

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659944

研究課題名（和文）ソノポレーションを併用したホウ素中性子捕捉療法

研究課題名（英文）Boron neutron capture therapy in combination with sonoporation

研究代表者

由良 義明 (YURA YOSHIAKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00136277

研究成果の概要（和文）：ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) ではホウ素化合物としてパラボロノフェニルアラニン (BPA) とボロカプテイト (BSH) が使用される。本研究では音響穿孔法 (ソノポレーション) を用いて細胞膜に一過性の小孔を形成し、これらホウ素化合物の腫瘍細胞内濃度の向上をめざした。ヒト口腔扁平上皮癌の培養細胞ならびにヌードマウス腫瘍において、ソノポレーションで腫瘍細胞のホウ素濃度は上昇し、その後の中性子照射すなわちBNCTで、腫瘍細胞の増殖阻害が顕著となった。ソノポレーションはBNCTの抗腫瘍効果を増強する上で有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Boron neutron capture therapy (BNCT) is a selective radiotherapy, using  $^{10}\text{B}$  compounds such as boronophenylalanine (BPA) and boronocaptate sodium (BSH). Sonoporation that enables extracellular materials to enter into cells was used to increase intratumoral  $^{10}\text{B}$  concentration. In oral squamous cell carcinoma (SCC) cells and tumors in nude mice, the  $^{10}\text{B}$  concentration was increased by sonoporation and tumor growth was suppressed remarkably. This suggests that sonoporation enhances the efficiency of BPA-mediated BNCT for oral SCC.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌・中性子・ホウ素化合物・超音波照射・マイクロバブル

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy: BNCT) は悪性腫瘍に対する新規の放射線治療で、ホウ素 ( $^{10}\text{B}$ ) を取り込ませた腫瘍に中性子線を照射して、飛程距

離が極めて短い高エネルギー放射線である  $\alpha$  粒子と Li 反跳核を発生され、腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。BNCT は十分な安全域をもって切除することが困難な脳腫瘍を対象として発展してきたが、当教室で

は他に先駆けて BNCT を進展した頭頸部腫瘍に導入し、顕著な治療効果を明らかにしている。現在癌治療で使用できるホウ素化合物は、フェニールアラニンにホウ素原子 1 個を結合させたパラボノフェニールアラニン(BPA)と 12 個を結合したボロカプテイト(BSH)である。アミノ酸アナログである BPA は増殖性を示す腫瘍細胞には取り込まれるが、細胞周期からはずれて G0 期にある Q cell(静止細胞)では取り込みが期待できない。BSH はホウ素原子を多く含有するが能動的な腫瘍細胞への取り込みはない。

ソノポレーションは低出力の超音波を照射することで生じるジェット流で細胞膜に一過性の小孔を形成する技術である。マイクロバブルが存在すると超音波照射でバブルの崩壊をきたし、ソノポレーションの効率が格段に向上することが知られている。低侵襲であるため薬物や遺伝子を細胞内へ移行させるデリバリーシステムとして期待されている。BNCT とソノポレーションを併用した研究の報告はない。

## 2. 研究の目的

BNCT ではホウ素化合物をいかにしてより多く腫瘍細胞内に集積させるかが課題となる。本研究は超音波で細胞膜に一過性の小孔を形成し細胞外の物質を低侵襲で細胞内に導入するソノポレーション技術を用いて、ホウ素化合物の腫瘍への集積を高め、BNCT の治療効果を向上させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ホウ素濃度の測定：細胞として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 SAS を用いた。細胞の培養液に BPA あるいは BSH を 50 ppm の濃度で添加し、一定時間巡回培養し、経時的に細胞を採取して inductively coupled plasma-mass

spectrometry (ICP-MS) を用いて細胞内のホウ素濃度を測定した。腫瘍形成には 5 週齢の Balb/c メスヌードマウスの後足大腿部皮下に SAS 細胞を接種し、腫瘍径が 5 mm に達した時点で実験に用いた。腫瘍を形成したマウスの腹腔内に BPA あるいは BSH を投与し、経時的に腫瘍を採取して、ICP-MS を用いてホウ素濃度を測定した。

超音波照射：超音波遺伝子導入装置としてソニトロン 2000V、マイクロバブルとして AS0100 を用いた。In vitro では、マイクロバブルを添加して細胞を培養したのち、超音波照射を行った。In vivo の担癌マウス系では、マウスの腹腔に BPA 250 mg/kg, BSH 75 mg/kg を投与し、2 時間後にマイクロバブルを腫瘍内に注入し、その後超音波遺伝子導入装置のトランスデューサーを腫瘍に接触させ、超音波照射を行った。超音波照射条件は、1 MHz、1 W/cm<sup>2</sup>、duty cycle 20%、10 sec とした。

BNCT と細胞傷害性：京都大学原子炉実験所の原子炉から発生する熱中性子線を使用して中性子照射を行った。培養細胞ではマイクロバブルを加えて超音波照射を行い、続いて腫瘍細胞への中性子線を照射した。細胞生存率は BNCT を行った細胞を 7 日間培養し、形成されるコロニー数から算出した。細胞増殖能は MTT assay にて測定した。担癌マウスに対しては、腹腔内にホウ素化合物を投与したのち、2 時間後にマイクロバブルを腫瘍内に投与し、超音波を照射した。その後、中性子照射を行い、BNCT の効果を腫瘍体積、生存期間で測定した。

腫瘍組織の病理組織学的観察：BNCT による腫瘍の組織変化につき、熱中性子照射後、経時的に腫瘍を採取し、HE 染色標本を作成して組織像を観察した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞 SAS におけるソノポレーションによるホウ素濃度の変化

懸濁液にBPAあるいはBSHを添加して培養し、細胞内ホウ素濃度を測定した結果、細胞内のホウ素濃度はBSHでは3 ppmの低いレベルであったが、BPAでは次第に上昇し、2時間で15 ppmとなった。ホウ素化合物を含む培養液で2時間培養したのち、マイクロバブル(MB)存在あるいは非存在下に超音波照射(US)を行った。実験群として非処理対照群、MB群、US群、MB+US群を設定した。BPA、BHSのいずれにおいても、MB+US群で、ホウ素濃度はそれぞれ、対照の1.6、3.5倍にまで上昇した(図1)。

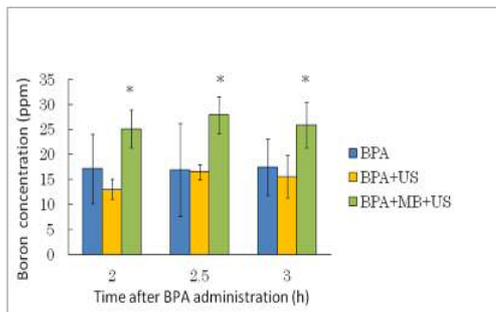


図1 ソノポレーションによるヒト口腔扁平上皮癌細胞へのBPA取り込みの増加

##### 2) 培養SAS細胞に対するBNCTの効果

非処理対照群、中性子(N)群、MB+US+N群を設定した。MTT assayならびにコロニー形成法を行ったところ、いずれのホウ素化合物でも細胞増殖はMB+US+N群で最も強く抑制された。MTT assay の場合、BPA使用のN群とMB+US+N群との間で有意差を認めた。したがって、ソノポレーションは細胞内のBPA濃度を上昇させ、BNCTの抗腫瘍効果を増強するものと考えられた。

##### 3) ノードマウス腫瘍におけるホウ素濃度の変化

SAS細胞の担癌ノードマウスの腹腔内にホウ素化合物を投与し、2時間後に腫瘍に対して

超音波照射を行った。ノードマウス腫瘍への超音波照射はすべてマイクロバブル存在下で行うこととした。そのため、in vivo系ではMB+USを略号Sとして表現した。腫瘍内ホウ素濃度を測定したところ、BPA、BSHのいずれの場合もソノポレーションを行ったBPA+S群、BSH+S群で上昇がみられた。次にBPAあるいはBSH投与後にソノポレーション、中性子照射を行う実験を行った。これらを組み合わせた実験群は、N群、BPA+N群、BPA+S+N群、BSH+N群、BSH+S+N群となり、腫瘍内ホウ素濃度を元に計算した各群の腫瘍における物理線量は、それぞれ4.59、8.15、8.98、4.96、5.76 Gyであった。

##### 4) 抗腫瘍効果

BPA+N群ではN群と比較して腫瘍増加は抑制されたが、腫瘍の退縮には至らなかった。しかしながら、ソノポレーションを併用したBPA+S+N群では、腫瘍は顕著に縮小した(図2)。BSH+S+N群では明らかな効果は見られなかった。生存期間において、BPA+S+N群で延長がみられ、他の実験群との間で有意差を認めた。したがって、ソノポレーションは腫瘍内のBPA濃度を上昇させ、BNCTの抗腫瘍効果を増強するものと考えられた。

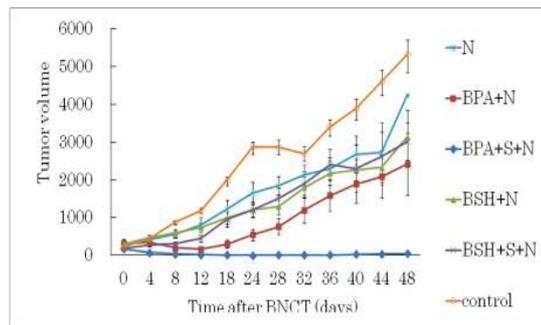


図2 ソノポレーションを併用したBNCTがノードマウス腫瘍に及ぼす影響

##### 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. Yura Y, Fujita Y: Boron neutron capture therapy as a novel modality of radiotherapy for oral cancer: Oral Science International 10; 9-14, 2013.
2. Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y: Sequence of a fusogenic herpes simplex virus RH2 for oncolytic virotherapy. Journal of General Virology 94:726-737, 2013.
3. 若林 健、濱田正和、竹下彰範、飯井孝年、奥長秀介、岩井聡一、由良義明: PKC alpha阻害剤safingolによる細胞死におけるミトコンドリア分裂の関与. 口腔組織培養学会誌 21; 13-14, 2012.
4. Fujita Y, Yamamoto N, Kato I, Iwai S, Ono K, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y: Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy. International Journal of Radiation Biology 87;293-301, 2011.
5. Shintani M, Takahashi G, Hamada M, Okunaga S, Iwai S, Yura Y: Effect of ultrasound on herpes simplex virus infection in cell culture. Virology Journal 8; 446, 2011.
6. 山本直典、加藤逸郎、藤田祐生、今井智章、中澤光博、岩井聡一、由良義明: 超音波がヒト口腔扁平上皮癌細胞へのホウ素化合物取り込みに及ぼす影響. 口腔組織培養学会誌 20; 33-34, 2011.
7. 岩井聡一、米川敦子、原田知恵、濱田正和、片桐 渉、中澤光博、由良義明: 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能と遊走能におけるWnt-beta-catenin経路の関与. 日本口腔外科学会雑誌 57; 533-541, 2011.

〔学会発表〕（計6件）

1. Hamada M, Wakabayashi K, Iwai S, Yonekawa A, Yura Y: Involvement of reactive oxygen species in endonuclease G-mediated death of oral squamous cell carcinoma cells by PKC inhibitor safingol. 第71回日本癌学会学術集会、2012.9.20. ロイトン札幌（札幌市）
2. 山本直典、今井智章、加藤逸郎、岩上隆紀、中澤光博、由良義明: ホウ素中性子捕捉療法に対するソノポレーションの併用効果. 第43回日本口腔外科学会近畿地方会、2012.6.23. 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
3. 奥長秀介、飯井孝年、高橋 元、新谷素子、竹下彰範、岩井聡一、由良義明: 口腔癌のヘルペスウイルス療法に対するソノポレーション条件の検討. 第69回NP0法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.18. 広島国際会議場（広島市）
4. 山本直典、加藤逸郎、藤田祐生、由良義明: ソノポレーションが口腔扁平上皮癌に対するBNCTに及ぼす影響. 平成23年度京都大学原子炉実験所専門研究会 2012.2.18. 京大原子炉実験所（大阪府熊取町）
5. 濱田正和、岩井聡一、米川敦子、森田祥弘、由良義明: 口腔扁平上皮癌に対するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤とプロテインキナーゼ阻害剤の併用効果の検討. 第70回日本癌学会学術総会 2011.10.3. 名古屋国際会議場（名古屋市）
6. 山本直典、藤田祐生、加藤逸郎、中澤光博、岩井聡一、由良義明: 口腔扁平上皮癌細胞における中性子捕捉療法に対するソノポレーションの影響の検討. 第35回

日本頭頸部癌学会 2011. 6. 10. ウィンク  
あいち (名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由良 義明 (YURA YOSHIAKI)  
大阪大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：00136277