものと考えられる。特に High LET 粒子線治療である重粒子線療法や BNCT は、今後の神経膠芽腫の治療戦略において、重要な役割を担う可能性を秘めていると思われる。

論文審査結果の要旨

神経膠芽腫が従来の治療方法に対し予後の改善が乏しいのは、この中に存在する脳腫瘍幹細胞の持つ、 γ 線や X 線といった low linear-energy-transfer (LET) 放射線に対する抵抗性が原因であるとの報告が多く存在する。一方 High LET 放射線である Boron neutron capture therapy (BNCT) は、これまでの標準治療と比べ神経膠芽腫に対し優れた治療成績を残してきている。この事実より、申請者らは High LET 放射線であれば脳腫瘍幹細胞の治療抵抗性を克服できるのではないかと仮説を立て、脳腫瘍幹細胞様細胞 (Glioma stem-like cells : GSLCs) を使用し、Low LET 放射線として γ 線を、High LET 放射線として中性子線を用いて照射を行い、照射後生存率を評価した。

まず、ヒト脳腫瘍細胞株を無血清培地で培養したところ、spheroid の形態を持ち、幹細胞性を有すると解釈される Sox2 や Musashi の発現亢進を伴う GSLCs が得られた。照射実験を行ったところ、GSLCs と Control cells には γ 線照射に対する感受性の違いが見られたが、中性子線照射ではそれが見られなかった。これは γ -H2AX assay の結果から、Low LET 放射線に対しては高い修復能を有する GSLCs でも、High LET 放射線照射により修復不能な DNA DSBs が引き起こされたためと考えている。以上の結果より、放射線抵抗性を有する脳腫瘍幹細胞さらには神経膠芽腫に対しても、High LET 放射線であれば治療効果を期待できることが示された。今後の神経膠芽腫の治療戦略において、High LET 粒子線治療である重粒子線療法や BNCT は重要な役割を担う可能性を示したこととなり、本研究は極めて重要な意味を有するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Radiation Research 55(1): 75-83, 2014