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),佐藤 隆博 D)
Satoshi Harada #.A), Eiko Sakurai B), Kei Nakai C), Takahiro Satoh D)
A) Department of Radiology, School of Medicine, Iwate Medical University,
B) School of Pharmacology, Iwaki Meisei University.
C) Department of Radiation Oncology, School of Medicine, University of Tsukuba.
D) Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology.

Abstract

With the aim of improving radiotherapy, a micro-particle-induced X-ray emission (micro-PIXE) camera has been used to study the following: 1) the interaction of trace elements with brain microvascular endothelial cells (BMECs) during drug transport, in association with chlorpheniramine (CP), fexofenadine (Fex), nicotine (N), and/or antihistamine (HA); 2) the utility of a micro-PIXE camera in 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 BMECs during drug transport, the kinetics of Mg, Al, Fe, Mn, Zn, Cu, and Ni in BMECs of rats administered CP, Fex, N, and/or HA were observed using a micro-PIXE camera. Nicotine stimulation increased the kinetics of Fe, Ni, Cu, Zn, and Mn. Fex seemed to increase nicotine intake in BMECs in the presence of Zn and S.

To investigate the utility of the micro-PIXE camera in BNCT, imaging of intracellular and extracellular borocaptate sodium (BSH) in rat C6 and human U251 glioma cells was tested in vitro. Micro-PIXE imaging was performed by imaging the 2.124 MeV characteristic X-ray of B^{10} using a NaI detector system. This micro-PIXE system did not have sufficient sensitivity to detect B^{10} ; therefore, the system was optimized by changing the NaI detector to a HPGe detector. To study the targeted delivery of carboplatin, the nanoparticles were prepared by spraying a mixture of hyaluronic acid and alginate supplemented with carboplatin into a solution of $CaCl_2$ and $FeCl_2$ through a 0.8- μ m pore stainless mesh filter. The nanoparticles (1 × 10¹⁰) were injected intravenously and irradiated (100 keV soft X-ray, 10–40 Gy) when the accumulation of particles peaked. The nanoparticles accumulated around the tumors, with maximum accumulation observed 9 h after injection. Subsequently, 10–40 Gy of radiation was administered. The accumulated nanoparticles released carboplatin, and their outer shells gelatinized, which prolonged the intratumoral localization of carboplatin and increased the antitumor effect via a synergistic effect with radiation. The localization of carboplatin by nanoparticles significantly reduced the adverse effects of the anticancer drug.

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 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

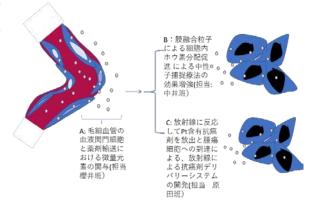


Figure 1

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。以下に、各班の2019年度における研究目的を記す。

尚、2019年8月より、櫻井班のプロジェクトが櫻井映子トロント留学のため、中止となったため、①の櫻井班に関しては、2019年度達成分の報告となる。

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)

微小血管内皮細胞は、栄養素や生体に必要な物質などを選択的に血管内に取り込む役割を持っている。 生態の生命維持に関係ない物質にとっては、他取れ それが治療目的の薬剤であっても、最初の関門となって、排除する機能を有している。

脳には脳毛細血管内皮細胞 (Brain Blood Barrier 略して BBB と呼ばれる)があり、血液脳関門の機能の役割を担っている輸送たんぱく等についての報告はあるが、それらが機能するための微量元素の存在は不明である。

2019 年度は、BBB を通過しやすい薬物と通過しにくい薬物を加えた時に微量元素の動態を明らかにすることを目的とした。[1]

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、2020 年 6 月より、 頭頚部がんで保険収載となり、一般治療への歩みを 始めたところである。加速器中性子線源が確立し、 新規ホウ素化合物の実用化が次世代 BNCT の課題で ある。しかし、現在の臨床条件におけるホウ素化合 物ですら、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 同 時測定によって、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、放出された抗癌剤と放射線の相乗作用による抗腫瘍効果増強、および Particle による薬剤原曲化作用による抗癌剤副作用軽減を研究して来た。

2018 年度までには、Particle の径が 23μm と大きく、 腫瘍周囲に直接注入する事ができたものの、経静脈 的に注入すると、肺、脳、腎に Particle が塞栓を形成 し、肺梗塞、脳梗塞、腎梗塞を起こしていた。

2019 年度は、経静脈投与時のこれら障害を無くすと同時に、血管内皮の結合が粗雑な腫瘍血管から主要組織への促進の移行を促進する目的で、Particle の微細化を行い、経静脈的に Particle を注入、抗腫瘍効果増強と、抗癌剤副作用軽減を検討した。[3,4]

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:

脳微小血管内皮細胞採取:

3週令のC57BL/6マウスを日本SLC株式会社から購入した。Magee らの方法を応用して、マウス血液関門細胞より採取した。 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、使用まで液体窒素内で冷凍保存した。

脳微小血管内皮細胞に対する、クロルフェニラミン:CP、フェキソフェナジン:Fex の影響:

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 ニコチンまたは薬物 (クロルフェニラミン:CP、フェキソフェナジン:Fex)または両方を作用して凍結乾燥後、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:

主要血管における血液関門細胞の微量元素の有無と、 微量元素と薬剤輸送動態との関連:

血液関門細胞にニコチン 0.2, 2, 20, 200 μg をそれぞれ 5 分間作用させた micro PIXE 画像を Fig. 2.1.2.1 に、フェキソフェナジン FEX:クロルフェニラミン: CP, ニコチン: N を作用させた時の各微量元素動態を Fig. 2.1.2.2 に示す。

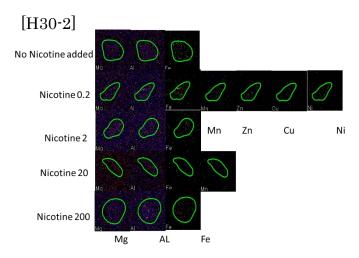


Fig. 2.1.2.1.

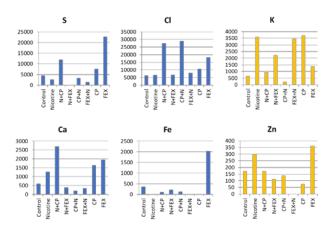


Fig. 2.1.2.2

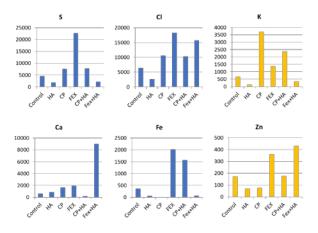


Fig. 2.1.2.3.

脳 微 小 血 管 内 皮 細 胞 (Brain microvascular endothelial cells: BMECs)に微量金属元素が検出された。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。(Fig. 2.1.2.1.)フェキソフェナジンと Zn と S により、ニコチンは Zn と Zn と Zn により、ニコチンは Zn に Zn

抗ヒスタミン剤 (HA) の脳血管関門通過に対する フェキソフェナジン FEX:クロルフェニラミン: CP の影響を Fig. 2.1.2.3 に示す。

HAはBBBを通過しにくいと言われていたが、今回BBBへの取り込みが少ないことが明らかとなった。BBBを通過しやすいCPの併用では、HAはBBBに取り込まれ易くなっている可能性が、Fexの併用では、SがHAの併用により下がっていることからHAのBBBの取り込みがさらに阻止されている可能性が示唆された。

2.22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

 5μ m 厚の polycarbonate 膜上で細胞培養する専用容器を開発し利用している。また、薄膜上での細胞付着性向上のため、ポリリジン・コラーゲンコートを行っている。CT26 murine colon cancer、U251 human glioma を 膜 上 で 培 養 し 、 ホ ウ 素 化 合 物 boronophenylalanine(BPA) も し く は borocaptate Sodium(BSH) 800 μ gB/mLを 2 時間暴露させる。作用後、PBS/MEM で洗浄、凍結真空乾燥処理後、micro PIXE/PIGE の同時測定検体とし、微量元素分析を施行した。

今回は検出器として Nal 検出器の利用を試みるため

Natural boron 由来 BPA を利用した検体も作成し、NaI 検出器によって、2.124MeV のホウ素由来ガンマ線の検出可否を検討した。その際には、加速器を3MeV 運転とし、ゲルマニウム半導体検出器にかえて、NaI シンチレーションスペクトロメーターを設置し、同位元素が天然存在比のホウ素化合物を用いて、計測を行った。。

U251 human glioma に、800ugB/mL の f-BPA/BSH を 2 時間作用させた後、PIXE/PIGE 分析を施行したところ、細胞の形状と B の分布がおおよそ一致する条件も見出すことができた。(BSH、無洗浄で凍結乾燥)細胞の存在についてリン、硫黄の元素位置画像を計算によって可視化し、ホウ素存在位置に重ね合わせて可読性の高い画像を取得した。(Figure 2.2.2.1)

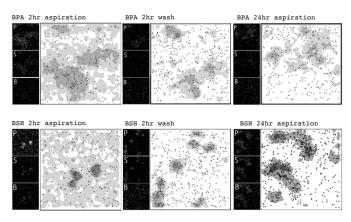


Fig. 2.2.2.1

NaI 検出器によるホウ素検出は、ホウ素窒素固体サンプルではピークが検出され、全体のカウントに対するホウ素カウントで推測すると、HPGe については 634/5845 (10.8%)、一方で NaI においては、965/5860 (16.5%)と検出可能性が期待された。しかし、この試料は天然組成ホウ素であり、B10 は含有率約20%であるため実際には HPGe のほうが約3倍検出効率がよい。実際に行われた細胞検体では天然組成ホウ素を用いてもピークはわずかにしか確認できず、多元素が混入する生体試料における S/N 比の不足が考えられた(Figure 2.2.2.2)

したがって現状のシステムでは、NaI 検出器を用いた、BNCT 条件での試料については、ホウ素分布検出は不適と考えられた。

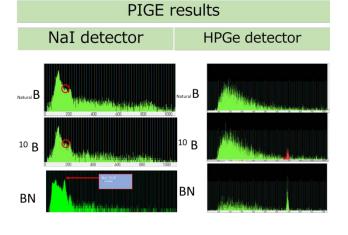


Fig. 2.2.2.2

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:

10ml の 0.2% (weight/volume) アルギン酸, 0.1% ヒアルロン酸混合溶液に and 10 mg carboplatin を混和した後、 超音波破砕装置 (Branson SONIFIIER 150、出力 9 ワット)を用いて、径 0.8 μm 孔のステンレスメッシュフィルターを介して、0.3 mMol/l の CaCl₂と FeCl₂に噴霧した。

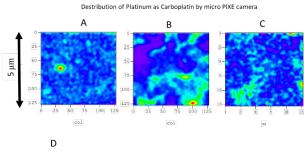
2.3.1.2パーティクル径測定: 同パーティクル浮遊液をターゲットホールダーのマイラー膜上に滴下、凍結真空乾燥した Lipid 封入型ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル 100 個を micro PIXE camera で観察し、その平均径で表した。

2.3.1.3 担癌モデル作成とパーティクル注入、および放射線照射:

C3He/N マウス (6 週令、 $\stackrel{?}{\circ}$) に、マウス乳がん細胞 MM46 1×10^6 個を注入し、径 8 mm 大となった時点で実験に使用した。作成したパーティクル 1×10^{10} 個を生理的食塩水 0.1 ml に浮遊させ、担癌マウス尾静脈から注入、注入後、腫瘍へのパーティクル集積が最大となった時点で、100 KeV 軟 X-線を、10、20、30 あるいは 40 Gy を照射した。

2.3.1.4. 静脈注入後の組織剖出;放射線照射 1,3,6,9,12 24 時間後に、CO₂ チェンパーを使用して、マウスを安楽死させた直後に、肺、脳、腎肝臓、脾臓、腫瘍を剖出し、-20℃で組織を保存した。

2.3.1.5. micro PIXE camera のターゲット作成、および。 上記組織を凍結したまま、マイクロトームを用いて、 厚さ 3 μ m に薄切後、1 μ m 厚のマイラー膜上に静置 し、1 × 10⁻³ Torr の真空度で凍結真空乾燥後、 micro PIXE camera のターゲットとした。各組織から、 5 つのターゲットを作成し、これを 8 匹のマウスに 関して行った。Micro PIXE camera は各々のターゲットに、3 MeV proton beam(径 2 μ m)を照射し、発生 した特性 X 線画像を画像化する事で行った。(Fig. 2.3.1.1 A, B, C)



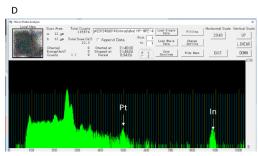


Fig. 2.3.1.1

2.3.16 破裂率測定: Micro PIXE camera を用いて、剖出した組織切片用検体中の Pt (カルボプラチンに含まれる元素) 分布を 5×5 μm の範囲で画像化する事でパーティクルを観察後、それらの形態を I から III の 3 つのタイプに分類した。タイプ I (Fig. 2.3.1.6 A): 表面が滑らかで、中心部に Pt の高集積が観察されるもの。タイプ II (Fig. 2.3.1.6 B): Particle の形態が不整で、周囲に Pt の放出が見られるもの、タイプ III: パーテイクルの形態が観察されず、周囲に放出された Pt(Fig. 2.3.1.6 C) の分布が認められるもの。これら I~III の内、タイプ II と III を破裂したパーティクルとみなした。破裂率は 5×5 μm の 10 視野中の破裂したパーティクルの平均百分率で表した。

2.3.1.7 抗腫瘍効果測定、副作用評価: C3He/N マ抗腫瘍効果は、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 日後のマウス死亡、体重減少、体毛の毛羽立ちによって評価した。抗腫瘍効果測定、副作用測定とも、各処置群に関して、8匹のマウスを使用した。

<u>2.3.1.7 統計計算:</u> ANOVA (analysis of variance) により分析を行い、P < 0.05 を有意差ありと判定した。

2.3.2 結果

2.3.2.1.: micro PIXE camera によるパーティクル観察とその破裂率: micro PIXE camera を使用した Pt 画像によるパーティクルを、前途の如く、Figure 2.3.1.6 A, B, Cに示す。 照射前、パーティクルの殆どはタイプ I(Fig. 2.3.1.6 A) であり、その長径 は547 ±0.3 nm 大であった。 照射後、パーティクル表面は不整となり、中心部の Pt 集積が不明瞭化し、破裂した、タイプ II, III (Fig. 2.3.1.6 B, C) の割合が線量依存性に増加し、最大は 40 Gy 照射時の 67%であった。 (Fig. 2.3.2.1)

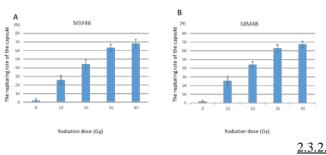


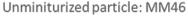
Fig. 2.3.2.1

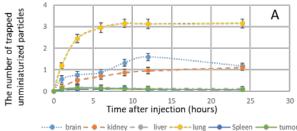
2. 2. /° —

ティクルの体内動態: 静脈注射後における、パーティクルの体内動態を、肺、脳、腎肝臓、脾臓、腫瘍中の経時的パーティクル数の変化を、微細化していないパーティクル(Fig. 2.3.2.2 A)と微細化したパーティクル(Fig. 2.3.2.2 B) に分けて比較した。

微細化前のパーティクル(径 23 μm 前後)では、腫瘍組織よりも、脳、腎肝臓、脾臓へのパーティクル集積が有意に高く、最大の集積は肺組織への集積であった。(Fig. 2.3.2.2 A)反面、微細化後では腫瘍へのパーティクル集積が、脳、腎肝臓、脾臓有意に高

く、その経時的最大値はパーティクル静脈注射後 9 時間後に観測された。 (Fig. 2.3.2.2 B)





Miniturized particle: MM46

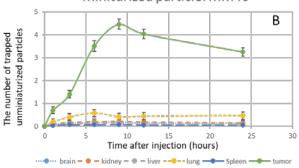


Fig. 2.3.2.2

2.3.2.3 放射線照射と抗腫瘍効果 (Fig. 2.3.2.3): 微細化されたパーティクルの集積が、静脈注射 9 時間後に認められたため、パーティクル静脈注射 9 時間後に、腫瘍に対して、 $100~{\rm KeV}~{\rm X}$ 線、10,20,30,あるいは $40~{\rm Gy}$ を照射して、抗腫瘍効果を測定した。

非パーティクル化したカルボプラチンの抗腫瘍効果 (●)は、放射線照射単独 (●、10,20,30,あるいは 40 Gy のいずれも)よりも抗腫瘍効果が強く、放射線とカルボプラチン併用では、パーティクル化したカルボプラチン(●)とパーティクル化したカルボプラチン(●)のいずれにおいても、カルボプラチン単独よりも強い抗腫瘍効果が生じた。パーティクル化しなかったカルボプラチンとパーティクル化したカルボプラチン間の比較においては、パーティクル化したカルボプラチン(●)の方が、パーティクル化しなかったカルボプラチン(●)よりも長期に抗腫瘍効果が持続し、放射線照射3日後で、パーティクル化した抗腫瘍効果が、パーティクル化しなかった抗腫瘍効果が、パーティクル化しなかった抗腫瘍効果が、パーティクル化しなかった抗腫瘍効果よりも有意に強く作用した。

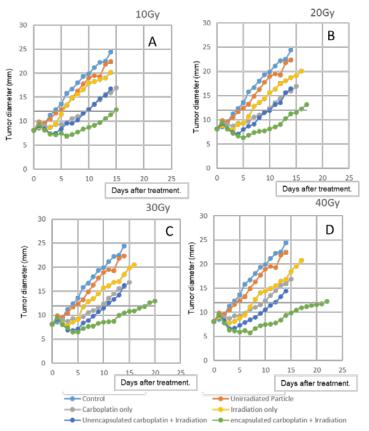


Fig. 2. 3. 2. 3

2.3.2.4 パーティクル化による抗癌剤副作用軽減。

副作用の強さを、マウス死亡、体重減少、体毛の毛羽立ちを表したマウスの数で示す。各項目ともにパーティクル化による副作用軽減が観察され、特に、カルボプラチン投与によるマウス死亡に関しては、パーティクル化されいないカルボプラチン投与群の死亡が、2.6 匹~4 匹だったのに対して、パーティクル化されたカルボプラチンを投与された群に関しては、いずれも0であった

	MM46 tumor		
	body weight loss	fuzzy hair	dead
10 Gy	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0
20 Gy	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
30 Gy	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0
40 Gy	1.6±0.6	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
Unencapsulated carboplatin only	3.6±0.2	4.2±0.2	2.6±0.4
10Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.2 ± 0.5
20Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.5
30Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.4 ± 0.2	5.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
40Gy + Unencapsulated Carboplatin	4.8±0.2	5.0±0.0	4.0 ± 0.3
Encapsulated Carboplatin	0.0±0.0	0.6±0.2	0.0±0.0
10 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0
20 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0
30 Gy + Encapsulated Carboplatin	1.8 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
40 Gy + Encapsulated Carboplatin	2.2 ± 0.5	3.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0

Table-1

3. 総括、および今後の展望

櫻井班より、BBB (脳血管関門)において、Fex (フェキソフェナジン) と Zn と S により、N(ニコチン) は BBB へ取り込みが阻止されている可能性が見出された。

HA(抗ヒスタミン剤)はBBBへの取り込みが少なかったが、BBBを通過しやすい CP(クロルフェニラミン)の併用では、HAはBBBに取り込まれ易くなっている可能性が、Fexの併用では、Sが HAの併用 HAのBBBの取り込みがさらに阻止されている可能性が示唆された。これより、BBBにおける薬剤通過と微量元素との関連がさらに明らかにされ、薬剤の脳への効率的な輸送が期待できる。

中井班では、現状のシステムでは、BNCT(ホウ素中性子捕捉療法)条件での資料に関しては、方お分布検討が不適である事が明らかにされ、今後、装置の適正化による micro PIXE camera の BNCT 資料測定の必要性が示唆された。

原田班では、放射線によってカルボプラチンを放出するパーティクルの微細化に成功し、静脈注射時、腫瘍組織への集積が観測され、腫瘍に放射線を照射するとカルボプラチンが腫瘍に集中する事が観測された、さらに、放射線とカルボプラチンとの相乗効果により抗腫瘍効果が増強し、パーテイクルによるカルボプラチン限局化作用により、カルボプラチン副作用軽減に成功した。今後、放出される薬剤を、抗癌剤から免疫療法剤に幅を広げて、放射線治療の範囲を照射部位のみから、免疫系を介した、照射部位以外へのがん治療(abscopal effect)に発展させるつもりである。

本研究プロジェクトは、micro PIXE camera を用いた薬剤動態観察により、micro PIXE camera の医学利用を目的としている。BNCT への応用に関しては、micro PIXE camera 装置の適正化が求められているが、本装置の成熟化に繋がると考えられる。

本プロジェクトはおおむね、micro PIXE camera の医学利用にむけて前進していると考えられる。

4. 追記:

原田班の成果の詳細は、Radiat. Res. 193, P 263-273 2020. [4]にて発表した。原田班の研究の一部には、文部科学省科学研究費基盤研究 C No. 17K16489 (原田 聡)を使用した。

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

[4] Takafumi Segawa, Satoshi Harada, Takahiro Sato, and Shigeru Ehara, Delivery and Effectiveness of Carboplatin via Targeted Delivery Compared to Passive Accumulation of Intravenously Injected Particles Releasing, Carboplatin upon Irradiation. Radiat. Res. 193, P 263–273 2020.