

[H30-2]

血液関門細胞における薬剤輸送、ホウ素中性子捕捉療法及び放射線による抗癌剤標的療法への大気マイクロPIXE分析の応用”

Application of PIXE Analysis for Three Biological Researches: Drug Transport in Microvascular Endothelial Cells, Boron analysis for neutron capture therapy, and Targeted Anticancer Drug Delivery Directed by Radiation.

原田 聡^{#A)}, 櫻井 映子^{B)}, 中井 啓^{C)},
Satoshi Harada^{#,A)}, Eiko Sakurai^{B)}, Kei Nakai^{C)}

^{A)}Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Radiology

^{B)}Iwaki Meisei University, School of Pharmacology

^{C)}University of Tsukuba, School of Medicine, Department of Radiation Oncology.

Abstract

With the aim of improving radiotherapy, the micro particle-induced X-ray emission (PIXE) camera has been used to study: 1) interaction of trace elements with microvascular endothelial cells during drug transport; 2) localization of 4-10B-Borono-2-18F-fluoro-L-phenylalanine (f-BPA) in rat C6 glioma and human glioma U251 cells in vitro during boron neutron capture therapy (BNCT); and 3) targeted delivery of carboplatin using particles that release their contents upon radiation.

To study the interaction of trace elements with microvascular endothelial cells during drug transport, the kinetics of Mg, Al, Fe, Mn, Zn, Cu, and Ni in microvascular endothelial cells in the brains of rats under nicotine stimulation were observed using the micro PIXE camera. The kinetics of Fe, Ni, Cu, Zn, and Mn were increased by nicotine stimulation; consequently, a potential role of these trace elements in the induction of super oxide dismutase (SOD) was considered.

To investigate the localization of f-BPA, extracellular and intracellular distributions of f-BPA were compared in rat C6 glioma and human glioma U251 cells. Extracellular f-BPA was assessed by imaging boron distribution using PIXE and particle-induced gamma-ray emission. Intracellular f-BPA was measured using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. As a result, localization of f-BPA was found to be limited to the extracellular region. A new technique is required to study the transport of f-BPA from the extracellular to intracellular space in glioma cells.

To study the targeted delivery of carboplatin, particles were prepared by polymerizing hyaluronic acid and protamine electrostatically. These particles were subcutaneously injected around the MM48 tumor in the left hind leg of C3He/N mice. Subsequently, 10 or 20 Gy of 100-keV X-ray was irradiated. Using the micro PIXE camera, the targeted delivery of carboplatin was studied by imaging the release of platinum (contained in carboplatin) from the particles upon radiation. The frequency of carboplatin-releasing particles was expressed as a mean percentage of platinum-releasing particles in 10 views of the micro PIXE camera within 12×12 μm. As a result, more than 70% of the particles were found to release carboplatin upon radiation. In combination with the radiation, the released carboplatin attacked the tumor. Although there was no increase in the antitumor effect, a reduction in adverse effect was observed. Investigation of methods to increase the antitumor effect of these particles in combination with radiation is underway. I

In conclusion, the findings of these three studies may lead to improved cancer treatment.

Keyword: Pharmaceutical transport, Microvascular endothelial cells, 4-10B-Borono-2-18F-fluoro-L-phenylalanine (f-BPA), Boron neutron capture therapy (BNCT), Microcapsule, Drug delivery systems, radiation

1. はじめに

1.1 研究の概要

抗化学療法、およびホウ素中性子捕捉療法は、抗癌剤、あるいはホウ素が毛細血管血液関門を通過後

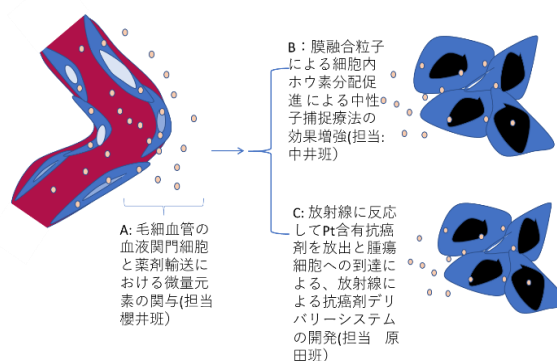


Figure 1

[H30-2]

(Figure 1 A)、腫瘍に作用する事で抗腫瘍効果を発揮する (Figure 1 B、C)。本実験では、癌化学療法、およびホウ素中性子捕捉療法の増強を目的に、以下の研究を施行している。すなわち、① 毛細血管の血液関門細胞と薬剤輸送 (Figure 1 A、櫻井班)、② 細胞膜融合粒子による細胞内ホウ素分配促進 (Figure 1 B、中井班) ③ 放射線に反応して抗癌剤を放出する particle を用いた放射線による抗癌剤デリバリーシステム (Figure 1 C、原田班) の 3 項目である。

1.2 各班の研究目的

① 毛細血管の血液関門細胞と薬剤輸送 (担当: 櫻井班) (Figure 1 A)

薬剤が吸収される際、毛細血管内の血液関門細胞を通過する必要があるが^[1]、通過に際し、微量元素の関与が知られている。本項目では、血管関門細胞の薬剤通過と微量元素の関与を研究する事により、微量元素を用いた、薬剤の血管関門細胞通過促進を目的とする。

② 細胞内ホウ素分配促進 による中性子捕捉療法の効果増強(担当: 中井班) (Figure 1 B) :

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、治療段階に至っている。加速器中性子線源の利用が確立した現在、新規ホウ素化合物の合成、評価が次の課題として挙げられる。しかし、現在の臨床条件でホウ素が腫瘍細胞内、腫瘍血管、間質などでどのような分布、経時変化を取るのか、詳細には検討されていない。本班の研究では、Micro-PIXE /PIGE camera を使用し、微小環境におけるホウ素分布および動態を解明し、BNCT の線量評価、臨床効果のための放射線生物学的裏付けを研究する^[2]。

③ 放射線に反応して Pt 含有抗癌剤を放出と腫瘍細胞への到達による、放射線による抗癌剤デリバリーシステムの開発(担当: 原田班) :

放射線に反応して抗癌剤を放出する Particle を作成し、同 Particle を腫瘍周囲に、経静脈的、あるいは皮下注射により配置する。それら Particle に放射線を照射し、Particle から抗癌剤を放出させる。放出された抗癌剤と放射線との相乗効果により、抗腫瘍効果増強を図り、Particle による薬剤限局化作用により抗癌剤の副作用の減少を図る^[3]。

2. 各班における研究方法と現時点での研究成果 :

2.1 ①毛細血管の血液関門細胞と薬剤輸送 (担当: 櫻井班) :

2.1.1 材料と方法 :

3 週令の SD ラットと C57BL/6 マウスを日本 SLC 株式会社から購入し Magee らの方法を応用して、ラット脳より脳微小血管内皮細胞 (BMECs) を採取した。細胞は、DMEM/F-12 でコラーゲンコートした培養フ

ラスコを使用して、CO₂ インキュベーター内で培養し、実験使用時まで液体窒素内で冷凍保存し、実験用の細胞とした。

実験時は、凍結保存した細胞を解凍後、コラーゲンコートした PIXE 分析用膜上に DMEM/F-12 で培養した。PIXE 分析用膜上で細胞に 0.2 μM のニコチンを 5 分間作用させた後、凍結乾燥を施行、高崎量子応用研究所で元素分析を行った。

2.1.2 結果、および考察 :

ラット由来の細胞を用いた Micro PIXE 分析を Figure 2 1 2 1 に示す。脳微小血管内皮細胞 (BMECs) に微量元素が検出され、ニコチン刺激によりスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の構成元素がマウ

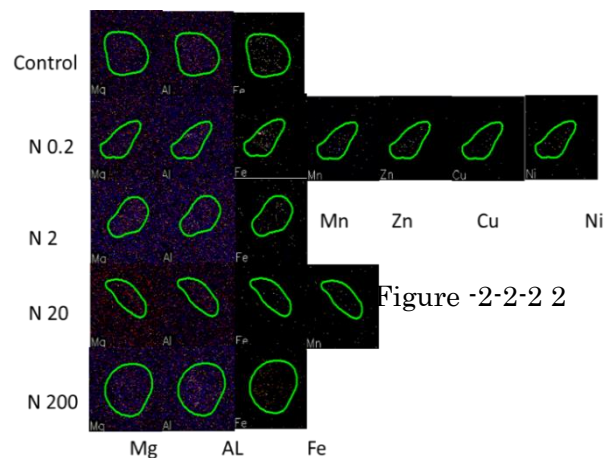


Figure -2-2-2 2

ス由来細胞でも増強することが観察された。これらより、ニコチンの刺激で、脳血液関門で活性酸素が発生している可能性が示唆された。

Figure-2-1-2 1

2.2 ② 細胞内ホウ素分配促進 による中性子捕捉療法の効果増強(担当: 中井班) :

2.2.1 材料、および方法 (Figure 2 2 1 1)

アクリル製円筒容器 (底無し) を、Poly-lysine coating を施した 5μm Δ polycarbonate 膜上に静置し、培養容器とする (Figure 2 2 1)。本容器を使用し、C6 rat glioma、あるいは U251 human glioma を PBS/MEM 中で培養することにより、5μm Δ polycarbonate 膜上に定着後、f-BPA 160-800 μgB/mL を 2 時間作用させる。作用後、PBS/MEM で洗浄し、凍結真空乾燥を施した後、polycarbonate 膜を切り出し、micro PIXE camera のターゲットホルダー上にマウントして、micro PIXE camera の検体とし、微量元素分析を施行した。

[H30-2]

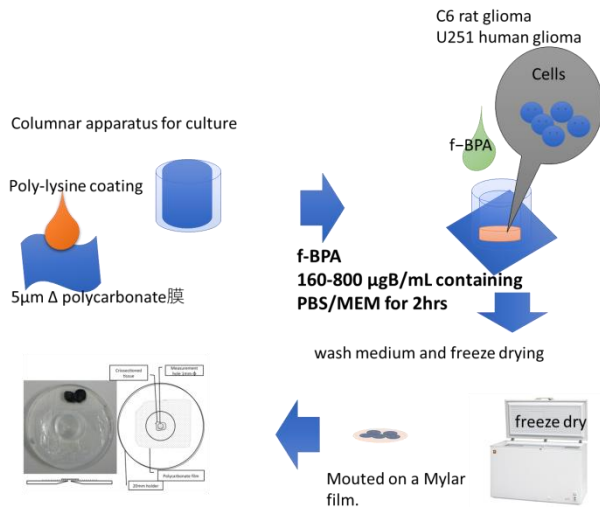


Figure -2-2 1-1

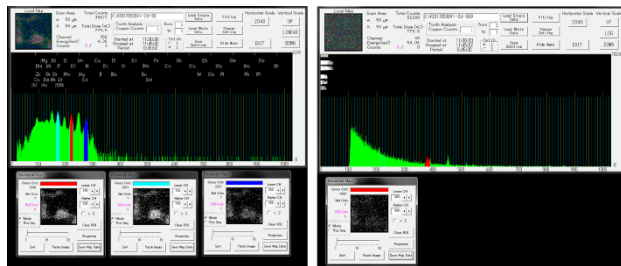


Figure -2-2-2 1

2.2.2 結果

U251 human glioma に、800µgB/mL の f-BPA を 2 時間作用させた後、PIXE および PIGE 分析を施行しところ、細胞の形状と B の分布が一致した。(Figure 2 2 2 1)

次に、検出された B が細胞内にあるか細胞外にあるかを検索するため、ICP-AES によってホウ素濃度を細胞回収後、洗浄の有無を除き、同一条件で測定した。培地を洗浄することによってホウ素濃度は減じた。(Figure 2 2 2 2)

よって 800 µgB/mL , 2hr exposure. の条件で見えていたホウ素は、細胞内よりは、細胞周囲に存在しているものと推察される。したがって、臨床結果との乖離は、組織間質、血管でのホウ素動態の寄与によるものと推測された。

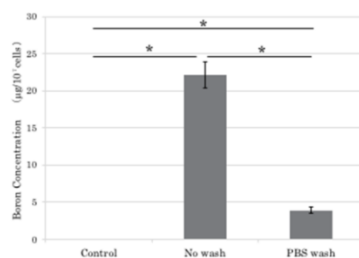


Figure -2-2-2 2

2.3 ③ 放射線に反応して Pt 含有抗癌剤を放出と腫瘍細胞への到達による、放射線による抗癌剤デリバリーシステムの開発(担当 原田班) :

2.3.1 材料と方法

2. 3. 1.1 パーティクル精製 : 1.6 mg プロタミン と 1.28 mg ヒアルロン酸を 2.0 ml のカルボプラチン溶液 (1mg/ml) に混和後、30 分間室温で静置し、カルボプラチンを含むヒアルロン酸-プロタミンパーティクルを析出させた。同 Particle 溶液 1 ml を Coatsome EL-010 (日油) のバイアルに注入、攪拌後、30 分室温で静置する事で、Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルを作成した。(Figure2. 3. 1 1)

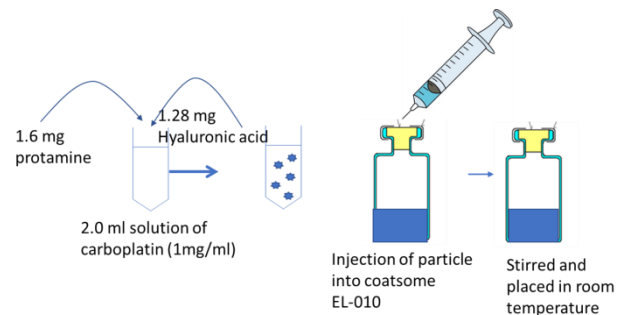


Figure 2 3 1 1

2. 3. 1. 2 パーティクル径測定 : 同パーティクル浮遊液をターゲットホルダーのマイラー膜上に滴下、凍結真空乾燥した Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル 100 個を micro PIXE camera で観察し、その平均系で表した。

2. 3. 1. 3 破裂率測定 : 生理的食塩水 2 ml に浮遊させた同パーティクル (1 X 10¹⁰ 個) を径 25 mm のシャーレに浮遊させ、140 KeV X 線を 10、または 20 Gy 照射直後、ターゲットホルダーのマイラー膜上に滴下、凍結真空乾燥した Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルに含まれたカルボプラチン (Pt) を micro PIXE camera で画像化する事により行った。破裂は、Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルの輪郭不整とカルボプラチン (Pt) の放出が認められたものを破裂したパーティクルと判断し、破裂率は micro PIXE camera の 12 X 12 µm の視野 10 コマにおける、平均破裂率で表した。

2. 3. 1. 4 腫瘍処置、抗腫瘍効果測定、副作用評価 : C3He/N マウス (日本クレア、6 週令♂) の左下腿に移植した乳がん腫瘍 (MM48) 表面に Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル 1 X 10¹⁰ 個を注入し、その 2 時間後に 140 KeV X 線を 10、または 20 Gy 照射することにより施行した。抗腫瘍効果は、処置後、毎日腫瘍径を測定する事で評価し、副作用の程度は処置 21 日後の左腎の重量減少により計測した。

2.3.2 結果

2. 3. 2. 1. : micro PIXE camera によるパーティクル観察と破裂率 : micro PIXE camera を使用した Pt 画像によるパーティクルを Figure 2. 3. 2. 1、A、B に示す。

[H30-2]

照射前、被包化パーティクルは 長径 $5.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 大の類円形を呈し、中心部には Pt の high point が認められた (Figure 2. 3. 2. 1, A)。放射線照射後、パーティクルの辺は不整となり、中心部の P high point は消失、パーティクル周囲には微小な Pt が多数観測された (Figure 2. 3. 2. 1, B)。この様な形態変化を呈したパーティクルを破裂したパーティクルとみなし、その発生率を照射線量別に観察した。結果、破裂率は照射線量率に増加した (Figure 2. 3. 2. 1, C)。

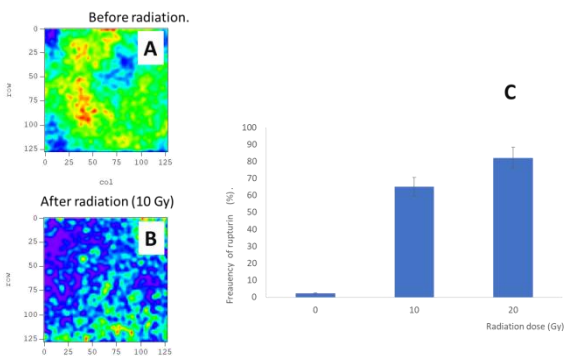


Figure 2 3 2 1

腫瘍効果: 140 KeV X 線 10、または 20 Gy とパーティクルによる抗腫瘍効果を Figure 2. 3. 2. 2 に示す。10 Gy, 20 Gy いずれの線量においても、放射線とカルボプラチンの相乗効果による抗腫瘍効果増強が見られたが、Lipid 封入やヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化しなかったカルボプラチンと放射線併用群、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化のみを施行したカルボプラチンと放射線の併用群、Lipid 封入とヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化を施行したカルボプラチンと放射線の併用群間に有意な抗腫瘍効果の差は認められなかった。

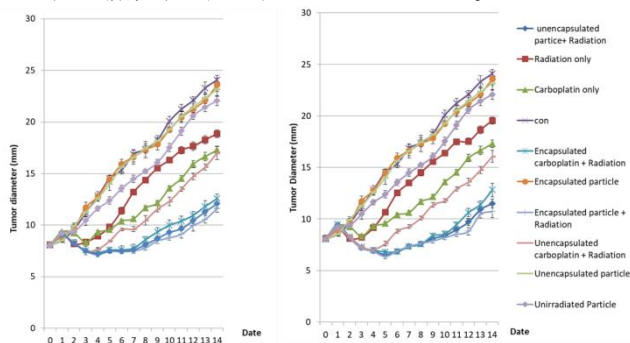


Figure 2 3 2 2

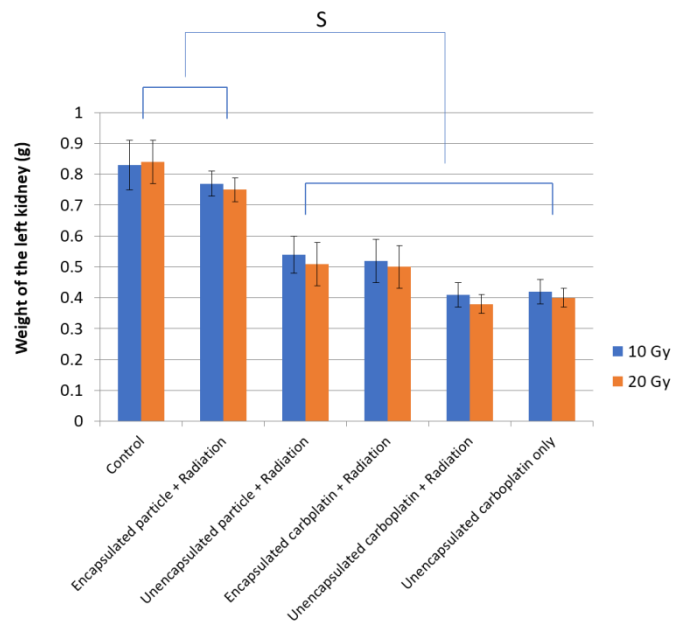


Figure 2 3 2 3

2. 3. 2. 3 副作用軽減作用: カルボプラチンの副作用によって生じた処置 21 日後の左腎の重量減少を Figure 2 3 2 3 に示す。Lipid 封入やヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化しなかったカルボプラチンと放射線併用群、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化のみを施行したカルボプラチンと放射線の併用群では有意に左腎重量が減少し、副作用が認められたが、Lipid 封入とヒアルロン酸-プロタミンパーティクル化を施行したカルボプラチンと放射線の併用群では有意な左腎重量の減少は認められず、Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルによる副作用軽減が観察された。

4. 総括、および今後の展望

櫻井班の研究により、毛細血管の血液関門細部における薬剤輸送において、微量元素の関与が示唆された。これにより、微量元素を用いた血液関門細胞の薬剤輸送増加が期待できる。中井班では、f-BPA のホウ素が細胞外に局限していることが明らかになった。ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)による癌治療効果増強には、ホウ素の細胞内導入が必要不可欠なことから、ホウ素を細胞内に導入するという新たな課題が明らかとなった。原田班では、放射線による抗癌剤標的化を施行し、抗癌剤局限化作用による副作用軽減に成功したものの、抗腫瘍効果増強までには至っていない。今後、パーティクルの素材改良、パーティクル径の調整による、標的化抗癌剤の増量の必要性が考えられた。

[H30-2]

参考文献

- [1] Sakurai E, et al., Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) Protein Expression and Its Activity in Rat Brain Microvascular Endothelial Cells., Pharmacology & Pharmacy, 4, pp.1-6 2013.
- [2] E Sato, et.al. Radiobiological response of U251MG, CHO-K1 and V79 cell lines to accelerator-based boron neutron capture therapy..J Radiat Res, 59(2), pp.101-107, 2018.
- [3] S Harada, et. al. Targeted concurrent chemoradiotherapy, by using improved microcapsules that release carboplatin in response to radiation,improves detectability by computed tomography as well as antitumor activity while reducing adverse effect in vivo Biomed. & Phalmacother, 70, P 196-205 2015