

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21792042
研究課題名(和文)	頭頸部癌へのBNCTにトランスフェリン結合型硼素化合物運搬体を応用した基礎研究
研究課題名(英文)	The study of the BNCT effect using the transferrin conjugate boron carriers on head and neck cancer
研究代表者	
伊藤 雄一	( ITO YUICHI )
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号：	10530701

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌に対する BNCT 効果の増強を検討するために、Liposome を用いた研究を行った。研究成果として BSH を TF-PEG-liposome で修飾した場合、1、細胞内への BSH 輸送が確実になされていることが免疫組織化学的に確認された。2、実際に細胞へ中性子照射を行った場合 BSH に比べ有意に腫瘍殺効果を発揮することが確認された。以上の結果から TF-PEG-liposome は BNCT 効果を増強させることに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study using Liposome to examine the augmentation of the BNCT effect on oral squamous cell carcinoma. When it modified BSH in TF-PEG-liposome, it was confirmed immunohistochemically that the BSH transportation in cells was accomplished surely. It was actually confirmed that TF-PEG-liposome significantly showed a tumor killing effect as compared with BSH when we conducted neutron to cells. The results suggested that TF-PEG-liposome was useful for making BNCT effect increase.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ホウ素中性子補足療法、BSH、BNCT、口腔悪性腫瘍

#### 1. 研究開始当初の背景

初期口腔癌，すなわち，T1 ならびに early T2 症例においては，手術を主体とした治療で良好な結果を得ることが可能である．しかしながら，進行癌ならびに一次治療終了後の再発癌においては，手術，放射線治療，化学療法による集学的治療を行っても，その根治は期待しがたく，何らかの新たな治療戦略がなければ，その治療成績の向上は望めない．近年，本学脳神経外科の宮武ならびに京都大学原子炉の小野を中心とした研究グループに

より，悪性グリオーマの治療法として硼素中性子捕捉療法(Boron neutron capture therapy: BNCT)の研究が進められ，conventional な放射線治療を用いた成績を上回る治療成績を示している．さらに，最近 BNCT の適応範囲が広げられ，唾液腺癌，口腔癌など頭頸部癌においても臨床応用がされつつある．本学口腔外科学教室においても，大阪医科大学倫理委員会の承認を得て，平成 17 年度より BNCT による非手術適応の口腔癌患者に対する治療を行っている．臨床的には

従来の治療と比較し、本療法は明らかに優れた局所制御効果を示している。

BNCTは腫瘍細胞に $^{10}\text{B}$ 化合物を取り込ませ、中性子を照射することにより、高エネルギーの $\alpha$ 粒子とLi反跳核が飛程9および4ミクロンで放出されることにより腫瘍細胞のみを選択的に破壊する治療法である。この治療法の成否はいかにして $^{10}\text{B}$ を腫瘍細胞内へ特異的に集積させることができるかどうかである。そのための運搬体として様々な方法が研究されている。そのなかでわれわれはトランスフェリン結合型硼素化合物運搬体(Transferrin-PEG-Liposomal BSH)を用いた研究を行っている。

PEG-Liposomeは、薬物の輸送として研究されているLiposomeに細網内皮系組織による貪食を避けるためにポリエチレングリコール(PEG)を修飾し腫瘍周囲へのBSH輸送を容易にしたものであり、これに腫瘍細胞に過剰に発現しているTransferrin receptorをターゲットとしたTransferrinを結合し腫瘍細胞内への $^{10}\text{B}$ 集積を選択的に行うことができるようにしたものがTF-PEG-Liposomeである。

## 2. 研究の目的

これまでにわれわれは口腔扁平上皮癌細胞株(SAS)を用いたin vitroでの実験により、Transferrin-PEG-Liposomal BSHが修飾を行わないBSHにくらべ腫瘍細胞内へ高濃度に集積すること、細胞に集積した $^{10}\text{B}$ がTransferrin-PEG-Liposomal BSHにおいては他の修飾に比べ長時間集積していること。この集積がTransferrin Receptorを介したものであることを明らかにしている。

今回われわれは、1、各種口腔悪性腫瘍のTransferrin Receptorの発現量の差、2、免疫組織化学的検討による細胞内でのBSH局在、3、腫瘍細胞への中性子照射による腫瘍殺効果、4、担癌動物への中性子照射によるBNCT効果、を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 各種口腔悪性腫瘍におけるTransferrin Receptor発現量の差についての検討

口腔悪性腫瘍細胞株を培養し、腫瘍細胞表面のTransferrin Receptorの発現量をanti-Transferrin receptor抗体を使用してラベルしたのちにQIFIKit(DAKO)を用い蛍光強度から発現量を定量し、細胞間での発現量を比較した。結果は口腔悪性腫瘍細胞株としてはSASが蛍光強度の数値からTransferrin Receptorが強く発現していることが示唆された。

(2) 細胞内BSHの局在に関する免疫組織化学的検討

口腔扁平上皮癌細胞として細胞株SASを用いた。SASをチャンバースライド上で培養し各種修飾を行ったBSHを50ppmの濃度に調整し6時間作用させホルマリンで固定、BSHに対する抗体(大阪府立大学切畑教授より供与)を用い免疫組織化学的染色をおこないFITCにて蛍光標識を行った。核染色にPIを使用し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

(3) 腫瘍細胞への中性子照射による腫瘍殺効果の検討

腫瘍細胞を無血清培地で培養し、Bare-BSH, PEG-Liposomal BSH, TF-PEG-Liposomal BSHを使用した群に分けた。各々50PPMのホウ素濃度になるように培地を作成し、各群6時間細胞に暴露させ、6時間後に培地を除去。ホウ素を50PPM含む培地、もしくはホウ素を含まない培地に細胞を $1 \times 10^5$ 個/mLに希釈し、テフロンチューブに移し照射のサンプルとした。中性子をあらかじめ設定した時間照射。中性子照射後、細胞を200個/シャーレに調整し7日間培養しcolony formation assayを行った。結果、中性子照射時にホウ素を含む培地を使用した場合いずれの群でも腫瘍殺効果が得られたが、照射時にホウ素を含まない場合にはTF-PEG-Liposomal BSHについてのみ強い腫瘍殺効果が得られた。

(4) 担癌動物への中性子照射によるBNCT効果の検討

口腔扁平上皮癌細胞の担癌マウスを作製し、尾静脈より各種修飾をしたホウ素化合物を静注し、事前に予測された血中有効濃度の時に中性子を照射、その後腫瘍サイズの計測を行いBNCT効果について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内BSH局在に関しての結果

BSHの細胞内局在は細胞質中に認められ、核には認めなかった。またTransferrinを修飾した場合でもbare-BSHと同様の細胞内局在であることが明らかとなった。なおネガティブコントロールでは核染色のみ蛍光を検出した(Fig. 1. 2.)。本研究により、BSHの細胞内局在について明らかにすることができた。TF-PEG-Liposomeで修飾した場合でも同様の細胞内局在であることが確認され、DDSとして使用した場合でもBSHの運搬体として有用であることが示唆された。

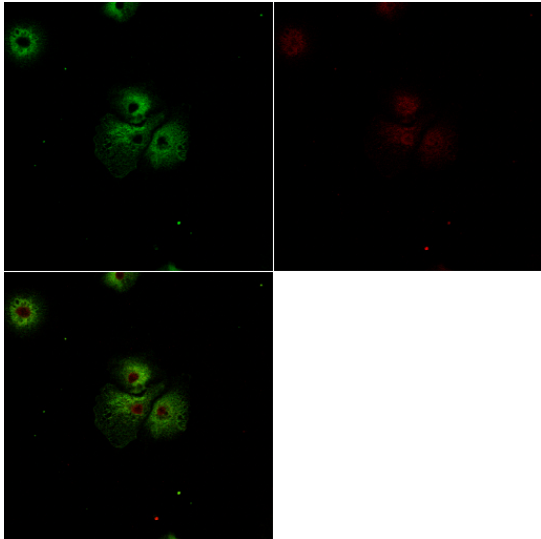


Fig. 1. BSH単体を使用した場合におけるBSH局在の蛍光観察結果  
 左上：FITC 蛍光  
 右上：PI 蛍光  
 左下：FITC+PI オーバーレイ

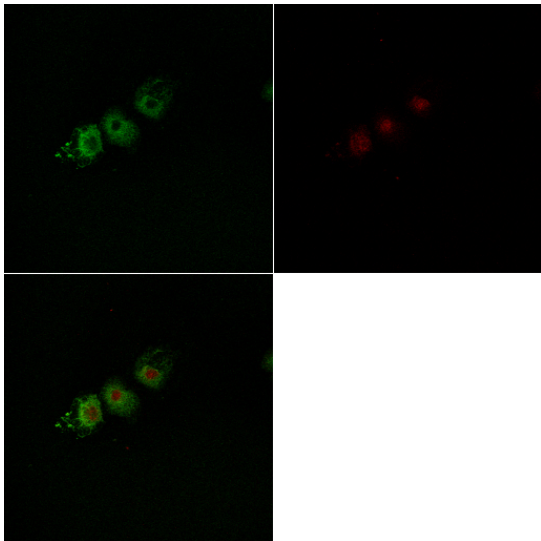


Fig. 2. TF-PEG-Liposomal BSHを使用した場合におけるBSH局在の蛍光観察結果  
 左上：FITC 蛍光  
 右上：PI 蛍光  
 左下：FITC+PI オーバーレイ

(2) 腫瘍細胞へ中性子照射を行った実験の結果

中性子照射時にホウ素を含む培地を使用した場合、いずれの群でも腫瘍殺効果が得られたが、照射時にホウ素を含まない場合にはTF-PEG-Liposomal BSHについてのみ強い腫瘍殺効果が得られた。これは、過去に行った実験より、TF-PEG-Liposomal BSHは腫瘍細胞内に取り込まれた場合、腫瘍細胞から抜け出しにくいことが分かっており、経時的に細胞内ホウ素濃度が下がらなかつたため腫瘍殺効果が高かったことが示唆された

(Fig. 3. 4. 5.)。

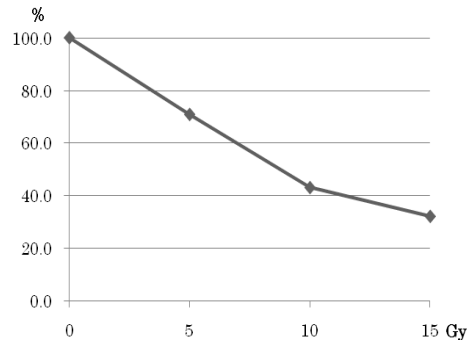


Fig. 3. γ線による腫瘍殺効果の検討  
 50ppm20分間の中性子照射は理論上γ線15Gy相当に値する

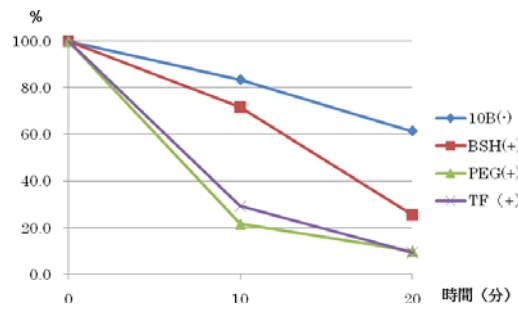


Fig. 4. 中性子照射時に<sup>10</sup>Bを含む場合  
 TF-PEG-LiposomeおよびPEG-Liposome群で腫瘍殺効果がγ線よりも高い。

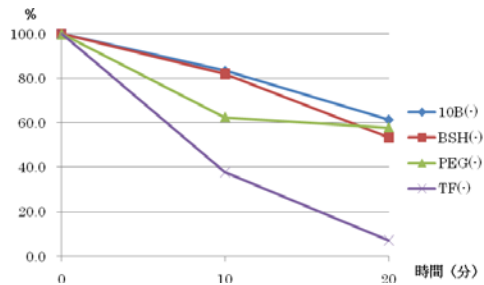


Fig. 5. 中性子照射時に<sup>10</sup>Bを含まない場合  
 PEG-Liposome群は経時的に細胞内ホウ素濃度が減少したために20分の時点ではBSHとほぼ同様の結果であると考えられるが、TF-PEG-Liposome群では腫瘍殺効果を維持していた。

(3) 担癌動物への中性子照射の実験結果  
 TF-PEG-Liposomal BSHを使用した群ではBSH単体使用群に比べ腫瘍サイズの著明な減少を認めた。しかしながらこの実験では十分なn数を準備できなかったため統計上有意な変化として観察することはできなかった。

今回行った一連の本実験より TF-PEG-Liposome を DDS として使用することにより BNCT 効果の更なる向上が図れる可能性があることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Y. KIMURA, M. SHIMAHARA, Y. ITO, Y. ARIYOSHI, T. SHIMAHARA, S. KAWABATA, S. MIYATAKE, S. KASAOKA and K. ONO. Delivery of Sodium Borocaptate (BSH) to Oral Cancer by Transferrin-PEG-Liposome, for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). Bulletin of the Osaka Medical College 査読有 56, 2010, 65-72
- ② Y. Ito, Y. Shimahara, Y. Ariyoshi, M. Shimahara, S. Miyatake, S. Kawabata, S. Kasaoka, K. Ono. Disposition of TF-PEG-Liposome-BSH in tumor-bearing mice. Applied Radiation and Isotopes 査読有 67, 2009, S109-S110

[学会発表] (計 7 件)

- ① 伊藤雄一、木村吉宏、有吉靖則、島原政司、口腔扁平上皮癌細胞に対するホウ素運搬体を用いた BNCT 効果の検討、第 29 回日本口腔腫瘍学会、2011. 1. 27、熊本
- ② 伊藤雄一、木村吉宏、有吉靖則、島原政司、武井祐子、島原政司、口腔扁平上皮癌細胞へのホウ素化合物の取り込みと細胞内局在に関する検討、第 64 回日本口腔科学会、2010. 6. 24、札幌
- ③ 伊藤雄一、有吉靖則、木村吉宏、島原政司、武井祐子、島原政司、BNCT における口腔扁平上皮癌細胞でのホウ素化合物の細胞内局在に関する研究、第 28 回日本口腔腫瘍学会、2010. 1. 28、東京
- ④ 伊藤雄一、木村吉宏、有吉靖則、島原政司、宮武伸一、川端信司、笠岡敏、小野公二、口腔扁平上皮癌細胞への硼素化合物移送に関する研究、第 6 回日本中性子捕捉療法学会、2009. 9. 19、京都

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 雄一 (ITO YUICHI)

大阪医科大学 医学部・助教

研究者番号：10530701