

[2023105105]

中性子ラジオグラフィーを用いたボロンデリバリーシステムの癌集積性の解析

Analysis of Boron Accumulation in Cancer Tissues by Boron Delivery System using

Neutron Capture Autoradiography

柳衛宏宣 ^{#A)B)C)}, Xuan Hou ^{A)}, 柳川将志 ^{D)}, 松川岳久 ^{E)}, 久保田章乃 ^{E)}, 島添健次 ^{A)F)}, 梨本正之 ^{C)},
山内治雄 ^{B)G)}, 小野 稔 ^{B)G)}, 杉原多公通 ^{C)}, 高橋浩之 ^{A)B)F)}
Hironobu Yanagie ^{#A)B)C)}, Xuan Hou ^{A)}, Masashi Yanagawa ^{D)}, Takehisa Matsukawa ^{E)}, Ayano Kubota ^{E)},
Kenji Shimazoe ^{A)F)}, Masayuki Nashimoto ^{C)}, Haruo Yamauchi ^{B)G)}, Minoru Ono ^{B)G)}, Takumichi Sugihara ^{C)},
and Hiroyuki Takahashi ^{A)B)F)}

^{A)} Institute of Engineering Innovation, School of Engineering, The University of Tokyo,

^{B)} Cooperative Unit of Medicine and Engineering, The University of Tokyo Hospital,

^{C)} Research Institute of Healthy Living, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences,

^{D)} ER Hachioji Advanced Animal Medical and Clinical Care Center,

^{E)} Dept of Hygiene, Faculty of Medicine, Juntendo University,

^{F)} Dept. of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo,

^{G)} Dept. of Cardiovascular Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, JAPAN

Abstract

The selective accumulation of ^{10}B atoms is necessary to achieve effective optimum cancer cells killing without affecting adjacent healthy cells on boron neutron capture therapy (BNCT).

In this study, we performed neutron capture autoradiography to the sliced tumor tissues after intra-tumoral injection of ^{10}B SH / hyaluronic acid / protamine-mixed with cationic liposome (^{10}B oro-plex) as neutron capture therapy agent by in vivo experiment on AsPC-1 human pancreatic tumor-bearing mice. We also use electroporation combined cationic liposome as a method for selective delivery of compound into the cells by open the membrane pores electroporatively in the field of gene therapy and chemotherapy. We performed neutron capture autoradiography (NCAR) of ^{10}B biodistribution in sections of subcutaneous pancreatic tumor samples of AsPC-1 tumor bearing mice using CR-39 (polyallyldiglycol carbonate) plastic track detectors using NaOH / PEW etching method. The images using NCAR of AsPC-1 subcutaneous tumors in mice after injection of ^{10}B SH Boro-plex have shown selective accumulation of ^{10}B atoms in AsPC-1 tumor.

Keyword: Boron Neutron Capture Therapy, Neutron Capture Autoradiography, CR39, ^{10}B oro-plex, Pancreatic Cancer

1. はじめに

1.1 中性子捕捉療法

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) では、ホウ素は熱中性子と反応し、飛程 $10\ \mu\text{m}$ の高 LET アルファ粒子とリチウム粒子によって細胞障害効果を示す。我々は、進行癌・再発癌に対する治療法として中性子捕捉療法の可能性を検討するために基礎的研究を行っている [1 - 7]。消化器癌においては肝臓癌や膵臓癌、および炎症性乳癌等に対して、集学的治療のひとつとして中性子捕捉療法を応用できるべく、基礎的研究や臨床研究を進展させていくことを目標としている。

中性子捕捉療法を効果的なものにするためには、ボロン化合物を選択的に腫瘍に集積させることが必要である。

1.2 ボロンデリバリーシステムについて

効果的な BNCT のためには、ホウ素原子を腫瘍組織に高濃度で選択的に蓄積させることが必要である。 ^{10}B SH 化合物 (Borono-dodecaborate) ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$; ^{10}B SH) は癌細胞の細胞質および核内に保持することが難しいため、機能的な送達システムを開発する必要がある。我々は、毒性の少ない新規ボロン化合物を開発するとともに、臨床応用の可能なボロンデリバリーシステムの開発も行っていく。

Lipo-plex (DNA-カチオン性リポソーム複合体) は、遺伝子治療のための潜在的な非ウイルスベクターとして考えられている。我々は、新しいタイプのプラスミド DNA-カチオン性リポソーム複合体、いわゆる Q plex (Quaternary Poly-plex; 四重複合体) を開発した。Q plex は、鉄飽和ヒトトランスフェリンをカチオン性リポソームと、プロタミンで凝縮した DNA 複合体と順次混合し、リポソーム-プラスミド複合体を形

[2023105105]

成することで調製できる。Q plex を用いることにより、トランスフェリンおよびプロタミンでの pDNA の凝縮が血清存在下での遺伝子導入発現を強化することを示唆できた [8]。また、エレクトロポレーション (Electroporation: EP) は、遺伝子治療および化学療法の分野において、化合物を細胞に選択的に送達するために細胞膜の孔を電氣的に開く方法である [9, 10]。

本研究では、AsPC-1 ヒト膵腫瘍を有するマウスを用いた *in vivo* 実験において、 $^{10}\text{Boro-plex}$ ($^{10}\text{Boron}$ / ヒアルロン酸 / プロタミン-カチオン性リポソーム混合物) の腫瘍内注射と EP を評価した。

1.3 中性子ラジオグラフィーについて

ボロンデリバリーシステムの開発のために、 ^{10}B 原子の腫瘍内局在を可視化する方法として、中性子ラジオグラフィーを応用している [11 - 14]。

今回、我々は、JRR3 における熱中性子照射を用いて、中性子ラジオグラフィーを行い、ボロンデリバリーシステムの腫瘍内集積性のイメージングを検討したので報告する。

2. 方法

2.1 中性子捕捉剤混和複合体腫瘍内投与法と EP 併用法:

中性子捕捉療法の治療効果増強を目指して、遺伝子デリバリーに用いられている陽荷電リポソームに ^{10}B 化合物を混和し複合体($^{10}\text{Boro-plex}$)を形成させ、腫瘍内投与法を用いた ^{10}B 原子の腫瘍滞留を形成し、熱中性子照射による抗腫瘍効果を確認してきた。我々は、更なる治療増強効果を目指して、同じく遺伝子デリバリーに用いられる EP の手技を併用して、中性子捕捉療法における抗腫瘍効果の増強を確認した。

$^{10}\text{Boro-plex}$ は、1.5mL の ^{10}BSH (^{10}B :23809 ppm)、10mg/mL ヒアルロン酸ナトリウム溶液 0.3mL、および 20mg/mL プロタミン 0.15mL を室温で 30 分間混和静置して混合し、これらの混合溶液をカチオン性リポソーム Lipofectamine 3000 (0.15mL + 反応溶液 0.15mL) に注ぐことで調製した。

ヒト膵臓癌細胞株 AsPC-1(5×10^5)をヌードマウス右下腿皮下に移植し腫瘍モデルを作成し、 $^{10}\text{Boro-plex}$ 0.2mL を腫瘍内投与し、EP を行った。細胞を短い高電圧パルスで EP すると、細胞膜が一時的に透過性を持つようになる。そのため、 $^{10}\text{Boro-plex}$ 複合体を腫瘍内注射した後に EP を行うことで、癌細胞周囲の ^{10}B 原子が癌細胞質に送達される可能性がある。EP は、ネッパジーン株式会社製 NEPA21 遺伝子導入装置を用い、腫瘍内局注針を保持したまま体表電極 (CUY650PP7 電極) で腫瘍を挟み、3 回連続し

て通電した。2 時間後に、マウスを犠牲死させ、腫瘍組織を摘出し、凍結固定した。

2.2 中性子ラジオグラフィー

① ボロンデリバリーシステムを投与した AsPC-1 皮下腫瘍モデルにおいては、 $^{10}\text{Boro-plex}$ を、腫瘍内投与後に、経時的に腫瘍組織を摘出し、ドライアイス下の冷アセトン+ノルマルヘキサンを用いて OCT コンパウンドに凍結固定させ、マイクローム切断により腫瘍薄片 (40 μm 厚) を作成した。

② 作成した薄片 (40 μm 厚) を CR-39 に密着させ、JRR 3 にて熱中性子を照射した (熱中性子フルーエンス: $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$)。さらに、冷中性子を照射した (冷中性子フルーエンス: $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$)。

③ 熱中性子照射後に、NaOH にてエッチングを施行した。さらに、PEW65 溶液 (15 wt% KOH + 65wt% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ + 20wt% H_2O) で CR-39 をエッチングすることにより陽子飛跡を縮退させ、 α 粒子や ^7Li 粒子の飛跡のみによる NCAR 像を形成させ、既知の ^{10}B 濃度より検量線を作成し、サンプルの Etch Pit 数より、 ^{10}B 濃度を推定した。

3. 結果と考察

3.1 $^{10}\text{Boro-plex}$ 腫瘍内投与法によるイメージング: 熱中性子 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ および冷中性子 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ 照射において、NaOH 及び PEW 液のエッチングにより、腫瘍内への ^{10}B の集積を確認できた。腫瘍内への局所注射法であり、 ^{10}B 濃度の不均一性は認めるものの、全体に ^{10}B 原子の取り込みを認めた。

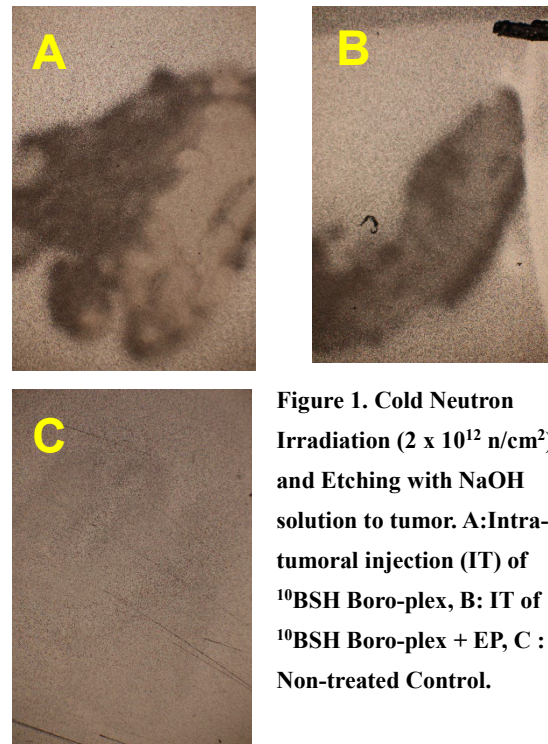


Figure 1. Cold Neutron Irradiation ($2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$) and Etching with NaOH solution to tumor. A: Intra-tumoral injection (IT) of $^{10}\text{BSH Boro-plex}$, B: IT of $^{10}\text{BSH Boro-plex} + \text{EP}$, C: Non-treated Control.

[2023105105]

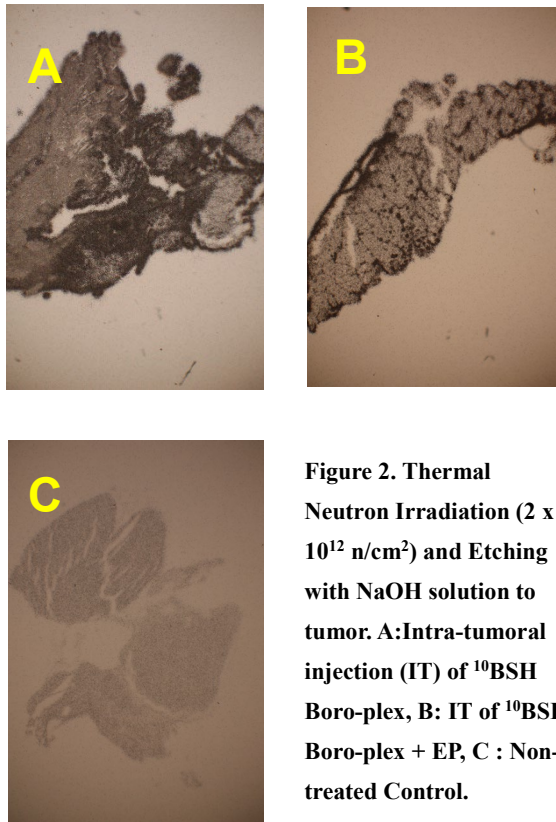


Figure 2. Thermal Neutron Irradiation ($2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$) and Etching with NaOH solution to tumor. A: Intra-tumoral injection (IT) of ^{10}BSH Boro-plex, B: IT of ^{10}BSH Boro-plex + EP, C : Non-treated Control.

3.2 エッチピット数計測による ^{10}B 濃度推定 :
熱中性子 $2 \times 10^{10} \text{ n/cm}^2$ 照射において、既知 ^{10}BSH : 50ppm (^{10}B 原子濃度 : 28.6 ppm)、500ppm (^{10}B 原子濃度 : 285.7 ppm) の溶液をひたした乾燥ろ紙を照射した。このろ紙のエッチピット数 (4 回計測) し、 ^{10}B 濃度依存性の Etch Pit 数より、検量線を導き出し、 $^{10}\text{Boro-plex}$ 局所注射部位のエッチピット数をカウントし、腫瘍内 ^{10}B 濃度を推定した。

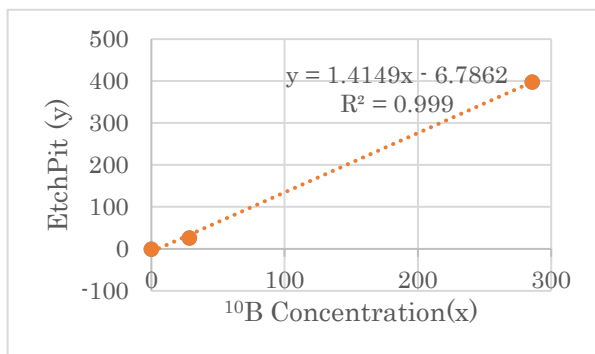


Figure 3. Calibration curve of ^{10}B concentration and Number of Etch Pits of $^{10}\text{Boron}$ samples.

$^{10}\text{Boro-plex}$ (^{10}BSH)における ^{10}B 濃度は、 $164.4 \pm 31.1 \text{ ppm}$ であり、有効 BNCT 棒度である 20 ppm を満たしていることが判明した。

今回、PEW 溶液を用いてエッチングすることによ

り、recoiled proton の pit を縮退させ得るため、 ^{10}B 原子の濃度依存的に、NCAR のイメージを作成し、Etch Pit 数より、 ^{10}B 濃度を推定することができた。

中性子照射の $^{10}\text{Boro-plex}$ (^{10}BSH) + EP 群において、非照射グループと比較して腫瘍増殖抑制効果を見出せた。BNCT 後の体重減少はほとんど観察されなかったため、このシステムの全身毒性は低いと考えられる。 $^{10}\text{Boro-plex}$ のトランスフェクション機構は、それぞれエンドサイトーシス効果と考えられています。EP は、遺伝子や化合物を癌細胞の細胞質に送達する割合を高めるのに非常に効果的です。腫瘍内直接注入による ^{10}B の濃度の異質性は非常に簡単であるため、遺伝子送達システムと EP の方法との組み合わせは、 ^{10}B 化合物を癌細胞に蓄積させるのに効果的であると考えられる。すなわち、熱中性子照射後、我々は $^{10}\text{Boro-plex}$ 混和複合体の腫瘍局所における ^{10}B 原子の滞留性を高め、熱中性子照射により腫瘍増殖抑制効果を確認できた。さらに、EP を併用することで、腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた。今後さらに、臨床応用されている Electro-chemotherapy のデバイスを参考に、EP のデバイス開発を検討していきたい (論文準備中)。

4. 結語

ヒト膵臓癌 AsPC-1 皮下腫瘍モデルに対して、 $^{10}\text{Boro-plex}$ 複合体の腫瘍内投与群、及び EP 併用群において、 ^{10}B 原子の腫瘍内集積性を、NCAR を用いて確認できた。今後、腫瘍組織・癌細胞内への ^{10}B 原子デリバリーにおいて、内封型ボロン脂質組み込みリポソームの開発を進めたい。NCAR を用いることにより、 ^{10}B 原子の腫瘍内集積性の確認と腫瘍内 ^{10}B 有効濃度の測定を行うことにより、新規 Boron DDS の NCT の適応拡大に貢献したいと考えている。

参考文献

- [1] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., Br. J: Cancer 3 (4): 522 - 526, 1991
- [2] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., Br. J: Cancer 75: 660 -665, 1997.
- [3] H. Yanagie, K. Maruyama, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Biomed. Pharmacother. 60(1), 43-50, 2006
- [4] K. Maruyama, H. Yanagie et al., J Control Release. 98(2), 195-207, 2004
- [5] H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Br J Radiol. 90(1074): 20170004. doi: 10.1259/bjr.20170004, 2017
- [6] O Ishida, K Maruyama, H Yanagie, et al, Jpn J Cancer Res, 91(1):118-26, 2000.
- [7] H. Yanagie, M. Yanagawa, H. Takahashi et al, In Vivo. 35(6): 3125-3135, 2021
- [8] Y. Sekine, K. Maruyama, H. Yanagie, et al, Progress in Drug Delivery System IX, 23-30, 2000
- [9] Lambrecht L, et al.: Expert Opin Drug Deliv (2016) 13(2):295-310.
- [10] Trotovsšek B, et al.: World J Gastroenterol (2021)27(48): 8216-8226.
- [11] H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Nucl. Instr. & Method A 424(1), 122- 128, 1999
- [12] K. Ogura, H. Yanagie, H. Kobayashi et al., Radiat Meas. 34, 555-558, 2001

[2023105105]

- [13] J. Skvarc, H. Yanagie et al., Cell Mol Biol Lett. 7(1),
162-4, 2002
- [14] H. Kobayashi K. Ogura, H. Yanagie et al., Appl Radiat Isot.
61(4), 573-8, 2004