

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09482

研究課題名(和文) 中性子捕捉療法に対するホウ素修飾アデノウイルスベクターの臨床応用へ向けて

研究課題名(英文) Clinical application of boron-conjugated adenovirus vector for neutron capture therapy

研究代表者

濱 聖司 (Hama, Seiji)

広島大学・脳・こころ・感性科学研究センター・研究員

研究者番号：40397980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、細胞選択的照射が可能な唯一の放射線治療法であり、腫瘍集積性の高いホウ素化合物の開発が重要な鍵となる。本研究は、ホウ素化合物のドラッグデリバリーシステム(DDS)としてアデノウイルスベクターを利用した上で、BNCTの治療効果を検証するものである。活性化ドデカボレート類(ADB)をアデノウイルスと化学修飾させたところ、アデノウイルスの感染効率とベクターとしての遺伝子発現効率を維持したままでADBがアデノウイルスベクター表面に結合したことが、ICP質量分析による¹⁰B定量によって確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アデノウイルスベクターの表面を感染効率と遺伝子発現効率を保ったままで化学修飾できることを示せたことは、新しいドラッグデリバリーシステムの可能性を示せた。また、本研究で用いた、ウイルス表面にADBを化学修飾した上で、感染細胞と細胞内の挙動をICP質量分析による¹⁰B定量で検討する手法は、非常に小さなウイルスの微小な挙動を正確に評価でき、未知のウイルスを研究する上でも効果的な方法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is the selective radiation therapy which can be treated only the cancer cells that have taken up ¹⁰B compounds. Therefore, the development of boron compounds with high tumor accumulation is important. In this study, we verified the therapeutic effect of BNCT by using an adenovirus vector as a drug delivery system (DDS) for boron compounds. When activated dodecaborates (ADB) were chemically modified with adenovirus, ADB was bound to the surface of the adenovirus vector while maintains both infection efficiency (as a virus) and gene expression efficiency (as vector), and this was confirmed by quantification of ¹⁰B using ICP mass spectrometry.

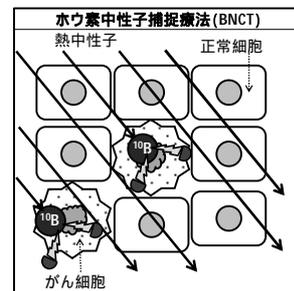
研究分野：脳神経外科学

キーワード：中性子捕捉療法 アデノウイルスベクター ホウ素修飾 悪性グリオーマ ドラッグデリバリーシステム

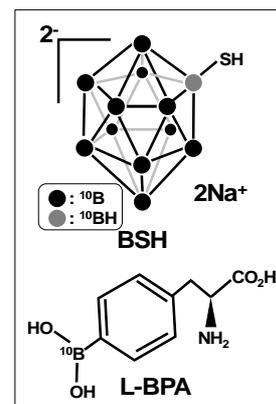
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は正常脳組織内に浸潤性に大きくなるため、手術による全摘出は困難で、現在標準治療とされる術後放射線療法を行っても再発は避けられない予後不良な疾患である。そこで、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy : BNCT) が注目されている。熱中性子は、単独では細胞を障害しないが、ホウ素の同位元素 ^{10}B に衝突すると核反応を起こす。発生した重荷電粒子は飛程が短いため、腫瘍細胞だけに ^{10}B を取り込ませれば、正常脳細胞を傷害せずに腫瘍細胞のみを殺傷することができる。



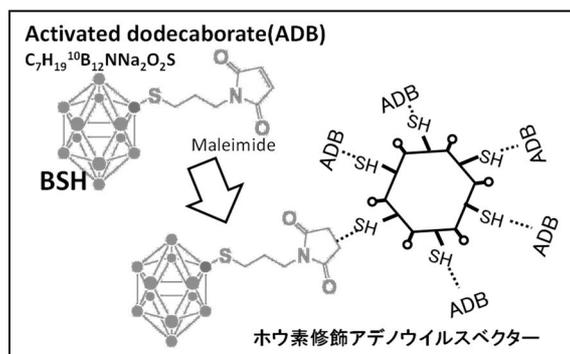
BNCT においては癌集積性の高いホウ素化合物の開発が重要な鍵となるが、現在まで臨床研究に用いられているのは BSH と BPA のみである。BSH は籠型ホウ素クラスター類で、1 分子中に 12 個ものホウ素原子が含まれるが、腫瘍には取り込まれず、脳血液関門 (BBB) も通過しない。しかし、脳腫瘍では BBB が破綻している為、正常細胞よりも腫瘍細胞の周囲に多く集積する。BPA は必須アミノ酸のチロシンにホウ素原子が結合したもので、アミノ酸取り込み能が高い癌細胞には特異的に取り込まれる。しかし、1 分子中に含まれるホウ素原子は 1 つしかなく治療時には大量の BPA (500 mg/kg 体重) を投与しなければならないため、安全性への配慮も必要である。



2. 研究の目的

BSH の様に 1 分子中に多くのホウ素原子が含まれる薬剤が、BPA の様に腫瘍選択的に癌細胞に取り込まれれば、BNCT の治療効果は飛躍的に向上する。

アデノウイルスベクターは、非分裂細胞にも極めて効率よく感染し、目的遺伝子を発現させることができる。この性質を利用し、我々は科研費の助成を受けて活性化ドデカボレート類 (ADB) を合成し、アデノウイルスに生きたままでホウ素クラスターを結合させて悪性グリオーマ培養細胞に感染させることによって、ホウ素クラスターを悪性グリオーマ細胞内に導入するという、ホウ素化合物のドラッグデリバリーシステム (DDS) としてアデノウイルスベクターを利用した、新たな BNCT 治療法の効果を検証する。



3. 研究の方法

使用する培養細胞：悪性グリオーマ培養細胞 U251MG

使用するアデノウイルスベクター：LacZ 発現アデノウイルスベクター (Ax-LacZ)

使用するホウ素化合物：活性化ドデカボレート類 (ADB)

ADB を化学修飾したアデノウイルスベクター (Ax-LacZ-ADB)

アデノウイルスベクターのホウ素修飾：悪性グリオーマ培養細胞への感染効率ならびに遺伝子発現効率を維持したままでアデノウイルスベクター表面をホウ素化合物で修飾するための条件設定を行った。そして、至適条件でホウ素化合物を修飾したアデノウイルスベクター表面に、想定通りにホウ素化合物が結合しているかどうか、そして、どの程度の量のホウ素化合物が結合しているか、について、(株)島津テクノリサーチに依頼してマイクロウェーブ分解 ICP 質量分析法にて解析した。

Ax-LacZ と Ax-lacZ-ADB を悪性グリオーマ培養細胞 U251MG 細胞に感染させ、細胞内にホウ素化合物が導入されていることを、抗アデノウイルス抗体による免疫組織染色で確認した。また、導入されたホウ素化合物の細胞内分布を検討するために、Ax-LacZ と Ax-lacZ-ADB を U251MG 細胞に感染させ、細胞分画、特に細胞核成分を分離し、細胞核内にホウ素化合物が導入されていることを、抗アデノウイルス抗体による免疫組織染色で検討した。

Ax-LacZ-ADB 感染によって U251MG 細胞内ならびに細胞核内にホウ素クラスターが導入され

ているかどうか、(株)島津テクノリサーチに依頼してマイクロウェーブ分解 ICP 質量分析法にて ^{10}B を定量的に評価して検討した。

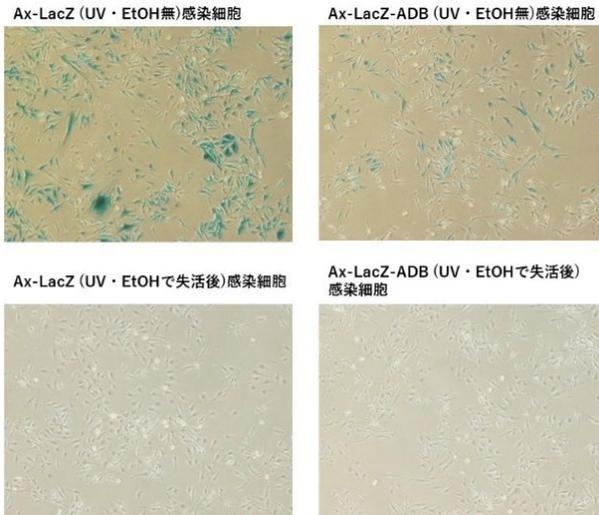
中性子照射実験：大阪大学核物理学研究所の中性子加速器を用い、ホウ素修飾アデノウイルスベクターを感染させた脳腫瘍培養細胞に中性子照射を行い、殺細胞効果が増強するかどうかについて検証する。

4. 研究成果

アデノウイルスベクターのホウ素修飾：ホウ素化合物 (ADB) で LacZ 発現アデノウイルスベクター (Ax-LacZ) 表面を化学修飾は、超遠心によって Medium 中のタンパク質などを除去した後に 37 度で 1 時間以上反応させて行った。その後、再度超遠心を行い、透析を行って余剰の ADB を除去した。出来上がった Ax-LacZ-ADB の力価を 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) 測定法によって計測した。

次に、(株)島津テクノリサーチに依頼して Ax-LacZ と Ax-LacZ-ADB のホウ素 (^{10}B) の定量を行った。具体的には、Ax-LacZ と Ax-LacZ-ADB はマイクロウェーブ試料分解装置 ETHOS-TC (マイルストーンゼネラル) を用いてマイクロウェーブ分解を行い、ICP 質量分析装置 7700x (アジレント・テクノロジー) を用いた ICP 質量分析法によって ^{10}B の定量分析を行った。その結果、Ax-LacZ-ADB は Ax-LacZ よりも $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ 比が高いことがわかり、アデノウイルスベクターの力価から計算したところ、ウイルス 1 個あたり、 ^{10}B が新たに 41 個付いた計算になり、Ax-LacZ に ADB が約 4 分子結合していると考えられた。

Ax-LacZ と Ax-LacZ-ADB の各々を U251MG 細胞に感染させた後に -Gal 染色を行ったところ、いずれの感染細胞も LacZ の発現が確認されたことから、ADB でウイルス表面を化学修飾してもアデノウイルスの感染効率と遺伝子発現効率が保たれていることが判明した。

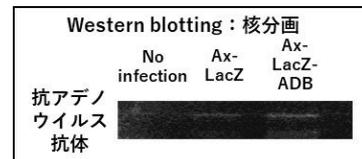
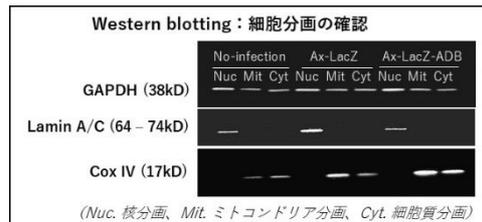


Ax-LacZ と Ax-LacZ-ADB を U251MG 細胞に感染させ、感染細胞は Atto 社製の EzSubcell Fraction を使って核、ミトコンドリア、細胞質に分画した。Western blotting 法の結果、細胞核で Lamin A/C を検出していたことから細胞核は細胞核分画に含まれていると考えられた。ただ、ミトコンドリアを示す Cox は細胞質分画にも含まれることから、ミトコンドリアの分離が不十分である可能性が考えられた。また、GAPDH が全分画で認められることから、核の分画精度が低い可能性もあった。

まずは、核分画を使って抗アデノウイルス抗体でアデノウイルスの有無をチェックしたところ、右図のように未感染細胞には認められない抗アデノウイルス抗体に対するバンドが、Ax-LacZ ならびに Ax-LacZ-ADB 感染細胞には認められることから、感染細胞の核内にアデノウイルスが含まれていることが示唆された。

薬剤の核への集積可能性を検討するために、核の分画精度を高める必要があると考えられた。そこで、OptiPrep を用いた iodixanol 勾配を利用した遠心分離によって、精度の高い細胞核の分離を行った。その際、細胞破碎がポイントになるので、専用のダウンス型ホモジナイザーを使用し、あらかじめ U251MG 細胞が破碎されて細胞核が分離される条件を決定し、氷上で各種操作を行った。そして、未感染、Ax-LacZ 感染、Ax-LacZ-ADB 感染 U251MG 細胞を、分離した核分画、ならび分画前の細胞を用意し、(株)島津テクノリサーチに依頼してマイクロウェーブ試料分解装置 ETHOS-TC (マイルストーンゼネラル) を用いてマイクロウェーブ分解を行い、ICP 質量分析装置 7700x (アジレント・テクノロジー) を用いた ICP 質量分析法によって ^{10}B の定量分析を行った。今回、細胞核分画の収率が低く、感度以下になってしまうサンプルもあったが、計測可能なサンプルからは細胞核で $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ 比の有意な上昇は確認できなかった。しかし、全細胞では Ax-LacZ-ADB 感染細胞では Ax-LacZ 感染細胞よりも $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ 比の上昇が得られ、ADB でウイルス表面を化学修飾しても細胞内に感染したことは確認できた。

U251MG 細胞に対する中性子照射実験も行った。以前の研究で、p16 遺伝子発現アデノウイルスベクターを感染させた培養細胞は、放射線感受性が上昇することを見出した。今回、BSH 併用で中性子を照射した際、p16 遺伝子をアデノウイルスで発現させることで、感受性はさらに向上するのでは? と考えて、予備的に実験を試みた。しかし、今回用いた加速器で照射した中性子のパ



ワーが不足していたことから、思ったような結果が得られなかった。現在、中性子加速器の更新作業中であり、作業が終了した時点で照射実験の再開を検討している。

《結論》

アデノウイルスベクターの表面を化学修飾して薬剤の担体として利用する手法は全く新しい試みであり、化学修飾によってアデノウイルスの表面に化合物が結合するのかどうか、そして結合したアデノウイルスベクターが細胞に感染できるかどうか（感染効率が維持されているかどうか）そしてベクターとしての遺伝子発現効率が保持されるかどうか、が最大の問題点であった。本研究を通して、

アデノウイルスベクターの表面に化学修飾ができる

アデノウイルスベクターの表面が化学修飾されても感染効率・遺伝子発現効率は維持されるということが明らかとなった。

本研究で用いた、ウイルス表面に ADB を化学修飾した上で、感染細胞と細胞内の挙動を ICP 質量分析による ^{10}B 定量で検討する手法は、 $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ 比を自然界の比と比較することで非常に小さなウイルスの微小な挙動を正確に評価できる可能性も示せた。このことは未知のウイルスを研究する上でも効果的な方法になる可能性がある。今回の研究成果については、論文文化に向けた準備を進めている。

今後、核分画の手法の問題が残るものの、ウイルス表面を化学修飾したアデノウイルスベクターの細胞内移行を探索していく予定である。

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	星 正治 (Hoshi Masaharu) (50099090)	広島大学・平和センター・名誉教授 (15401)	
研究分担者	切畑 光統 (Kirihata Mitsunori) (60128767)	大阪府立大学・研究推進機構・特認教授 (24403)	
研究分担者	栗栖 薫 (Kaoru Kurisu) (70201473)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	
研究分担者	青木 一教 (Aoki Kazunori) (60270675)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	
研究分担者	遠藤 暁 (Endo Satoru) (90243609)	広島大学・先進理工系科学研究科(工)・教授 (15401)	
研究分担者	黒澤 真城 (Kurosawa Maki) (10462681)	大阪大学・核物理研究センター・特任講師(常勤) (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	服部 能英 (Hattori Yoshihide) (50514460)	大阪府立大学・研究推進機構・特認講師 (24403)	
研究分担者	齋藤 太一 (Saito Taiichi) (40457247)	広島大学・医系科学研究科(医)・研究員 (15401)	

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