

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04790

研究課題名(和文) 悪性がん根治を実現するBNCTの新規ホウ素薬剤創出とモデル作製

研究課題名(英文) Development of new boron-drugs and models for BNCT targeting malignant cells.

研究代表者

笠井 智成 (Kasai, Tomonari)

岡山大学・中性子医療研究センター・准教授

研究者番号：30530191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトがん由来細胞株、iPS細胞由来のマウス肝前駆細胞由来のがん幹細胞モデルを用いて、ホウ素取込量の測定と遺伝子発現解析を進めた。遺伝子発現量からホウ素取り込み量の予測モデルを作成し、未試験のがん細胞株の実際のホウ素取込量を測定したところ10種類中7種類が判定予測と合致した。細胞内に取り込まれた新規ホウ素薬剤の濃度は、予備試験結果から想定していた細胞表面マーカー因子に加えて細胞内滞留性に関与すると考えられる因子が大きく影響することが判ってきた。新規ホウ素薬剤は核内および代謝に関わる細胞内小器官に多く蓄積することが分かり、ホウ素中性子捕捉反応によるがん細胞除去の実現可能性が高いことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、1回の照射だけでがんを全て消滅する技術開発が期待でき、それによって再発や転移のリスクを回避することが期待できる。すなわち、新規ホウ素薬剤を開発しBPAと併用することによって、多様な性質を有するがん細胞全てにホウ素(10B)を高濃度で行き渡らせることを可能とする。また、正常細胞を始点として、CSCsおよびがん細胞までの様々な細胞について、新規ホウ素薬剤の取り込みを予測する技術を構築し、殺傷効果を検証した。適応疾患の拡大だけでなく、がん早期診断法の開発やペプチドを用いた新規薬剤開発にも繋がる。BNCTによる悪性がん根治を目指して更に発展した研究が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The new boron-drug uptake and gene expression level were confirmed by using the liver cancer stem cell model derived from mouse iPS cells and human cancer cell lines. We developed a model for boron uptake from gene expression levels and measured the boron uptake of cancer cell lines. As a result, 70% of cancer cell lines were matched with the prediction. It was found that the concentration of a new boron agent taken into the cell was greatly influenced by not only cell surface markers, but the factors thought to be involved in intracellular retention. The novel boron drug has a high possibility of cancer cell elimination by boron neutron capture reaction, since it was observed that the drugs accumulate in the nucleus and in intracellular organelles involved in metabolism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 ホウ素薬剤 悪性がん がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) は遺伝子変異などのバックグラウンドが豊富で、その影響を無視できず、また、がん細胞が集団 (不均一な集団) となっているため、がんの根治に向けては不均一な集団を一斉に叩ける手法を見出すことが急務だと考えられた。ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) はホウ素 (10B) を取り込んだがん細胞を特異的に殺傷する治療法である。国内の BNCT で保険適用となっている薬剤はステボロニン (BPA) 1 種類のみである。ステボロニンはアミノ酸フェニルアラニンに 1 個のホウ素が結合した BPA (ホウ素フェニルアラニン) であり、アミノ酸トランスポーター-LAT1 が高発現しているがん細胞に対して、BPA は非常に素晴らしい取り込み量を示している。一方で、1 種類の薬剤だけでは不均一な集団全てにホウ素を行き渡らせるのは難しいと考えられた。多様な性質を有するがん細胞全てにホウ素 (10B) を高濃度で行き渡らせる技術の開発とがんゲノム医療や個別化医療とも連携が可能な新規ホウ素薬剤の取込予測システムの構築が求められた。

2. 研究の目的

患者背景に依らない、また組織細胞への分化が多段階の CSCs を作製して遺伝子発現変化のデータ、新規ホウ素薬剤取り込みのデータを取得し、がんゲノム医療や個別化医療とも連携が可能な新規ホウ素薬剤の取込予測システムを構築すること、また、新規ホウ素薬剤の用量を最適化すること。新規ホウ素薬剤の取り込みと細胞内滞留のメカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

主に以下の 5 つの項目で研究を進めた。

- (1) CSCs モデル作製と解析
- (2) ホウ素薬剤の取込量の定量と予測式の構築
- (3) 予測式の検証
- (4) 細胞内取り込みメカニズム解析
- (5) 中性子照射実験による予測の検証

本研究代表者らが開発した方法で正常な iPS 細胞から CSCs モデルを作製した。すなわち、乳がん由来細胞株を培養した培養上清からコンディションドメディウム (CM: Conditioned Medium) を調製し、iPS 細胞用の培地に CM を添加して iPS 細胞を培養することで、がん細胞への誘導を行い、CSCs モデル細胞を作製した。誘導後のモデル細胞を免疫不全マウスに同所移植を行うことで、CSCs が局在する腫瘤を形成させた。腫瘍組織から切片を作製して、HE 染色を行った。さらに、C57BL6 マウスの肝組織から肝前駆細胞オルガノイドを作製する過程でヒト肝臓癌由来細胞株を用いて調製した CM を添加することで、肝がん前駆細胞オルガノイドも作製した。新規ホウ素薬剤について、分散化と安定化を高める目的で調製法の検討と添加剤の検討を行った。ヒトがん由来細胞株、および iPS 細胞由来 CSCs モデル、マウス肝前駆細胞由来のがん幹細胞モデルを用いて、ホウ素取込量の測定と遺伝子発現解析を行った。がん細胞株の遺伝子発現データベースを用いた比較解析から、細胞内に取り込まれるホウ素濃度と相関が高い遺伝子群を見出した。この中から特に高い相関がある 2 遺伝子を選び、11 種類のがん細胞株を学習セットとし、遺伝子発現量を横軸として、それぞれの細胞を新規ホウ素薬剤存在下で培養した後に ICP-MS で定量した細胞内ホウ素濃度を縦軸として検量線を作成し、さらに重回帰分析を行った。学習セットに用いなかった 10 種類のがん細胞株について、この検量線からホウ素取り込み量の予測を行い、高濃度と判定する閾値を設定した。未試験のがん細胞株の実際のホウ素取込量を測定し、高濃度予測判定の正解率を検証した。予備試験の結果から想定していた細胞表面マーカーに加えて、2 遺伝子がコードするタンパク質レベルでの発現解析を行い、ホウ素取込量との相関性を調べた。細胞内ホウ素取込量が高濃度または低濃度である細胞にホウ素薬剤を曝露した後、中性子線照射を行い、がん細胞殺傷効果をコロニーフォーメーションアッセイ、WST-8、細胞数測定による細胞生存率あるいは増殖率によって評価した。

4. 研究成果

作製した CSCs モデル細胞の移植によって得られた腫瘍は病理学診断によって、臨床像に近く悪性度が非常に高い特徴を示していることを確認した。さらに、この腫瘍組織から細胞を分離して初代培養を行い、乳がんおよび肝がん CSCs モデル細胞の集団を作製した。肝がん前駆細胞オルガノイドのコロニーは正常な肝前駆細胞オルガノイドと比較して、分化した細胞が多く存在すること、コロニー形状がいびつになる様子が観察された。作製した肝がんオルガノイドを C57BL6 マウスに同所移植することで、マウスの免疫を維持した CSCs 担癌モデルを作製した。作製した CSCs には新規ホウ素薬剤の取込が高い集団が存在することを確認した。また、ヒトがん由来の細胞株でも新規ホウ素薬剤の取込が非常に高い株が存在することが分かった。細胞内に取り込まれた新規ホウ素薬剤の濃度は、予備試験結果から想定していた細胞表面マーカー因子に加えて細胞内の滞留性に関与すると考えられる因子が大きく影響することが判ってきた。このことから、遺伝子発現量を基に取込量を予測できる可能性が示唆された。細胞内ホウ素の濃度だけでなく、細胞内局在によっては 1 細胞レベルで同じ濃度であっても、ホウ素中性子捕捉反応の効果を高めることが期待できる。抗 BSH 抗体を用いた免疫電子顕微鏡画像の観察より、新規ホウ素薬剤は核内および代謝に関わる細胞内小器官に多く蓄積することが分かり、高濃度と設定した閾値を下回る場合でもホウ素中性子捕捉反応によるがん細胞除去の可能性があることが分かった。予測モデルの構築に用いた 2 遺伝子のタンパク質レベルでの発現量とホウ素取込量を比較したところ相関性が高いことが分かった。これまでに乳がん細胞株、肝がん細胞株、血液がん細胞株の他、作製したがん幹細胞モデルにおいても 2 つの因子は新規ホウ素薬剤が細胞内に高濃度で蓄積するために重要な役割を果たすと考えられ、現在、治療に用いられているホウ素薬剤 BPA と併用することができれば、多様な性質を有するがん細胞全てにホウ素 (10B) を高濃度で行き渡らせることが可能だと考えられた。本研究によって調製法を確立した新規ホウ素薬剤は高濃度で様々ながんを集積させることが可能であり、今後は構築した予測式から、がんゲノム医療や個別化医療との連携を目指した研究を推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Zhang Zaijun, Ishihata Hiroaki, Maruyama Ryuto, Kasai Tomonari, Kameda Hiroyuki, Sugiyama Tomoyasu	4. 巻 24
2. 論文標題 Deep Learning of Phase-Contrast Images of Cancer Stem Cells Using a Selected Dataset of High Accuracy Value Using Conditional Generative Adversarial Networks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5323 ~ 5323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanai Yumi, Ishihata Hiroaki, Zhang Zaijun, Maruyama Ryuto, Kasai Tomonari, Kameda Hiroyuki, Sugiyama Tomoyasu	4. 巻 10
2. 論文標題 Temporal and Locational Values of Images Affecting the Deep Learning of Cancer Stem Cell Morphology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 941 ~ 941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10050941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉山友康、花井優未、石畑宏明、張再軍、丸山竜人、笠井智成、亀田弘之
2. 発表標題 深層学習法を応用したがん幹細胞形態の認識技術の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyasu Sugiyama
2. 発表標題 Segmentation of cancer stem cell using CGAN
3. 学会等名 The 15th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine & Engineering (IEEE-NANOMED 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岩崎 良章 (Iwasaki Yoshiaki) (00314667)	岡山大学・保健管理センター・教授 (15301)	
研究 分担者	杉山 友康 (Sugiyama Tomoyasu) (30367198)	東京工科大学・応用生物学部・教授 (32692)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------