

氏 名	原 和泉
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7444号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Assessment of Boron Neutron Capture Therapy on Three Dimensional Model of Patient-Derived Cancer-Associated Fibroblasts and Oral Cancer (患者由来癌関連線維芽細胞を用いた三次元モデルに対するホウ素中性子捕捉療法の評価)
論文審査委員	飯田 征二 教授 江口 傑徳 准教授 河津 俊幸 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔癌は全癌の約 2.5%を占める悪性腫瘍であり、その大部分は口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma:OSCC)に分類される。OSCC は放射線療法および化学療法に対して一定の感受性を示すことから、外科的切除や放射線治療、化学療法を組み合わせた治療が広く行われている。特に放射線治療は、早期から進行期までの各病期において、根治的治療または補助療法として重要な役割を担っている。しかし、従来より行われてきたX線治療では、正常口腔組織に粘膜炎や味覚障害などの有害事象を生じることが多く、腫瘍制御を目的とした線量増加や生活の質 (quality of life : QOL) の維持が困難となる場合がある。一方、ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy : BNCT) は、腫瘍に選択的に集積したホウ素 10B と中性子との核反応により、高線エネルギー付与 (high linear energy transfer : high-LET) の α 線および⁷Li 反跳核を発生させ、腫瘍細胞を選択的に破壊する新規放射線治療法である。BNCT は正常組織傷害が少なく、進行癌に対しても有効性が期待されており、日本では切除不能な局所進行または局所再発頭頸部癌に対する臨床応用が進められている。

近年、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment : TME)、特に癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) が、癌の浸潤・進展や放射線抵抗性に深く関与することが明らかとなってきたが、CAFs が豊富な TME に対する BNCT の影響については未だ不明な点が多い。また、従来の二次元培養系や動物モデルでは、ヒト TME を十分に再現することが困難であり、より生理的条件を反映した新たな評価モデルの確立が求められている。本研究では、患者由来 CAFs を I 型コラーゲンゲル内に三次元的に配置した間質層の上に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を重層化させて三次元 (3D) 口腔癌モデルを構築し、この 3D 口腔癌モデルを用いて X 線照射および BNCT が癌細胞および CAFs に及ぼす影響を比較検討した。

【材料・方法】

3D 口腔癌モデルの作製には、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-4、患者由来正常線維芽細胞 (normal oral fibroblasts : NOFs) および患者由来 CAFs を用いた。NOFs または CAFs を封入した I 型コラーゲンゲル上に HSC-4 を播種し気相培養することで癌細胞を重層化させ、3D cancer NOFs モデルおよび 3D cancer CAFs モデルを構築した。

気相培養開始後の組織像の変化を確認するために、気相培養開始当日および開始 2、4、7 日後にサンプルを固定した。パラフィン包埋後に切片を作製し、Masson-Trichrome 染色を行った。腫瘍面積比、癌細胞浸潤、癌細胞数および線維芽細胞数を評価し、放射線照射のタイミングを決定した。両モデルに対して 0、5、10、20 Gy の X 線照射を気相培養開始 2 日後に実施し、照射 5 日後（気相培養開始 7 日後）に固定したサンプルについて同様の評価を行った。さらに、各モデル中のホウ素濃度を誘導結合プラズマ質量分析法（inductively coupled plasma mass spectrometry : ICP-MS）により測定し、X 線換算で 10 Gy および 20 Gy 相当となる条件で BNCT を施行した。BNCT 後 5 日目に固定したサンプルについて、X 線照射群と同様の解析を行った。

【結果】

気相培養開始後、両モデルにおいて腫瘍面積比、癌細胞浸潤および癌細胞数は時間依存的に増大した。X 線照射後、3D cancer NOFs モデルでは腫瘍面積比、癌細胞浸潤および癌細胞数が線量依存的に低下した一方、3D cancer CAFs モデルでは、癌細胞増殖抑制および浸潤抑制効果は限定的であった。BNCT 後では、両モデルにおいて腫瘍面積比の有意な減少および癌細胞層の菲薄化を認め、特に 3D cancer CAFs モデルでは、20 Gy 相当の BNCT により癌浸潤、癌細胞数および CAFs 細胞数のすべてが有意に低下した。一方、NOFs 細胞数は BNCT 後も維持されており、BNCT による正常組織保護効果が本モデルにおいても再現された。

【考察と結論】

本研究では、CAFs が存在する 3D モデルにおいて X 線照射後の腫瘍抑制効果が低下し、CAFs が放射線抵抗性に寄与することが示唆された。これは、CAFs がサイトカイン分泌や細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）リモデリングを介して腫瘍細胞生存を支援し、治療抵抗性や予後不良と関連するという既報の臨床知見と一致する。一方、BNCT 後では CAFs 存在下においても腫瘍抑制効果が維持され、さらに CAFs 自体も減少を認めた。高 LET 線質である BNCT は、低酸素領域でも治療効果が低下しにくい直接的 DNA 損傷を誘導するため、CAF 関連の抵抗性を克服する可能性が示された。また、本研究で用いた 3D モデルは、CAF 依存的浸潤および ECM 構造を反映した放射線応答の評価に有用であり、従来の 2D 培養や動物モデルを補完し得る前臨床プラットフォームとして、co-clinical trial に基づく個別化放射線治療戦略の検討にも応用可能と考えられる。

論文審査結果の要旨

【緒言】ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は腫瘍細胞のみを選択的に破壊する治療法として期待されているが、癌関連線維芽細胞(CAFs)をはじめとした腫瘍微小環境(TME)に対する影響は明らかとなっていない。本研究では、患者由来CAFsをI型コラーゲン中に包埋した癌間質層と口腔扁平上皮癌細胞層の二層構造から成る三次元(3D)口腔癌モデルを用いて、X線照射およびBNCTの影響を評価することを目的とした。

【材料・方法】3D口腔癌モデルの作製には、口腔扁平上皮癌細胞株HSC-4および患者由来正常線維芽細胞(NOFs)、患者由来CAFsを用いた。NOFsまたはCAFsを封入したI型コラーゲングル上にHSC-4を播種し、重層化した癌細胞層を形成した3D口腔癌モデル(3D cancer NOFsモデル、3D cancer CAFsモデル)を構築した。気相培養開始当日、2日後、4日後、7日後に固定したサンプルを用いて腫瘍面積比、癌細胞浸潤、癌細胞数および線維芽細胞数を評価し、放射線照射のタイミングを決定した。両モデルに対して0、5、10、20GyのX線照射を実施し、照射5日後に固定したサンプルについて評価を行った。さらに、各モデル中のホウ素濃度を誘導結合プラズマ質量分析法により測定し、X線換算で10Gyおよび20Gy相当となるようBNCTを行い、照射5日後に固定したサンプルについて評価を行った。

【結果】気相培養開始後両モデルとも腫瘍面積の増加を認めたが、特に3D cancer CAFsモデルにおいて癌浸潤の増加を認めた。X線照射により、3D cancer NOFsモデルでは腫瘍面積比・癌浸潤・癌細胞生存率が線量依存的に低下したが、3D cancer CAFsモデルでは癌細胞増殖抑制と癌細胞浸潤抑制の効果は乏しかった。BNCT後では両モデルで腫瘍面積比の減少と癌細胞層の菲薄化を認めるとともに、3D cancer CAFsモデルではCAFs細胞数の有意な低下、3D cancer NOFsモデルではNOFs細胞数に変化がないことが確認された。

【考察】本研究では、癌の進展に関わるCAFsを間質に多く含むモデルと含まないモデルを作製し、放射線応答の違いについて検討を行った。X線照射の結果、CAFsを含むモデルではNOFsモデルに比べ腫瘍抑制効果が減弱し、CAFsが従来のX線放射線治療に対する腫瘍抵抗性に関与する可能性が示唆された。一方BNCT後では、CAFsを含む条件下においても癌細胞の有意な減少が認め、CAFsの減少も認めた。さらに、NOFsは比較的温存されており、臨床におけるBNCTの正常組織障害が軽微であるとの報告と整合する結果を3Dモデル上で再現した。

本研究は患者由来CAFsおよびNOFsを用いた3Dモデルを構築し、BNCTが与える影響について検討した点において新規性を有しており、TMEを意識した放射線治療の評価モデルになり得ることを示す重要な知見である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。