

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861571

研究課題名(和文) 硼素中性子捕捉療法(BNCT)による口腔癌細胞の生と死の制御機構の多角的解析

研究課題名(英文) BNCT controls the life and death mechanisms of cancer cells.

研究代表者

仲川 洋介(Nakagawa, Yosuke)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞において、ホウ素薬剤(BPA)を作用後に中性子照射を行った時の生存率曲線などの基礎データの収集を行った。生存率曲線からD10における生物学的効果比(RBE)は、約2.5から3.0であった。照射後の細胞周期の変動に関して解析を行ったところ、等線量2Gy照射時に中性子照射を行った群では、細胞周期の停止を認めた。また、動物実験により抗がん剤として汎用されている5-FUを投与し3日後にBPAの投与を行うと、腫瘍内のホウ素の取り込みが有意に低下していることを認めた。

研究成果の概要(英文)：With neutron radiation after using boron pharmaceuticals (BPA) or X-ray, we collected foundational data, such as the survival rate curve. The relative biological effectiveness (RBE) from the survival rate curve to D10 was from approximately 2.5 to 3.0. Additionally, when we analyzed fluctuations in the cell cycles after irradiation, when isodose 2Gy irradiation was performed, in the neutron radiation group, it was recognized that the cell cycle stopped in the G2/M.

Next, with the transplantation-based animal experiments, an attempt was made to elucidate what cause existing BPA to accumulate in the tumor, and factors to prevent such accumulation. No significant difference was noted in the normal tissue of either group, but in the group to which 5-FU was administered to cancer tissue and 3 days later BPA was administered, a significant decrease in the absorption of boron was recognized.

研究分野：外科系歯学

キーワード：BNCT BPA 5-FU ICP 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、がん細胞に取り込まれた硼素化合物 ( $^{10}\text{B}$ ) に熱中性子線を照射し、発生する  $\alpha$  粒子 (163 keV/ $\mu\text{m}$ ) と Li 原子核 (210 keV/ $\mu\text{m}$ ) の核分裂 (硼素中性子捕獲反応) エネルギーを利用した高 LET 放射線治療である。これまで臨床研究によって難治性がんである悪性脳腫瘍、再発頭頸部腫瘍、悪性黒色腫などに効果があることが示されてきた。

X線や  $\gamma$  線などの低 LET 放射線に比べて、高 LET 放射線では照射されたがん細胞の DNA や染色体に、修復が困難である複雑な損傷をもたらす、より高い生物学的効果を及ぼすことが知られている。しかしながら、BNCT によってもたらされる効率的な細胞死への誘導メカニズムは不明な点が多い。

そこで本研究では、低 LET 放射線である X線および  $\gamma$  線と比較することで、BNCT による効果的な細胞死誘導機構を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

ヒト扁平上皮がん細胞 (SAS 細胞) を用いてホウ素薬剤 (BPA) を作用後に中性子照射を行った群 (BNCT 群) と X線照射を行った群で、生存率曲線の基礎データの収集を行った。

SAS 細胞を用いてホウ素薬剤 (BPA) を作用後に 2Gy 相当の線量が照射されるように中性子照射を行った群 (BNCT 群) と X線照射を行った群で、細胞周期の変化を比較した。

SAS細胞を移植したマウス動物実験により、抗がん剤の 5-FU 先行投与によりがん細胞の BPA 取り込みに影響を及ぼすか否かの研究を行った。

5-FU の先行投与により、ホウ素の取り込みが阻害されるメカニズムの分子生物学的手法を用いて検討した。

## 3. 研究の方法

SAS 細胞にホウ素薬剤 (BPA) を作用した後

に中性子照射を行い、また X線照射を行い、コロニー法にて生存率曲線の基礎データの収集を行った。

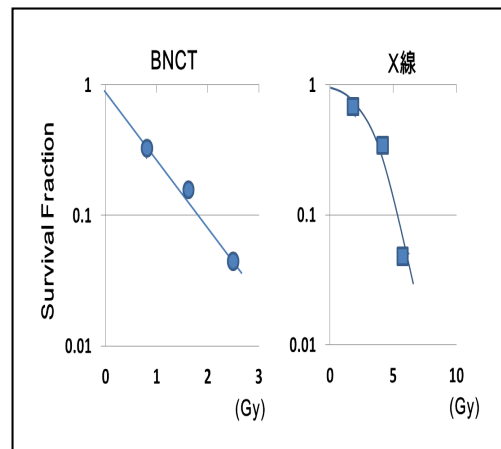
ヒト扁平上皮がん細胞 (SAS 細胞) を用いてホウ素薬剤 (BPA) を作用後に 2Gy 相当の線量が照射されるように中性子照射を行った群 (BNCT 群) と X線照射を行った群で、PI 染色後にフローサイトメトリーを用いて照射 12 時間後、24 時間後の細胞周期の変化を比較した。

SAS 細胞を移植したヌードマウスを用いた移植系動物実験を行い、5-FU を 15 mg/kg 連続 5 日間投与し 3 日後に BPA 投与を行った群と 10 日後に BPA 投与を行った群および 5-FU の先行投与を行わないコントロール群で、がん組織および正常組織への BPA 集積に差が生じるか否かの比較検討を行った。BPA 投与 1 時間後に組織採取を行い、灰化処理を行った後に ICP 装置を用いてホウ素濃度の解析を行った。

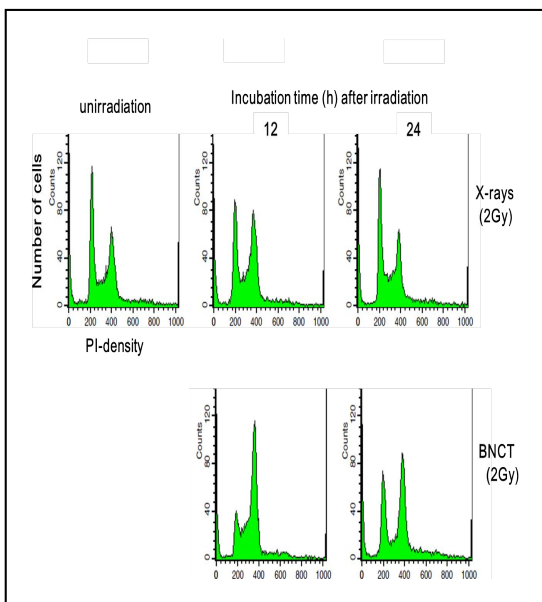
SAS細胞を用いて 5-FU (10 $\mu\text{M}$ ) で 24 時間処理後に培地を交換し、処理後 24 時間後に細胞を回収しメタノール固定を行い PI 染色の後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化を検討した。

## 4. 研究成果

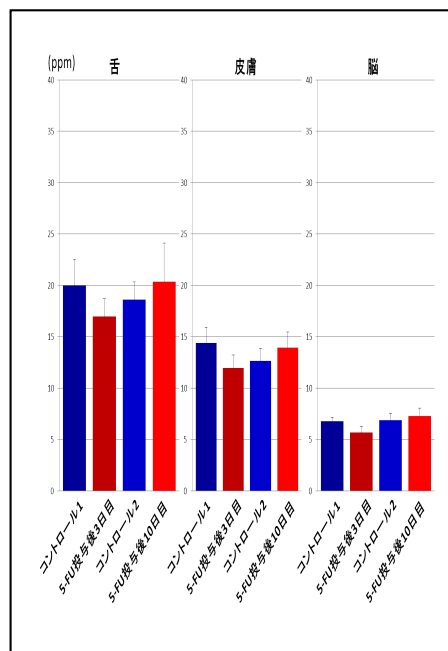
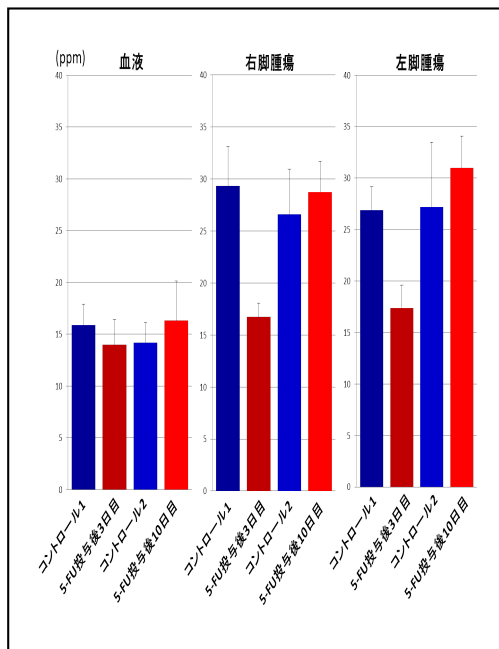
ホウ素薬剤 (BPA) を作用後に中性子照射を行った群 (BNCT 群) では、生存率曲線から D10 における生物学的効果比 (RBE) は、約 2.5 から 3.0 であった。



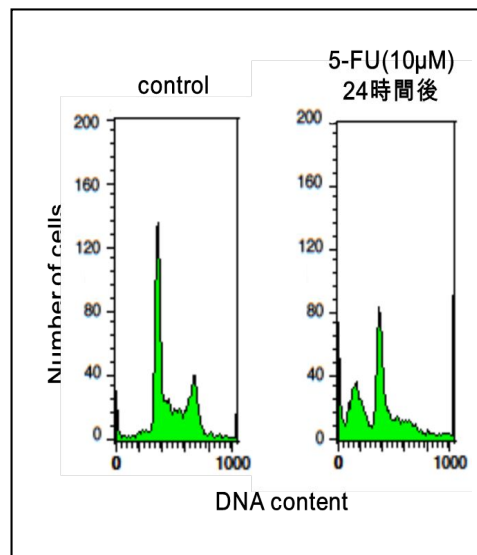
等線量2Gy照射時に中性子照射を行った群では、照射後12時間を超えて24時間でもG2/M期において細胞周期の停止を認めた。



正常組織においては3群ともBPAの集積に有意な差は認めず、舌、血液、皮膚、脳の順に高い集積を認めた。がん組織においては10日後にBPA投与を行った群および5-FUの先行投与を行わないコントロール群では有意な差を認めず、3日後にBPA投与を行った群では5割程度まで集積の低下を認めた。5-FU先行投与により、BPA投与までの間隔が短ければ、正常組織においてはBPA集積には影響を与えないが、腫瘍組織においてはBPA集積の低下をもたらすことが示唆された。



5-FUで24h処理した群でG2/M期での細胞周期の停止を認め、さらにSubG1に著明な集積を認めることで細胞死(アポトーシス)の誘導が考えられた。これらより、5-FUの先行投与によってBPAの取り込みが阻害されている要因は、腫瘍組織の細胞周期の停止と腫瘍組織内の壊死組織の増加によると考えられた。



### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

Nakagawa Y, Kajihara A, Takahashi A, Murata AS, Matsubayashi M, Ito SS, Ota I, Nakagawa T, Hasegawa M, Kirita T, Ohnishi T, Mori E. BRCA2 protects mammalian cells from heat shock. *Int J Hyperthermia* 2017; 10:1-7.  
Takahashi A, Mori E, Nakagawa Y, Kajihara

A, Kirita T, Pittman DL, Hasegawa M, Ohnishi T. Homologous recombination preferentially repairs heat-induced DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Int J Hyperthermia* 2017; 33(3): 336-342.

Kondo N, Michiue H, Sakurai Y, Tanaka H, Nakagawa Y, Watanabe T, Narabayashi M, Kinashi Y, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Detection of  $\gamma$ H2AX foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2016 ; 21(2):108-112.

Watanabe T, Hattori Y, Ohta Y, Ishimura M, Nakagawa Y, Sanada Y, Tanaka H, Fukutani S, Masunaga SI, Hiraoka M, Ono K, Suzuki M, Kirihata M. Comparison of the pharmacokinetics between L-BPA and L-FBPA using the same administration dose and protocol: a validation study for the theranostic approach using [18F]-L-FBPA positron emission tomography in boron neutron capture therapy. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 859.

Kondo N, Sakurai Y, Hirota Y, Tanaka H, Watanabe T, Nakagawa Y, Narabayashi M, Kinashi Y, Miyatake S, Hasegawa M, Suzuki M, Masunaga S, Ohnishi T, Ono K. DNA damage induced by boron neutron capture therapy is partially repaired by DNA ligase IV. *Radiat Environ Biophys*. 2016; 55(1):89-94.

Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Takai N, Nakagawa Y, Tanaka H, Watanabe T, Kume K, Toho T, Miyatake S, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Localized radiation necrosis model in mouse brain using proton ion beams. *Appl Radiat Isot* 2015; 106: 242-246.

[学会発表](計5件)

仲川洋介, 伊藤宗一郎, 桐田忠昭 「口腔がん細胞におけるATR阻害による5-FU増感効果の検討」第36回 日本口腔腫瘍学会総会学術大会(2018年1月25・26日, 新潟グランドホテル)

柳生貴裕, 青木久美子, 山川延宏, 上田順宏, 上山善弘, 仲川洋介, 今田光彦, 桐田忠昭 「口腔上皮内腫瘍(OIN)の癌化における腫瘍微小環境とPD-1/PD-L1免疫チェックポイント分子」第35回 日本口腔腫瘍学会(2017年1月26・27日, 福岡国際会議場)

伊藤宗一郎, 仲川洋介, 桐田忠昭 「ATR阻害による5-FU増感作用の検討」第71回 日本口腔科学会総会学術集会(2017年4月27・28日, ひめぎんホール)

Ito S, Nakagawa Y, Kirita T. 「ATR inhibition enhances 5-fluorouracil sensitivity in human oral cancer cells.」6th World Oral Cancer Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO)(2017年5月17・18・19・20, Hotel Shangri-La, Bengaluru, India)

仲川洋介, 下村弘幸, 下村忠弘, 柳生貴裕, 玉置盛浩, 桐田忠昭 「若年男性の口蓋に発生した多形腺腫由来筋上皮癌の1例」第61回日本口腔外科学会総会学術大会(2016年11月25・26・27, 幕張メッセ国際会議場)

[その他]

ホームページ  
<https://nara-oms.com/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

仲川 洋介 (NAKAGAWA, Yosuke)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00714875