

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03513

研究課題名(和文) ホウ素中性子捕捉療法における窒化ホウ素粒子の細胞内分布と治療効果の検証

研究課題名(英文) Intracellular distribution of boron nitride particles and therapeutic effect in boron neutron capture therapy

研究代表者

田村 磨聖 (Tamura, Masato)

大阪大学・核物理研究センター・特任講師(常勤)

研究者番号：20747109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：窒化ホウ素ナノ粒子のコーティングにより、細胞内局在の異なるBNCT用薬剤を合成し、細胞内局在、ホウ素集積量とBNCT効果を検証した。細胞内局在は、リソソームから細胞質への移動や、細胞核への分布に差が出た。ナノ粒子の粒径を変えると、粒径の増大に伴い細胞への集積量が増加した。細胞への集積量は、粒径70 nmのポリL乳酸コーティング窒化ホウ素ナノ粒子で、BNCTに最低限必要な量の180倍程度であった。小型中性子発生装置により18時間中性子を照射し、4日培養すると、約20%の細胞が死滅した。顕微鏡観察では、巨大化した細胞が多く観察され、アポトーシスと増殖死の誘発を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用した窒化ホウ素ナノ粒子は、BNCTを施すのに十分な量のホウ素を細胞内に集積させた。粒径の増大により細胞内ホウ素集積量が増加していたが、1細胞に集積するナノ粒子の数は減少している。ホウ素集積量でみると、70 nmの粒子が3万個集積するのと、500 nmの粒子が百個集積するのは同等である。ナノ粒子をホウ素供給の核とすれば、発現数が少ないタンパクを標的としたBNCT薬剤の開発に繋がり得る。一方、中性子発生量が、臨床用加速器の0.0001倍程度しかない小型中性子発生装置でBNCT効果が見られた。集積量が多いホウ素薬剤と使用すれば、高頻度な照射を必要とする基礎研究での利用を期待できる。

研究成果の概要(英文)：We synthesized boron-neutron captured therapy (BNCT) agents with different intracellular localization using boron nitride nanoparticles, and evaluated the intracellular localization, cellular boron concentrations, and BNCT effect. In terms of subcellular localization, there were differences in the lysosomal escape and the distribution to the cell nuclei. On the other hand, the cellular uptake of nanoparticles increased with increasing particle size. When poly-L-lactic acid-coated boron nitride nanoparticles with a particle size of 70 nm were used, the boron concentration in cells was approximately 180 times higher than the minimum requirement for BNCT. Under the condition, 20 % of cells died after a neutron irradiation for 18 h by using a small neutron generator and cultured for 4 days. Many large cells were observed after the neutron irradiation, which should have caused apoptosis and reproductive death.

研究分野：がん

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 BNCT 窒化ホウ素ナノ粒子 がん

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、日本が世界をリードするがんの放射線治療である。BNCTでは、細胞に集積したホウ素と、原子炉や加速器で発生した熱中性子との核反応 $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ によるアルファ線で細胞を殺傷する。主な細胞殺傷効果はアルファ線によるDNA二重鎖切断であり、細胞核周囲にホウ素が分布すると、BNCT効果を得やすいと考えられている。ホウ素薬剤の開発に寄与する知見であるものの、実験では確かめられていない。

臨床に用いられるBNCT用のホウ素薬剤は、ボロノフェニルアラニン(BPA)とメルカプトウンデカヒドロドデカボレート(BSH)の2剤が主である。種類が少ないため、BNCTの汎用性を獲得するには、新たなホウ素薬剤が必要である。ホウ素濃度が24 ppm以上となる腫瘍集積に加え、生体投与後に腫瘍内ホウ素量を測定できる薬剤が望ましい。アルファ線治療の薬剤開発に関する知見が十分ではなく、ドラッグデリバリーシステムの知見に基づく研究が多く報告されている。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、ホウ素化合物の細胞内局在とBNCT効果の関係を明らかにすることである。BPAとBSHでは細胞内局在に多様性をもたせ難いため、一定の体積および高いホウ素密度を有し、その細胞内局在がコーティングにより変化する窒化ホウ素ナノ粒子(BNP)を、本実験ではホウ素薬剤として用いる。細胞内局在が異なるBNPの開発を通して、BNPのBNCT薬剤としての性能を副次的に検証する。これらの実験により、BNCT用薬剤開発に寄与する知見の取得を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内局在の評価

細胞局在の異なるBNPの作製

ポリL乳酸(PLL)は細胞質、ポリエチレンジアミン(PEI)は細胞質と細胞核、Biocompatible anchor for cell membrane (BAM)は細胞膜への分布を意図して、BNPにコーティングした。BAMは末端に脂質オレイル基と活性エステルNHSを有するポリエチレングリコールである。BNPのサイズによって、重量あたりの表面積と粒子数が異なるため、試薬の使用量が異なる。本方法では70 nmのサイズを基準に記載した。

PLLは窒化ホウ素ナノチューブ¹、PEIは窒化ホウ素ナノ粒子²へのコーティング方法を参考にした。BNPは、6時間以上超音波処理した50 mg/mLの分散水溶液を用いた。

PLLコーティングBNP(PLL-BNP)は、BNP分散水溶液50 μL とPLL水溶液2.5 mL(1 mg/mL)を混合後、3時間以上超音波処理し、洗浄後に減圧乾燥することで得た。

PEIコーティングBNP(PEI-BNP)は、BNP分散水溶液1 mLと10%PEI水溶液1 mLを混合し、2時間以上超音波処理した後、洗浄と減圧乾燥することで得た。

BAMコーティングBNP(BAM-BNP)は、窒化ホウ素ナノ粒子に、水酸化ナトリウムによる水酸化処理³、APTESのシランカップリングによるアミノ基の修飾⁴、アミノ基と活性エステルによるBAMの修飾を順に行うことで作製した。BNP 1gを5M水酸化ナトリウム100 mLに分散し、1 w/v%溶液とした。この溶液を、100 $^{\circ}\text{C}$ で12時間反応させることでBNPを水酸化処理し、水で精製後に減圧乾燥することで水酸化BNPを得た。続いて、95%エタノール水溶液にAPTES 10.5 μL (BNPの5 w%相当)を滴下し、10分攪拌した。ここに200 mgの水酸化BNPを添加し、15分超音波処理した後、2時間65 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。自然冷却後、減圧濾過で反応溶液を除去し、数回メタノールで洗浄した。乾燥後の粉体をBAM-BNPとして用いた。

各種のコーティングを施した後、FITCにより蛍光標識した。pH9.2の炭酸バッファにコーティングしたBNPを分散し、DMSOに溶解したFITCを添加した。2時間以上攪拌し、精製後に使用した。

細胞取り込み試験

6 wellプレートに 10^5 cells/wellで細胞を播種し、一晩インキュベートした。各BNPを1時間曝露後に、PBSで5回洗浄した。水を10 mL加え、超音波で30秒ホモジナイズした後、溶液を遠心管に移し、ICP-AES(ICPS-8100)でホウ素含有量を測定した。顕微鏡観察による細胞内局在評価

ガラスボトムディッシュに、T98G細胞を 10^4 cells/cm²で播種した。細胞接着のために3時間以上培養した後、サンプルを1時間曝露した。培養液を、HBSSで希釈した染色液(表1)に置換後に15分静置し、4%PFA/PBSで細胞を10分固定した。PBSで細胞を洗浄し、PBSに浸した状態で蛍光顕微鏡(BZ-X800)により撮像した。本実験では、ミトコンドリアと細胞核、またはリソソームと細胞核をペアに共染色した。

画像解析では、ImageJによる画像の前処理後(図1)、GDSC Colocalization plugins

を使用して、曝露サンプルと細胞小器官との共局在について評価した。

表 1 細胞染色試薬

染色試薬	染色対象	希釈倍率 (x)
MitoRed (DOJINDO)	ミトコンドリア	10000
Cell navigator lysosomal staining kit (ATT Bioquest)	リソソーム	1000
Hoechst 33342 (nacalai tesque)	細胞核	5000

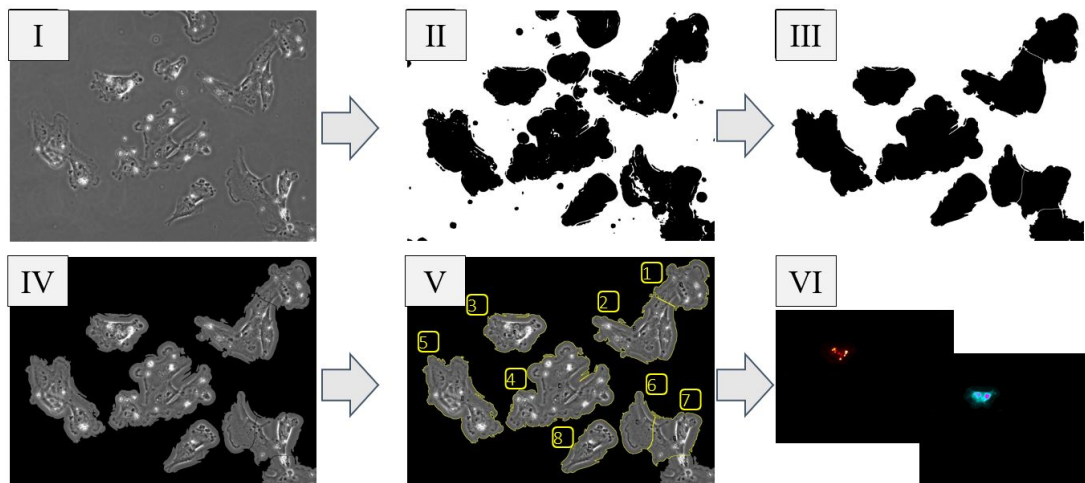


図 1 解析画像の処理。ImageJ を用い、明視野画像(I)から、画像認識で細胞領域のマスクを生成し(II)、面積を基準に不要領域を除去(III)。その後、明視野画像をマスクし(IV)、Watershed で細胞を小区画に分けた(V)。共局在テストは、各々の区画ごとに実施(VI)。

(2) 中性子照射実験

96 well プレートに 4000 cells/well で細胞を播種し、6 時間培養した。その後、PLL-BNP の含有ホウ素を基準に 0、50、100、150 ppm とした培地に置換し、一晚培養した。培地で洗浄後、HBSS を加えて、小型中性子発生装置(10^5 n/cm²/s)にて 18 時間中性子を照射した。培養培地に置換後、4 日培養し、Calcein AM と Propidium Iodide (PI)の共染色による LIVE/DEAD アッセイで細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞内局在の評価

細胞取り込み試験

粒径による細胞取り込み量の違いを 70、200、500 nm の FITC-PLL-BNP で評価した(図 2)。粒径が大きいほど検出ホウ素量が増加傾向で、100 ppm 曝露では 70 nm と 500 nm の間で有意差が見られた。70 nm の FITC-PLL-BNP を 100 ppm 曝露した条件では、BNCT に最低限必要な 24 ppm の約 180 倍に相当する 4300 ppm のホウ素が検出された。十分な量のホウ素が検出されており、BNP をホウ素供給源とする薬剤開発を期待できる。

顕微鏡観察による細胞内局在評価

リソソームとの共局在はすべてのサンプル(BAM-BNP、PEI-BNP、PLL-BNP)で見られ、エンドサイトー

シスによる細胞内移行を示唆した(図 3 左列)。PLL-BNP はミトコンドリア、細胞核のどちらにもあまり局在せず、リソソーム内に留まる割合が高い(図 3 下段)。一方、PEI-BNP はリソソームから抜け出し、細胞質に分散するとともに、一部は細胞核への移行も見られた(図 3 中段)。BAM コーティングは PEI-BNP と同様の傾向を示すものの(図

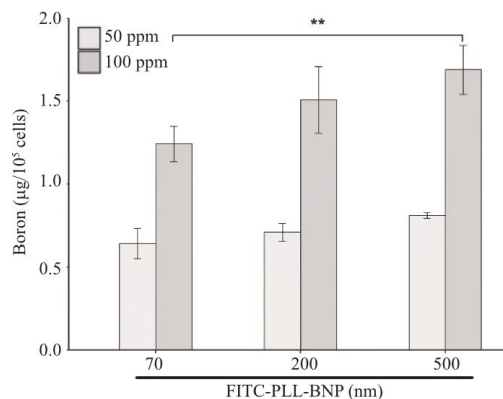


図 2 FITC-PLL-BNP の細胞取り込み試験。FITC-PLL-BNP(ホウ素含有量:50, 100 ppm)を T98G に 1 時間曝露し、ICP-AES で測定。**: p < 0.01

3 上段)、細胞膜への結合を意図する設計であるために、3 次元的な解析も要する。

(2) 中性子照射実験

本実験期間中では、PLL-BNP のみ中性子照射実験を行った。PLL-BNP 曝露量の増加により細胞死が誘発され、中性子照射でその傾向が強くなった(図 4)。小型中性子発生装置は、臨床用加速器の 10^{-4} 倍の中性子照射となる。(1)- 細胞取り込み試験の結果を基に計算すると、50 ppm の PLL-BNP 曝露によって、1 細胞あたり 10 回程度の $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ 核反応が生じたと考えられる。一般的な条件では、24 ppm のホウ素含有細胞への 60 分照射で 65 回程度の核反応が生じる計算であり、1/6 程度の核反応数が生じていたと示唆される。

顕微鏡観察では、細胞の巨大化がみられた(図 5)。アポトーシスによる細胞死では接着細胞が浮遊し、培地交換の際に除去される。しかし、放射線傷害の増殖死では、M 期をスキップした細胞周期を繰り返すため、細胞分裂はせず、細胞核の DNA 量は倍加する。結果として、細胞が巨大化する。細胞の巨大化は、細胞内タンパクの濃度低下を起し、細胞の代謝に支障をきたすことで、生存の維持が困難となる⁵。今回の実験では、アポトーシスとともに、増殖死が生じたと考えられる。

小型中性子発生装置による中性子照射では、照射細胞の全滅には至らないものの、BNCT 効果が見られた。細胞への集積量が多いホウ素薬剤であれば、小型中性子発生装置での薬剤スクリーニングや基礎研究が実現し得る。通常、加速器を用いた実験は高頻度で実験し難く、薬剤の開発に小型中性子発生装置が使える意義は大きい。今後は不実施のデータを取得し、ホウ素の細胞内局在と BNCT 効果との関係性を評価する必要がある。

【参考文献】

1. Ciofani, G. *et al.* Investigation of interactions between poly-l-lysine-coated boron nitride nanotubes and C2C12 cells: up-take, cytocompatibility, and differentiation. *Int J Nanomedicine* **5**, 285 (2010).
2. Zhang, H. *et al.* Polyethyleneimine-functionalized boron nitride nanospheres as efficient carriers for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides. *Int J Nanomedicine* **10**, 5343 (2015).
3. Song, J., Dai, Z., Li, J., Zhao, H. & Wang, L. Silane coupling agent modified BN-OH as reinforcing filler for epoxy nanocomposite. *High Perform Polym* **31**, 116–123 (2019).
4. Zhang, Y., Gao, W., Li, Y., Zhao, D. & Yin, H. Hybrid fillers of hexagonal and cubic boron nitride in epoxy composites for thermal management applications. *RSC Adv* **9**, 7388 (2019).
5. Neurohr, G. E. *et al.* Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* **176**, 1083 (2019).

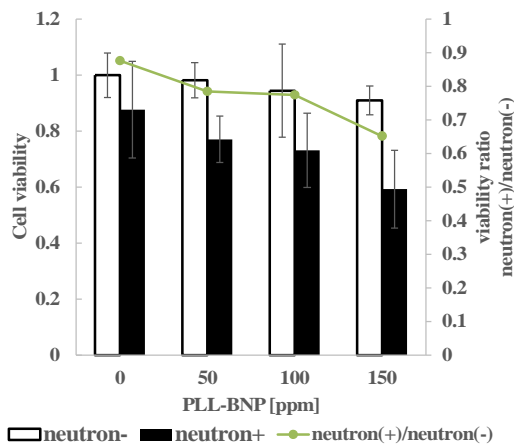


図 4 PLL-BNP 曝露による中性子照射実験。中性子を照射し、PLL-BNP 濃度が高いほど細胞死が多い。

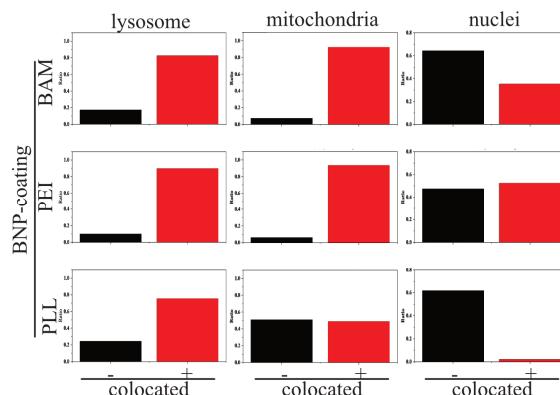


図 3 窒化ホウ素ナノ粒子と細胞内小器官との共局在。ImageJ の GDSC colocalization plugins を使用して解析。棒グラフは全解析細胞中、共局在なし (collocated -) あるいは共局在あり (collocated +) と判定された細胞の割合を表す。

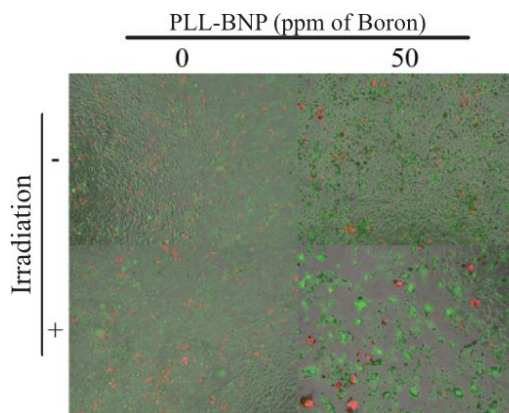


図 5 LIVE/DEAD 染色像。PLL-BNP を 50 ppm 曝露後に中性子を照射し、4 日間の培養後に撮像。緑は生細胞(Calcein-AM 染色)、赤は死細胞(PI 染色)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	渡部 直史 (Watabe Tadashi) (90648932)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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