



Title	p53変異型ヒト口腔扁平上皮癌に対するホウ素中性子捕捉療法の抗腫瘍効果に関する研究
Author(s)	藤田, 祐生
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49221">https://hdl.handle.net/11094/49221</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	藤田祐生
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第21909号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	p53変異型ヒト口腔扁平上皮癌に対するホウ素中性子捕捉療法の抗腫瘍効果に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 豊澤 悟 准教授 和田孝一郎 講師 久保 和子

### 論文内容の要旨

#### 〈目的〉

ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy : BNCT) は、あらかじめホウ素化合物を取り込ませた腫瘍細胞に熱中性子線を照射することで粒子線を発生させ、腫瘍細胞を選択的に傷害することが可能な放射線治療である。これまでに脳腫瘍や皮膚悪性黒色腫、頭頸部癌において BNCT の有効性が報告されている。

エックス線やガンマ線による放射線照射などで DNA が損傷すると、癌抑制遺伝子である p53 の働きで細胞周期を停止し損傷した DNA の修復を図るが、修復できなかった場合にはアポトーシスが誘導される。一方、p53 に変異をきたしその機能を失った細胞では、細胞周期の停止やアポトーシスが阻害されることが知られている。p53 変異は口腔扁平上皮癌 (OSCC) で高頻度にみられ、放射線治療や化学療法に対する抵抗性の原因の一つとされている。p53 変異をもつ OSCC に対して BNCT を行った場合の効果に関する研究は極めて少ない。そこで、本研究では p53 が BNCT の効果に及ぼす影響を知る目的で、p53 遺伝子が野生型と変異型の OSCC 細胞を用いて BNCT の効果について検討した。

#### 〈材料と方法〉

1. OSCC 細胞として、p53 変異型を遺伝子導入した SAS/mp53 と p53 野生型の SAS/neo を用いた。ホウ素化合物として  $^{10}\text{B}$ -boronophenylalanine (BPA) を用いた。
2. 培養細胞に対する BNCT では、BPA 存在下に京都大学原子炉実験所の研究用原子炉を用いて熱中性子線の照射を行った。担癌動物に対する BNCT では、ヌードマウスの腫瘍径が 5 mm に達したのち BPA を腹腔内投与し、腫瘍に熱中性子線の照射を行った。
3. 細胞生存率の測定は、単一に分散させた細胞を 7 日間培養し、形成されるコロニー数を算出した。細胞増殖能は MTT assay にて測定した。
4. 細胞周期は細胞をヨウ化プロピディウム染色した後にフローサイトメトリー (FCM) にて解析した。
5. 細胞核の形態は、核染色をヘキスト 33342 で行い、蛍光顕微鏡にて観察した。
6. 細胞周期関連因子の発現とリン酸化はイムノブロットにて検出した。

### 〈結果〉

1. BNCT の細胞傷害性を明らかにするため、6 Gy の物理線量で培養細胞に BNCT を行った。コロニー形成法ならびに MTT assay にて検討した結果、SAS/mp53 と比較して SAS/neo でより抑制効果がみられた。
2. 培養細胞に BNCT を行った後、FCM にて解析したところ、SAS/neo では 6 時間後に G0/G1 期細胞、12 時間後に G2/M 期細胞の増加を認め、アポトーシス細胞を示す sub-G1 は 6 時間より出現した。SAS/mp53 では 12 時間後に G2/M 期細胞が増加し、sub-G1 は 48 時間後に出現した。
3. G1 期チェックポイント関連因子をイムノプロットで検出した結果、SAS/neo では 6 時間で p53 の増加とリン酸化の上昇を認め、p21 も上昇した。SAS/mp53 ではこのような変化を認めなかった。G2/M 期チェックポイント関連因子では SAS/neo、SAS/mp53 とともに G2/M 期停止を示す因子の増加がみられた。BNCT で核断片化を示すアポトーシス細胞は、SAS/mp53 よりも SAS/neo で早期から認められた。
4. 細胞を接種して形成させたヌードマウス腫瘍に対し、およそ 13 Gy の物理線量で BNCT を行い、腫瘍体積を経時に計測した。その結果いずれの腫瘍も消退したが、その後 SAS/mp53 で再増殖がみられた。BNCT 後の病理組織像では、いずれの場合も細胞の大小不同性が顕著で、空胞変性がみられた。SAS/mp53 では多数の多核巨細胞が出現した。
5. BNCT 後の腫瘍組織における G1 期チェックポイント関連因子では、SAS/neo において p53 の誘導とリン酸化、p21 の増加がみられた。

### 〈考察と結論〉

p53 発現が BNCT の効果に及ぼす影響を検討した結果、*in vitro* において p53 変異型 SAS は p53 野生型よりも BNCT に抵抗性を示すことが明らかとなった。SAS/neo では、p21 発現が増加して G1 期停止をきたしその後アポトーシスを生ずるが、SAS/mp53 では G1 期停止からのアポトーシスではなく G2/M 期の停止が増殖抑制により重要と思われた。*in vivo* において BNCT 後、SAS/neo と SAS/mp53 のいずれの腫瘍も縮小したが、p53 変異型で再増殖を認めた。変異型では野生型にみられる腫瘍組織の変性に加えて多核巨細胞を多く認めることから、M 期まで進んだ細胞が分裂不全による mitotic catastrophe をきたすものと考えられた。

一般的に BNCT では BPA の取り込みが高い部分で腫瘍に対する効果が顕著となる。細胞周期によって BPA の取り込みが少ない細胞では BNCT の物理線量が低下し、このような条件下では、p53 を介した経路が働かない p53 変異型の細胞において生存の可能性が高くなると思われる。したがって臨床上、p53 変異型 OSCC では、BNCT 後の腫瘍再増殖に対する配慮が特に重要と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は新規の放射線治療であるホウ素中性子捕捉療法（BNCT）の抗腫瘍効果について、p53 の野生型と変異型の口腔扁平上皮癌を用いて、*in vitro* および *in vivo* で研究したものである。その結果、p53 の変異型では野生型と比較して BNCT の増殖抑制効果に抵抗性を示すこと、野生型でみられる G1 期停止がなく G2/M 期停止を示すことを明らかにした。

本研究の結果は、p53 変異の頻度が高い口腔扁平上皮癌に対して BNCT を行う上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。