重粒子線照射が細胞に与える影響を調べる新しいアプリケーション ～ヒト口腔扁平上皮がん3次元インビトロモデルの応用展開～

泉　健次*1 *Izumi Kenji*
井川　和代*2 *Igawa Kazuyo*
下川　卓志*3 *Shimokawa Takashi*
濱野　毅*3 *Hamano Tsuyoshi*

1 はじめに

重粒子線は，拡大ブラッグピーク（Spread out Bragg peak; SOBP）という特性により，病変部のみに高線量を照射することができる上，周囲の正常組織を避けて安全に治療することが可能で，高LET（線エネルギー付与）であることでX線と比べて高いRBE（生物学的効果比）を有し，X線抵抗性腫瘍に対しても有効性が高い。したがって，重粒子線治療は照射回数が少なくて済み，患者への負担が少ないことも大きな利点である。

重粒子線治療は2016年から日本炭素イオン線治療臨床研究グループ（Japan Carbon-ion Radiation Oncology Study Group）により，頭頸部腫瘍の非扁平上皮がんに対する有効性・安全性が報告された。通常の放射線治療で用いられるX線は低LET放射線と呼ばれ，細胞のDNAに間接作用を起こす。扁平上皮がんの場合の根治的照射は66～70 Gyが目安となり，1回線量2 Gyの分割照射のため治療に6～7週間を要する。一方，高LET放射線の重粒子線治療は炭素イオン線が直接，DNAを二本鎖切断する効果･作用で細胞障害を引き起こすことができる。この違いから同じ吸収線量を照射してもRBEが異なり，X線が1.0，陽子線が1.1であるのに対し，重粒子線は2.5～5.5と相対的に高くなっている[1]。

本稿では筆者らの細胞培養技術を展開し，重粒子線（炭素線）が口腔重層扁平上皮がん細胞と正常口腔粘膜上皮細胞へ与える影響を調べた結果とプロトコールについて述べる。現在，重粒子線治療は唾液腺腫瘍や非扁平上皮がん等X線抵抗性腫瘍に対して有効な治療選択肢となっているが[2]，約90％を占める扁平上皮がんへの適用はない。このことは逆に，これまでの研究成果や臨床データにとらわれることなく，放射線がん治療の生物学的評価が可能なヒト細胞を用いたツールが存在し，検証できることを紹介するよい機会と考えた。3次元 *in vitro* モデルという生体模倣システムの概要と，放射線領域で利用する意義について，読者の目に留まれば幸いである。

2 ヒト細胞3次元モデル利用の背景

期待されて開発した新しい薬の候補が最終的に患者に届く例は1割に満たない，ということを耳にしたことがあるのではないだろうか。理由はたくさんあるが，薬の有効性や安全性を調べる際に利用されるヒト細胞培養や動物実験が原因の1つとされている。ヒトの体の中の機能を正確に発現していない細胞を使った薬の評価だと，薬がヒトの体の中と異なる応答を示すかもしれないし，種の異なる動物を使った試験では，ヒトと体内環境が違うため同じ結果が得られるわけではない。また，動物実験は倫理的観点からの規制も無視できない。ヒトの細胞を対象とした薬剤や毒性のスクリーニングの予測能力の向上は動物実験の削減にも貢献するので，重要なポイントである。一方，こうした問題を抱えていても，

薬の開発の臨床応用にいきなりヒトで試験することはできないため，どちらの方法も避けて通れないことも事実である。

放射線治療についても同様のことが言える。放射線によるがんの治療効果の予測は，培養細胞や動物実験データに基づき，細胞応答を予測するモデルを使用し，放射線量と細胞死の関係を推定する生物学的評価により実施可能である。これまでがん放射線照射による細胞生物学的評価は，2 次元（平面）培養細胞やがん細胞を移植した実験動物を用いて行われてきた。2 次元培養では細胞同士の立体的位置関係が構築されておらず，実験動物はヒトがん組織生体内環境と大きく異なる。がん放射線治療効果を臨床的に予測する際に，2 次元培養細胞や実験動物では，がん細胞応答が異なるため臨床予測性が低く，臨床的治療効果とは必ずしも一致せず，いずれの評価系もヒト臨床試験を正確に再現できていないことが課題だった。重粒子線治療も同様で，有用な生物学的評価法の確立により，生体に発生するがんをより正確に再現したモデルでの解析が望まれる。

そこで筆者らの研究室で用いている，ヒト口腔扁平上皮がんと正常口腔粘膜を再現した 2 層性の 3 次元インビトロモデルが解析ツールとして利用できるのではないかと考え，実際のがん治療プロトコールに準じた重粒子線照射プロトコールを考案した。

3 3 次元細胞培養法

ヒト生体内の臓器 / 器官 / 組織は，同じ種類の細胞，あるいは異なった種類の細胞と，細胞と細胞の間のスペースを埋めている細胞外マトリックスという成分を介して集積することで構築されている。各種臓器 / 器官 / 組織が様々な機能を発揮できるのは，複雑な細胞と細胞外マトリックスの連関，相互作用によってのみ可能であり，単一の細胞のみではそういった機能発現は不可能である。これまでのヒトがん研究や創薬研究，再生医療で用いられてきた培養皿の上で行われる 2 次元細胞培養や動物実験では，2 次元と 3 次元 , ヒトと動物という種の違いという問題があり，ヒト生体内で起きている生物学的事象を首尾よく反映，再現できているとは言い難い。近年，*in vitro* 研究領域において，個々の細胞を立体的に配置させ，各種臓器を模した 3 次元培養組織を構築する技術や作製例が非常に多く報告されるようになってきた。細胞培養自体に空間的な物理的パラメータを加えることで，従来の 2 次元細胞培養とはかけ離れ，かつ再現できない生体組織が持つ高い機能を示すことが証明されている [3]。3 次元組織を利用した創薬研究や再生医療研究等に対して，基礎研究から臨床応用まで多目的に活用できる本技術の発達は，当然がん研究や各種疾患モデルにも応用可能であり，新規治療法の開発への貢献が期待される。

現在，3 次元培養技術は大きく分けると一般に，足場材ベース，足場材フリー，マイクロ流路システム，3D バイオプリンター等がある。再生医療でよく耳にする細胞シートや，多種細胞を共培養できる幹細胞オルガノイド，がん創薬研究等に汎用されているスフェロイドは足場材フリー培養に分類される。筆者らは足場材ベースにあたる器官型培養（Organotypic culture）を用い，ヒト口腔粘膜を構成する上皮角化細胞をコラーゲン製足場材上に播種して 3 次元構築し，ヒト口腔内に移植利用可能な培養口腔粘膜の作製に取り組んできた [4, 5]。この方法は，培養皮膚を *in vitro* で作製するプロトコールに準じている。

4 口腔扁平上皮がん 3 次元 *in vitro* モデルの作製

Organotypic culture により様々な上皮組織の 3D がんモデルも作製可能と言われており [6]，筆者らはコラーゲンゲルの中に患者由来がん組織特有の線維芽細胞を組み込んだヒト口腔がん 3D モデルを構築し，口腔がんの浸潤メカニズムを解析した [7]。重粒子線照射にあたっては，インフォームドコンセントが得られた患者から採取した正常口腔粘膜由来の口腔線維芽細胞（NOF）を間質細胞としてコラーゲンゲル中に混ぜて固めて間質層を構築後，悪性度の異なる 2 種類のヒト口腔扁平上皮がん細胞（HSC-3, HSC-4）をゲル上に播種して，各がん細胞の 3D モデルを作製した（**図 1**）。このモデルは口の中にできた扁平上皮がんと同様に，がん細胞層（口腔粘膜上皮）の表面が空気に晒されている状態（気相）を再現している。かつ，がん細胞層の下にある間質層の下面だけが培地に接している。つまり，がん細胞層の下面からしか栄養（培地）が供給されないという口腔組織の立体的構造が模倣されており，Organotypic

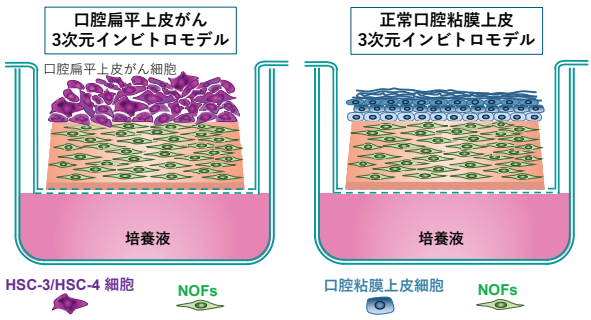

図 1　筆者らが用いたヒト口腔扁平上皮がん / 正常口腔粘膜 3 次元モデルの模式図

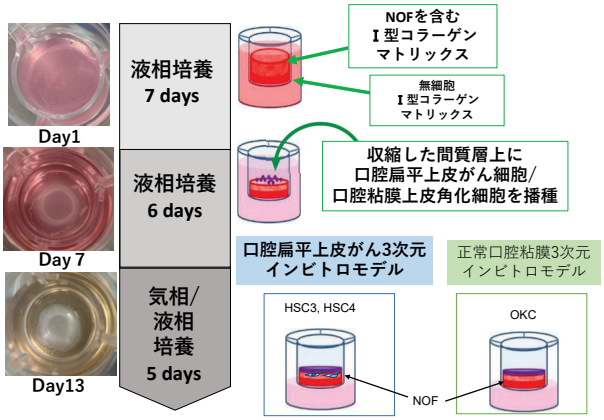

図 2　ヒト口腔扁平上皮がん / 正常口腔粘膜 3 次元モデル作製プロトコール

culture の構造上の特徴が活かされている。

3D モデル作製にはカルチャーインサートを含むディープウェルを使用する。具体的には，まず NOF を I 型コラーゲンゲルに混ぜて口腔粘膜下結合組織を模した間質層をカルチャーインサート内で構築し，液相培養を開始する。間質層は 2 日後にパイペットチップを用いてインサートの内壁から剥離する。これにより初日に厚さ約 7 mm だった間質層は徐々に収縮していき厚さは半分以下，形は中央がやや陥凹した山型になる。その結果，断面は台形を呈す。7 日目に山型になった間質層の中央部に口腔扁平上皮がん細胞を播種する。扁平上皮がん細胞播種後も液相培養を継続し，13 日目に 3D モデル表面が空気に晒される気相液相培養を開始し，合計 18 日間かけて口腔扁平上皮がん 3D モデルを構築する（**図 2**）。対照として，扁平上皮がん細胞に代えてヒト正常口腔粘膜上皮角化細胞（OKC）を播種した正常口腔粘膜 3 次元インビトロモデルをほぼ同様のプロトコールで併せて作製する [8]。

5　口腔がんにおける放射線治療の位置づけ

口腔がん治療の第一選択は，手術による切除が主体である。しかし，がんの進行度，患者の年齢，内科的疾患による全身状態により，放射線療法（外部照射，内部照射）や化学療法が優先して選択されることもある。一方，手術でがんがとり切れなかったり，リンパ節に転移が見られた症例や，局所進行がんで再発予防を目的として，術後放射線治療（化学療法併用）が行われることがある。

口腔がんは頭頸部がんの 1 つで，その大多数を占める扁平上皮がんは，一般に X 線を用いた放射線治療に対する感受性が比較的良好である。しかし，口腔組織に高線量があたると放射線誘発性口内炎や味覚障害，顎骨や唾液腺等正常組織への障害が発生する。これらの有害事象により患者 QOL の顕著な低下を招くことは，口腔がん放射線治療の課題であるため，近年は，強度変調放射線治療（IMRT）や分子標的薬等との併用により，有害事象を軽減できる放射線治療の選択肢が広がってきている。

6　重粒子線がん治療装置での照射

筆者らは，完成した口腔扁平上皮がん / 正常口腔粘膜 3D モデルを，量子科学技術研究開発機構（QST）の重粒子線がん治療装置（HIMAC）の実験専用照射室で単回照射（0, 10, 20 Gy）した（**図 3**）。フラスコや培養皿上で 2 次元培養されているがん細胞と，がん細胞層 / 口腔粘膜上皮層と間質の 2 層が一体化している 3D モデルへの照射で大きく異なるのは，ヒト口腔扁平上皮がん組織の厚みには及ばないが，2〜3 mm の厚みがある点である。実際の治療と同じく 6 cm SOBP の範囲内にこの厚みのモデルが含まれるように，サンプルの前にバイナリーフィルターを置いてエネルギーを調整した。これにより細胞層 / 口腔粘膜上皮層と間質に対する LET はおよそ 50 keV/μm と 60 keV/μm となった。実照射時間は 10 Gy と 20 Gy でそれぞれ約 7 分，約 14 分だった。照射後も培養を継続し，照射後 3 日，5 日，7 日目のモデルに対して，光学顕微鏡を用いた病理組

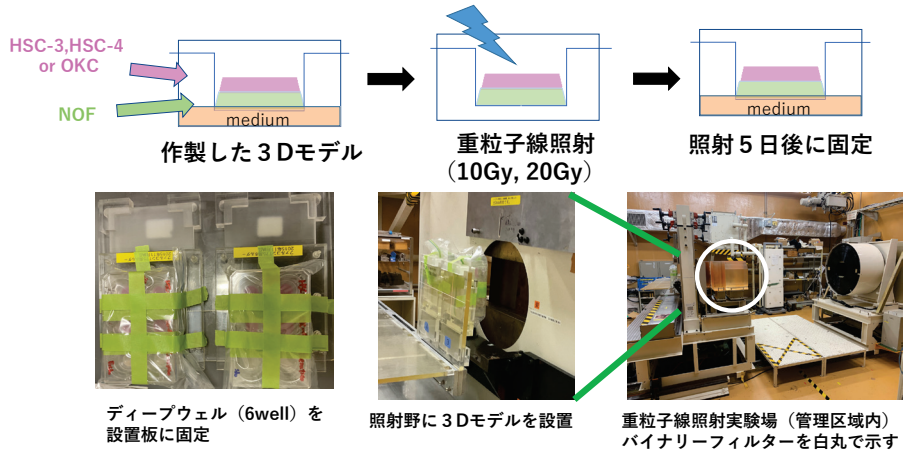

図３　3D モデルへの HIMAC での重粒子線照射の様子

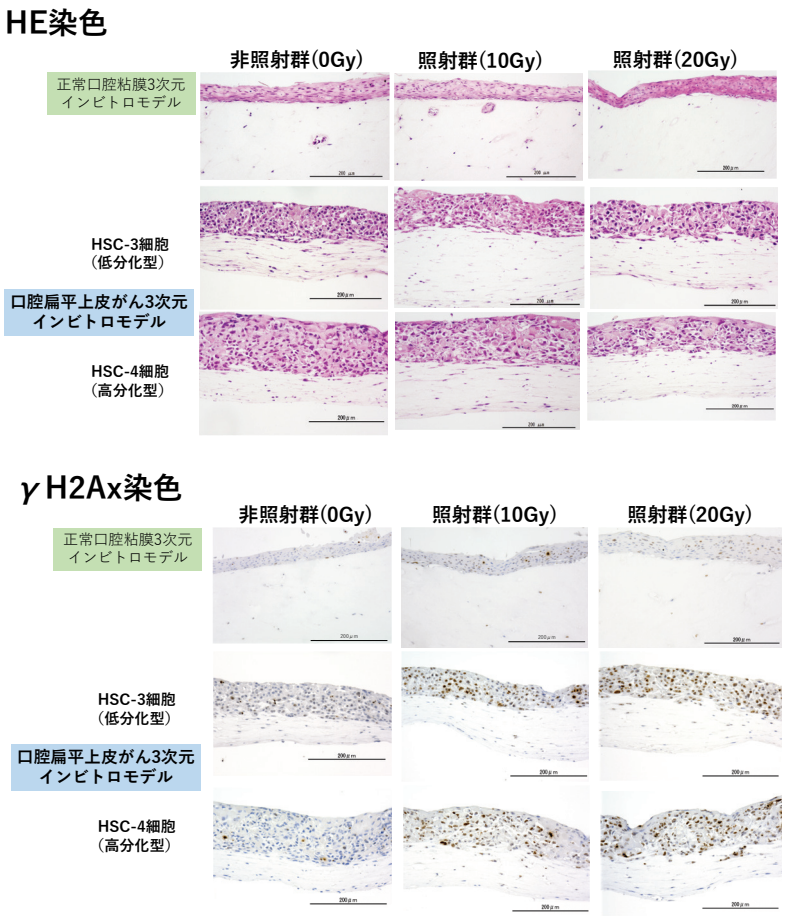

図４　重粒子線（0, 10, 20 Gy）照射後 5 日目の 3D モデルの HE 及び DNA 損傷マーカー（γH2Ax）染色像

織的観察を行い（**図 4**），細胞増殖や DNA 損傷マーカー染色とその陽性率算出，TUNEL 染色，培地中に分泌されるタンパク質濃度の測定を行った。今回用いたがん細胞で，低分化型の HSC-3 は高分化型の HSC-4 より悪性度は高いが，モデルの組織学的観察で，HSC-3 細胞と HSC-4 細胞では，明らかに細胞応答が異なっていた。この 3D モデルを用いて，放射線抵抗性のがんに対するより効果的な治療法の検討が可能であることが示唆された。口腔扁平上皮がん 3D モデル（正常口腔粘膜 3D モデルを対照）

を利用した解析は組織学的観察がメインとなり，2 次元培養細胞と比べ解析方法の選択肢は少なくなるのは避けられない。しかし，この取組みにより筆者らが行った分析方法により重粒子線（炭素線）照射後の生物学的評価が可能なことが確認できたことで，同じ土台で重粒子線以外の粒子線との効果比較やがん治療効果メカニズム解明，更に正常組織に発症する放射線誘発性口内炎という副作用評価への利用にもつながり，今後のがん放射線治療の発展に寄与できればと考えている。3D モデルは動物実験より精度の高い代替法としての利用も期待される。

7 展望

ここまで述べてきた口腔扁平上皮がん / 正常口腔粘膜 3D モデルに，血管系や免疫系の細胞を間質層に組み込むことで，モデルを生体環境に更に近づけ，より高度で詳細ながん放射線治療評価につながると考えている[4]。また，最近筆者の研究室では，4 種類の細胞を共培養した口腔扁平上皮がん 3D モデルを開発，報告した[9]。この 3D モデルは同一のカルチャーインサート内に，本稿で述べた口腔扁平上皮がん（HSC-3，HSC-4）3D モデル周囲に隣接して正常口腔粘膜 3D モデルが位置している。また，このモデルの間質には患者由来の NOF と患者由来のがん関連線維芽細胞で構成されている。試験的にこのモデルにも，HIMAC で炭素線照射を実施し，口腔扁平上皮がん細胞層と正常口腔粘膜上皮層の反応が同時に観察できることを確認している（**図 5**）。放射線治療は，照射野に口腔扁平上皮がんと周囲正常口腔粘膜が含まれるため，その影響を同時に評価することは重要である。また，ヒト由来細胞の 3 次元培養モデルを用いることで，今後重粒子線と化学療法等集学的治療法の治療計画を考慮するうえでもがんとその周囲正常組織の生物学的評価の手法として期待できる。将来的に，口腔扁平上皮がん細胞を患者由来のものに置き換えることができれば，個別化治療への発展につながると考えている。

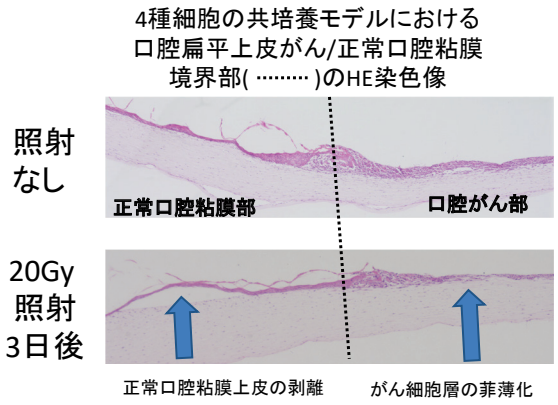

図 5　4 種細胞の共培養による 3D モデルへ重粒子線（20 Gy）照射後 3 日目の HE 染色像

謝辞

本稿の研究に多大なる協力を賜りました，新潟大学大学院医歯学総合研究科，内藤絵里子先生，髙田翔先生，相澤有香先生に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1）茂木　厚，耳鼻咽喉科展望，**64**, **4**, 240-246（2021）
2）伊川裕明，他，日本口腔腫瘍学会誌，**30**, **3**, 108-115（2018）
3）Baker BM., *et al*., *J. Cell. Sci*., **125**, 3015-24（2012）
4）Izumi K., *et al*., *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, **59**, 365-74（2023）
5）Suebsamarn O., *et al*., *Heliyon*, e11468（2022）
6）Ridky TW., *et al*., *Nature Medicine,* **16**, 1450-1455（2010）
7）Haga K., *et al*., *Transl Oncol*., **14**, **12**, 101236（2021）
8）Naito E., *et al*., *Animal,* **60**;1184-99（2024）
9）Aizawa Y., *et al*., Development and Characterization of a Three-Dimensional Organotypic In Vitro Oral Cancer Model with Four Co-Cultured Cell Types, Including Patient-Derived Cancer-Associated Fibroblasts

（*1 新潟大学大学院　医歯学総合研究科（歯学部），*2 岡山大学　中性子医療研究センター，*3 量子科学技術研究開発機構　量子医科学研究所）