

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06886

研究課題名(和文) 口腔がんホウ素中性子捕捉療法に対するボロカプテイトペプチドの基礎研究

研究課題名(英文) Basic study of de novo sodium borocaptate agents for boron neutron capture therapy

研究代表者

井川 和代 (igawa, kazuyo)

岡山大学・中性子医療研究センター・准教授

研究者番号：90512111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんホウ素中性子捕捉療法(BNCT)に対して、新規ボロカプテイト(BSH)製剤を用いることにより、口腔機能温存、形態維持に優れた非侵襲で局所制御可能ながん治療の確立を目指し、本研究では基礎検討を行った。具体的には、口腔がんに対して新規BSH製剤のin vitroにおける(1)ホウ素集積性(2)放射線感受性 さらにin vivoで(3)担癌モデルにおける安全性と有効性の評価を行い、現在BNCTで用いられているホウ素薬剤であるボロカプテイト(BSH)もしくはボロノフェニルアラニン(BPA)に対して比較検討を行った。将来的には新規BSH薬剤を用いた口腔がんBNCTの臨床応用を期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、頭頸部がんBNCTに対してBPAが用いられているが、細胞核蓄積性がなく短時間で大量投与が必要となる。新規BSH製剤は、ホウ素-10が12個からなる結晶BSHを有しかつドラッグデリバリーシステムとして最適なサイズの球体状であるため、ホウ素腫瘍集積性が高く少量投与可能となり、BNCT臨床における意義が高い。本研究は、機能温存が切望される口腔がんに対して新規BSH製剤を用いたBNCTの基礎研究を行うことで、将来的に局所制御可能でかつQuality of Life(QOL)の高い非侵襲的口腔がん治療の確立を目指しており、社会的意義が高いといえる。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is one of noninvasive therapeutic modality for cancer. Head and neck cancer (HNC) are one of main target for BNCT with consideration for functional and aesthetic outcomes. BNCT is based on the high energy alpha particles and recoiling lithium-7 nuclei that is production of nuclear capture by boron-10 and fission reactions. As boron-10, there are two boron agents such as L-boronophenylalanine (BPA) and sodium borocaptate (BSH) in clinical use for BNCT. However, there are still remaining difficult unsolved issues such as selectively and sufficiently boron compound delivery into each tumor cell. Therefore, de novo BSH agent for BNCT is evaluated in vitro and in vivo study. In the future, it could be applied for clinical study.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：口腔がん BNCT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内の口腔がん罹患率は、1975年には2,100人、2005年には6,900人であったが、2015年には7,800人と増加傾向にある。口腔がんのうち約60%は舌癌であり、その治療法は手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が主体となっている。特に、呼吸、嚥下、咀嚼、構語、味覚などの重要な機能を有する口腔領域の治療において機能温存と顔面形態維持に優れた放射線療法は重要な選択肢の1つとなるが、放射線抵抗性腫瘍による再発・転移症例はまだまだ認められるのが現状である。放射線治療の1つとして、1回の照射で正常組織にダメージを与えることなく腫瘍細胞を破壊できるBNCTは、2001年に再発頭頸部がんに対する優れた治療成績が報告されて以来、世界でも期待され臨床研究が進められてきた。BNCTの原理は、腫瘍細胞内及びその核内にホウ素-10を集積させ、熱中性子線を照射することでホウ素と熱中性子の捕捉反応により高エネルギーの粒子線が腫瘍細胞を選択的に破壊するもので、BNCTは従来の放射線治療とは異なる特徴を有する画期的な治療法として期待されている。

しかしながら、現在臨床で使用されているBNCTのホウ素製剤、ボロノフェニルアラニン(BPA)とボロカプテイト(BSH)において、BPAには細胞核蓄積性がなく、BSHは組織浸透性と細胞膜透過性が乏しいという問題点がある。この問題を解決するために、岡山大学では、BNCTに必要な組織浸透性、細胞膜透過性、細胞核蓄積性を有する新規ホウ素製剤を開発した(特許第6009154号(「細胞膜透過型ホウ素ペプチド」、岡山大学))。この新規ホウ素製剤は、アラニン6個リジン1個からなる界面活性型ペプチド(A6K)を用いることで、生体組織におけるBSHの浸透性および細胞膜透過性を著しく向上させ、さらに細胞内に導入されたBSHは速やかに細胞核へと集積し、少なくとも24時間は細胞内に滞留する性質を有し、既存のホウ素薬剤の難点を改善するものである[1]。さらに、この新規BSH製剤のホウ素導入効率は従来のBSH単体に比べて100倍近く高いものであり、細胞核内におけるホウ素の核分裂反応が生じる確率が飛躍的に向上することを意味しているため、極めて理想的なBNCTホウ素製剤として期待できる。

### 2. 研究の目的

口腔がんホウ素中性子捕捉療法(BNCT)に対して、新規ボロカプテイト(BSH)製剤を用いることにより、口腔機能温存、形態維持に優れた非侵襲で局所制御可能ながん治療の確立を目指し、本研究では基礎検討を行う。具体的には、口腔がんに対して新規BSH製剤の*in vitro*における(1)ホウ素(B10)集積性 (2)放射線感受性 さらに*in vivo*で(3)担癌モデルにおける安全性と有効性の評価を行い、現在BNCTで用いられているホウ素薬剤であるBSHもしくはBPAに対して比較検討し、将来的には新規BSH製剤を用いた口腔がんBNCTの臨床応用を目指すことを目的とする。

口腔がんBNCTに対して新規BSHに対する基礎検討を行い、*in vitro*、*in vivo*における効果安全性の評価を行い、口腔がんに対する新規BSH製剤を用いたBNCTの基礎データを確立することを目的とする

具体的には以下3つのテーマについて新規BSH製剤の検討を行う。

- (1) ホウ素集積性の評価
- (2) *in vitro* 放射線感受性の評価
- (3) *in vivo* 安全性と有効性の評価

### 3. 研究の方法

#### (1) ホウ素集積性

口腔がん細胞株としてヒト舌扁平上皮癌由来細胞(SAS, 理研)を用いて以下4群のホウ素化合物、{非ホウ素薬剤(PBS, Merck), BSH(Katchem), 新規BSH(岡山大学で調整), BPA(Katchem)}を添加し、継時的に(1, 2, 24時間)細胞内に残留するホウ素濃度をICP発光分析装置(セイコーインスツルメンツ製VISTA-PRO)を用いて測定した。ホウ素濃度はホウ素0.2mg/mlとなるように調整した。

#### (2) *in vitro* 放射線感受性

口腔がん細胞株としてヒト舌扁平上皮癌由来細胞(SAS, 理研)を用いて以下4群のホウ素化合物、{非ホウ素薬剤(PBS, Merck), BSH(Katchem), 新規BSH(岡山大学で調整), BPA(Katchem)}を添加し、24時間培養後、WSTアッセイにて細胞毒性試験を行った。さらに、放射線医学総合研究所(NIRS)の中性子発生用加速器システム(NASBEE)を用いて、NIRSの照射条件のもと中性子線(0-5 GyE)を照射した(図1)。中性子照射後10日間培養しコロニー形成法を用いて、細胞生存率曲線を作成した。また、新規BSH製剤の放射線感受性の評価のために、X線照射装置(日立メディコ MBR-1520R-3)を用いて、管電圧; 150 kV, 電流; 15 mA, フィルター; 0.5 mm Al + 0.2 mm Cuの照射条件のもと、X線(0-10 Gy)を照射した。X線照射後、コロニー形成法を用いて細胞生存率を作成した。

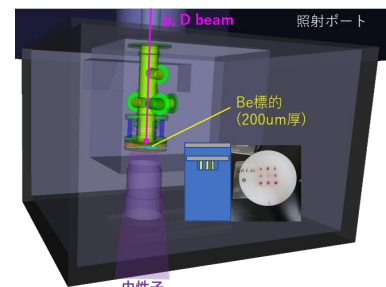


図1 *In vitro* BNCT照射体系

### (3) *in vivo* 安全性と有効性の評価

京都大学複合原子力研究所 (KURNS) の熱中性子場を用いて (図2) ヒト口腔がん細胞株 (SAS) を用いて頭頸部がんに対する BNCT の安全性と有効性を検討した。口腔がんモデルマウスとして、4 週齢メスのヌードマウス (Clea Japan Inc., Japan) の右足皮下に SAS 細胞株を移植し腫瘍を形成した。担癌マウスにホウ素薬剤 (BPA, Katchem) を腹腔内投与 (200 mg/kg) 後、熱中性子線量 (0, 3, 4  $\times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup>) を照射して BNCT を行い、継時的に腫瘍径、マウス体重測定を行った。腫瘍体積は次の近似式を用いて算出した { $V = (W^2 \times L) / 2$ , V: 腫瘍体積 W: 短径 L: 長径 }。



図2 *in vivo* BNCT 照射体系

## 4. 研究成果

### (1) ホウ素集積性

ヒト口腔がん細胞 (SAS) においては、BPA、新規 BSH、BSH の順にホウ素の高集積を認めた (図3)。また、ホウ素添加時間においては、2 時間以上添加したものにおいては有意差を認めないものの、いずれのホウ素化合物も 24 時間添加したものが高い集積性を示した。以上より細胞照射試験におけるホウ素添加時間は 24 時間とした。

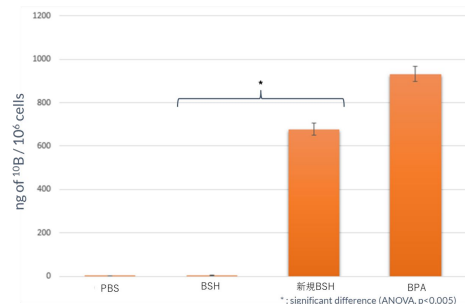


図3 新規BSHのヒト口腔がん細胞におけるホウ素集積性

### (2) *in vitro* 放射線感受性

WST アッセイにおいて細胞毒性試験を行ったところ、SAS における新規 BSH の細胞毒性は認めなかった。そこで、各ホウ素薬剤 24 時間添加後、X 線 0 ~ 10 Gy 照射 10 日後の細胞生存率を評価したところ、非ホウ素薬剤、ホウ素薬剤添加群にかかわらず高線量になるにつれ、生存率の低下を認めた。X 線 2Gy において、新規 BSH は 60% 生存率に対して、その他は約 50% 生存率を示した。さらに、各ホウ素薬剤 24 時間添加後、中性子線量 (0 ~ 10  $\times 10^{11}$  n/cm<sup>2</sup>) を照射したところ非ホウ素薬剤、ホウ素薬剤添加群にかかわらず線量が高くなるにつれ生存率の低下を認めた (図4)。中性子線量 2  $\times 10^{11}$  [n/cm<sup>2</sup>] 照射において、生存率は BPA 20%、新規 BSH 45%、PBS 70%、BSH 80% を示した。以上より動物愛護と中性子照射施設のマシタイムの観点から、動物照射試験では臨床で使用されている BPA と新規 BSH との比較試験をすることとした。

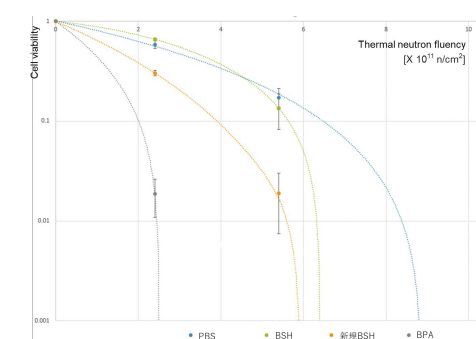


図4 口腔がん細胞 (SAS) におけるホウ素中性子捕捉反応

### (3) *in vivo* 安全性と有効性の評価

4 週齢メスのヌードマウス (Clea Japan Inc., Japan) の右足皮下に SAS 細胞株 ( $5 \times 10^6$  cells) を移植し腫瘍を作成した。担癌マウスにホウ素薬剤 { 非ホウ素薬剤 (PBS, Merck), 新規 BSH (岡山大学で調整), BPA (Katchem) } を腹腔内投与 (200 mg/kg) 後、0, 2, 24 時間後のホウ素濃度を測定した。新規 BSH 200 mg/kg の投与は困難であり、新規 BSH の調整方法ならびに動物投与方法の確立が必要となった。現在、新規 BSH 調整と投与のプロトコルを検討中である。そこで、口腔がん担癌マウス作成後、BPA (Katchem) を腹腔内投与 (200 mg/kg) した。投与 2 時間後に熱中性子線量 (0, 3, 4  $\times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup>) をマウス 5 匹ずつ照射して BNCT を行い、腫瘍体積を測定した。非照射群においては経時的に腫瘍が増加し、10 日目には 50% 以上の増大を認めた (図5)。一方、高線量中性子線照射後 10 日目では 80% 近くの縮小を認めた。以上より新規 BSH においても高線量照射条件での BNCT を KURNS で照射を予定している。

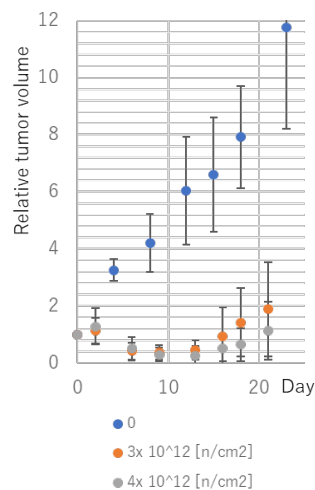


図5 口腔がん細胞株 (SAS) 担癌マウスにおける BNCT

## 引用文献

[1] H. Michiue et al., The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. *Biomaterials*. 2014 35(10):3396-405.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

“ The Okayama-Nagoya BNCT Project, ” Sauerwein W, Matsui H, Tsuchida K, Kiyonagi Y, Igawa

K, Furuya S, Ichikawa Y, Strahlender Onkol, 2018, 194 (Suppl.1), S100-S101.査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

“ 加速器 BNCT における頭頸部癌スクリーニングシステムの構築 ” 井川和代, 王碩, 奥井達夫, 伊原木聡一郎, 佐々木朗, 第 63 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2018/11/2-2018/11/4 幕張, 口頭, 国内

In vivo Evaluation system for accelerator-based Boron Neutron Capture Therapy, 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (ICNCT-18), Kazuyo Igawa 2018/10/28-11/2, Taiwan, preliminary lecture, 海外.

“ Evaluation Scheme of Boron 10 Compound for Accelerator-based Boron Neutron Capture Therapy, ” Kazuyo Igawa, Yasuaki Ichikawa, Shuichi Furuya, Hiroyuki Michiue, Toshiro Ono, Tadashi Hanafusa, Atsushi Fujimura, Hideki Matsui, Go Ichikawa, Yoshiaki Kiyonagi, Sachiko Yoshihashi, Kenichi Watanabe, Daiki Furuzawa, Kazuya Sato, Kazuki Tsuchida, Akira Uritani, Tsuyoshi Hamano, Ryo Ogawara, Aurélie Morytko, ” The 9th Young Researchers' BNCT Meeting, 2017/11/13-2017/11/15, Kyoto, ポスター, 国内.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ntrc.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。