

[2024105107]

## 中性子ラジオグラフィーを用いたボロン癌細胞内集積性の検索

### Analysis of Boron Accumulation in Cancer Cells using Neutron Capture Autoradiography

柳衛宏宣<sup>#,A)B)C)</sup>, 栗田圭輔<sup>D)</sup>, 飯倉 寛<sup>D)</sup>, 島添健次<sup>A)E)</sup>, 山内治雄<sup>F)</sup>, 小野 稔<sup>F)</sup>,  
杉原多公通<sup>C)</sup>, 高橋浩之<sup>A)B)E)</sup>  
Hironobu Yanagie <sup>#,A)B)C)</sup>, Keisuke Kurita<sup>D)</sup>, Hiroshi Iikura<sup>D)</sup>, Kenji Shimazoe<sup>A)E)</sup>, Haruo Yamauchi<sup>B)F)</sup>,  
Minoru Ono<sup>B)F)</sup>, Takumichi Sugihara<sup>C)</sup>, and Hiroyuki Takahashi<sup>A)B)E)</sup>

<sup>A)</sup> Institute of Engineering Innovation, School of Engineering, The University of Tokyo,

<sup>B)</sup> Cooperative Unit of Medicine and Engineering, The University of Tokyo Hospital,

<sup>C)</sup> Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences,

<sup>D)</sup> Materials Sciences Research Center, Japan Atomic Energy Agency,

<sup>E)</sup> Dept. of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo,

<sup>F)</sup> Dept. of Cardiovascular Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, JAPAN

#### Abstract

The selective accumulation of <sup>10</sup>B atoms is necessary to achieve effective cancer cell cytotoxicity without affecting adjacent healthy tissues on neutron-capture therapy (NCT).

In this study, we performed neutron capture autoradiography to the sliced tumor tissues after intra-venous injection of <sup>10</sup>BSH entrapped Transferrin binding Polyethylene coated Liposome (TF-PEG-Lip) in AsPC-1 mouse pancreatic cancer model for evaluating the feasibility of TF-PEG-Lip as boron delivery system in Boron neutron-capture therapy (BNCT), and also evaluating the accumulation of Polymetaroborate (B<sub>32</sub>) in tumor, as novel boron compound by intra-tumoral injection of B<sub>32</sub> entrapped Water-in-Oil-in-Water(WOW) emulsion. We performed neutron capture autoradiography (NCAR) of <sup>10</sup>B biodistribution in sections of subcutaneous pancreatic tumor samples of AsPC-1 tumor bearing mice using CR-39 (polyallyldiglycol carbonate) plastic track detectors using an PEW etching method. The images using NCAR of AsPC-1 subcutaneous tumors in mice after intravenous injection of <sup>10</sup>BSH entrapped TF-PEG-Lip have shown selective accumulation of <sup>10</sup>B atoms in AsPC-1 tumor until 48hours after injection. The images using NCAR of novel B compound; Polymetaroborate (B<sub>32</sub>) entrapped WOW emulsion have shown continuous selective accumulation of <sup>10</sup>B atoms in AsPC-1 tumor until 48hours after intra-tumoral injection.

These results indicates that selective delivery of <sup>10</sup>B compound to AsPC-1 tumors was achieved with TF-PEG-Lip, and WOW emulsion.

**Keyword:** Neutron Capture Therpay, Neutron Capture Autoradiography, CR39, <sup>10</sup>BSH entrapped TF-PEG-Lip, Polymetaroborate entrapped Water-in-Oil-in-Water (WOW) emulsion ,

## 1. はじめに

### 1.1 中性子捕捉療法について

効率的に誘導放射線を発生させ得る熱中性子の捕獲効率の高い、すなわち Cross section の高い元素として、ボロン(<sup>10</sup>B)元素とガドリニウム(<sup>157</sup>Gd)元素等があり、これらの原理を癌治療に応用したものが、中性子捕捉療法 (Neutron Capture Therapy ; NCT) である。BNCT においては、<sup>10</sup>B 元素と熱中性子との反応で放出される  $\alpha$  粒子および <sup>7</sup>Li 粒子を用いて、悪性腫瘍を破壊する。

このために、<sup>10</sup>B 原子が確実に腫瘍局所、特に癌細胞の核内に送達されるような <sup>10</sup>B デリバリー薬剤の開発が必要である。

我々は、現在までに、CR-39 プラスチック飛跡検出器 (CR39; Polly Allyl Diglicol Carbonate) を用いて取得した中性子ラジオグラフィー(Neutron Capture

Auto-Radiography : NCAR)像を形成する飛跡 (エッチピット) の解析から、生体中の <sup>10</sup>B の分布状況とその濃度の定量などを行い <sup>10</sup>B デリバリーシステムの検討を重ねている[1 - 5]。

### 1.2 Transferrin binding Polyethylene glycol coated Liposome (TF-PEG-Lip)について

我々は、ボロン化合物を封入した Mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate(Na<sub>2</sub><sup>10</sup>B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>.SH;<sup>10</sup>BSH) 封入抗 CEAImmunoliposome を CEA 産生性ヒト膵癌細胞と反応させ、中性子捕捉療法を用いてを選択的な腫瘍増殖抑制効果を認めた[6, 7]。静脈内投与にて全身投与に対応するために、Liposome の表面を Polyethylene glycol (PEG)で修飾することにより、ステルスリポソームを作製した。ステルスリポソーム

表面に Transferrin を結合させ、 $^{10}\text{B}$  封入 TF-PEG-Lip を作成できた。腫瘍表面の Transferrin 受容体に positive targeting を行い、中性子捕捉療法を用い腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた[5, 8]。さらに、Liposome の構成脂質にボロン化合物を組み込むことにより、腫瘍組織により高濃度の  $^{10}\text{B}$  原子を送達させ、肝腫瘍モデルに対し、内封型ボロン脂質組み込みリポソームの肝動注と中性子捕捉療法により腫瘍増殖抑制の増強を得ている[9]。

### 1.3 Water-in-Oil-in-Water emulsion (WOW エマルジョン)について

ヨード化ケシ油 (商品名: リピオドール) は、脂質自体が選択的に肝細胞癌(HCC)に沈着する性質を有しており、HCC の検出および治療に有効であることが報告されている。我々は、Mercaptoundeca-hydrocloso-dodecaborate( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\cdot\text{SH}$ ;  $^{10}\text{B}$ SH) 封入 WOW エマルジョンを作成し、ウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対して肝動注を行い、VX-2 腫瘍内の  $^{10}\text{B}$  化合物の集積および保持能力は、従来型の  $^{10}\text{B}$ SH-Lipiodol エマルジョンまたは  $^{10}\text{B}$ SH 溶液と比較して優れており、さらに、BNCT により腫瘍増殖抑制効果を確認した[10]。さらに、再発原発性肝臓癌症例においても、 $^{10}\text{B}$ SH 封入 WOW エマルジョンの肝動注後に京都大学原子炉実験所 (現 複合原子力科学研究所) にて医療照射 BNCT を行い、単回照射にて 3 か月間の stable disease の効果を得た[11]。

### 1.4 中性子ラジオグラフィ (NCAR) について

ボロンデリバリーシステムの開発のために、 $^{10}\text{B}$  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を応用している [1-5]。

今回、我々は、JRR3 における熱中性子照射を用いて、ボロンデリバリーシステムの癌細胞内集積性を確認するために、前段階として、NCAR のイメージングを行い、腫瘍内集積性・分散性を検討したので報告する。

## 2. 方法

### 2.1 AsPC-1 マウス皮下腫瘍モデルへの投与実験

① Balb/c nu/nu ノードマウスの背部皮下に、ヒト膵臓癌 AsPC-1 細胞を移植した。

② 2 週間後に、ASPC-1 皮下腫瘍モデルに対して、尾静脈より  $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip を静脈投与した ( $^{10}\text{B}$ SH 150 $\mu\text{g}/\text{body}$ )。また、新規ボロン化合物である Polymetaroborate ( $\text{B}_{32}$ ) 封入 WOW エマルジョンを腫瘍内投与した ( $\text{B}_{32}$ : 150 $\mu\text{g}/\text{body}$ )。

### 2.2 中性子ラジオグラフィ

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、マウスを麻酔下にドライアイス下の冷アセトンに浸し冷凍固結させる。マウスを冷凍固結させ、ミクロトーム

切断によりマウス薄片(40 $\mu\text{m}$ 厚)を作成した。

③ 作成した薄片(40 $\mu\text{m}$ 厚)を CR-39 に密着させ、原子炉から熱中性子を照射した (熱中性子フルエンス:  $2 \times 10^{12} \text{ n}/\text{cm}^2$ )。

④ 熱中性子照射後に、PEW65 溶液 (15 wt%KOH+65wt% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ +20wt% $\text{H}_2\text{O}$ ) 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、 $\alpha$  粒子や  $^7\text{Li}$  粒子の飛跡のみによる NCAR 像を形成させた。

## 3. 結果

### 3.1 中性子ラジオグラフィを用いた腫瘍組織と $^{10}\text{B}$ 原子集積性の解析

中性子ラジオグラフィによる  $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip の腫瘍集積性の確認: AsPC-1 ヒト膵臓癌マウス皮下腫瘍モデルにおいて、 $^{10}\text{B}$ SH 封入 TF-PEG-Lip を静脈内投与し、投与 3 時間と 48 時間後の腫瘍集積性を確認できた (図 1 .A, B)。

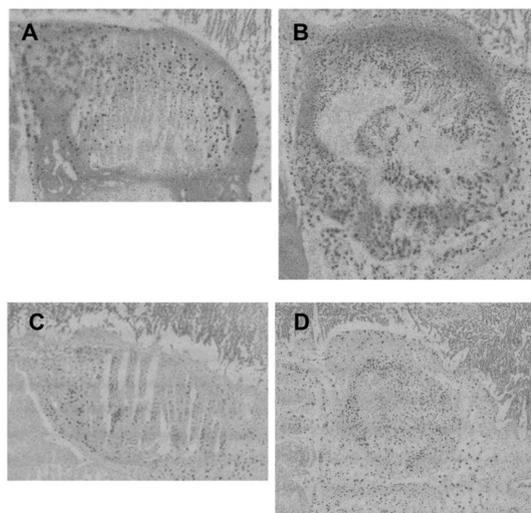
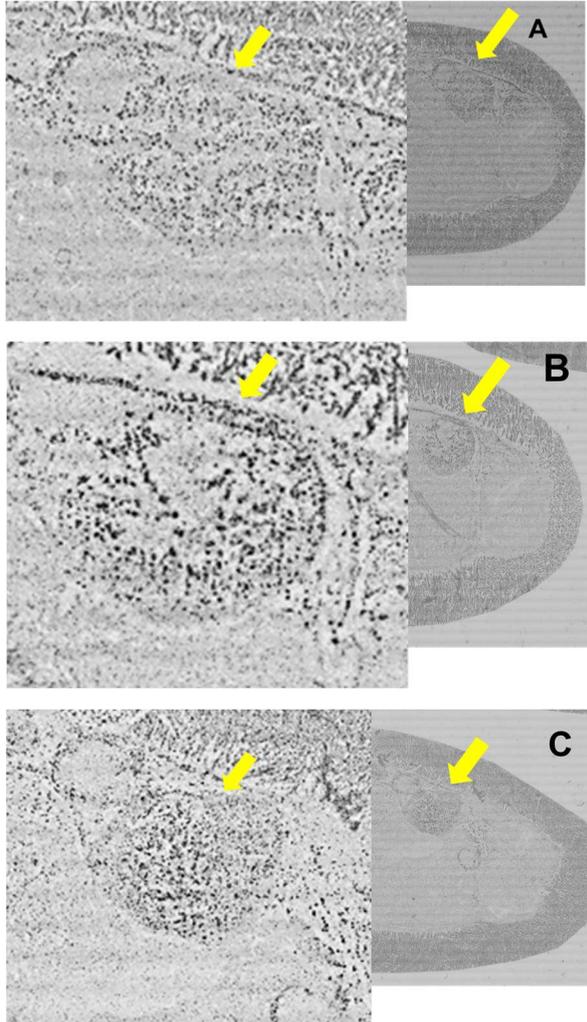


Figure 1. The alpha track dots in the AsPC-1 pancreatic cancer tumor by intravenous injection of  $^{10}\text{B}$ SH entrapped TF-PEG Lip. A; 3hr after IV, B; 48hr after IV.

特に、 $^{10}\text{B}$  原子の集積部位としての  $\alpha$  track etch pit は、静脈投与 3 時間後よりも、48 時間後において、増加しており、さらに、腫瘍内血管が豊富な腫瘍周辺において、etch pit が強いことが確認された。中心になると central necrosis となり、etch pit は減少しており、DDS による腫瘍内局在性の解析に応用できる。さらに  $^{10}\text{B}$ SH 溶液投与群においては、少量ではあるが、48 時間後に、中心壊死部に集積傾向を認め、壊死部における排出が低下していることを示しているものと考えられた (図 1.C, D)。TF-PEG-Lip を用いることにより腫瘍への選択的な集積性を確認できた。選択的な集積性の癌治療に応用できる考えられた。

新規ボロン化合物である Polymetaroborate ( $B_{32}$ ) を用いて合成した  $B_{32}$ -WOW の腫瘍内投与の場合、投与 3 時間および 48 時間後においても同様の腫瘍における集積が見られ、 $^{10}B$  原子の滞留性を確認できた。ボロン化合物の  $^{10}B$  enrich な化合物合成により、腫瘍選択的な集積が期待できる (図 2.A, B, C)。



**Figure 2. The alpha track dots in the AsPC-1 pancreatic cancer tumor by intra-tumoral injection of Polymetalicborate( $B_{32}$ ) entrapped WOW emulsion. A; 3hr after IT, B&C; 48hr after IT.**

#### 4. 考察

中性子捕捉療法においては、熱/熱外中性子照射時間内に腫瘍組織内に  $^{10}B$  原子が  $20 \mu g/g$  以上は必要と計算されている。このために、腫瘍組織選択的および癌細胞選択的な  $^{10}B$  化合物の Drug Delivery System (DDS) デリバリーシステムが必要になる[8]。効率的な細胞内 DDS において、我々は、腫瘍局所に送達する 1 次デリバリーと、腫瘍局所から癌細胞内に送達する 2 次デリバリーの融合されたデリバリーシステムが必要であることを提唱している。

我々が開発している Transferrin 結合 Polyethylene-

glycol (PEG) 修飾 Liposome に関しては、PEG が結合されており Long circulation 的で血中滞留性を維持でき、癌細胞表面に Transferrin 受容体が多いことより、積極的に癌細胞内へのエンドサイトーシスを誘導することより、癌細胞内へのデリバリーが可能になる[8, 12]。

WOW エマルジョンを用いて肝動注することにより、腫瘍局所に送達する 1 次デリバリーは達成できる[10, 13]。今回用いた  $B_{32}$  は、ポリ酸の形態を呈している。ポリ酸は、細胞内において、ミトコンドリア内電子伝達系に作用することが知られており、我々は、ポリ酸 Polymetaromribudate においては、オートファジーを誘導することを見出している[14]。

今回、PEW 溶液を用いてエッチングすることに入り、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 のイメージを作成することができ、 $^{10}B$  原子の腫瘍内滞留性を示すことができた。また、腫瘍内においても血流の良い腫瘍周辺部の集積性を示すことができた。

現在までに、原子間力顕微鏡を用いた  $^{10}B$  原子の細胞内局在を示した雨宮らの報告がある。我々は、現在、細胞内の  $^{10}B$  局在を示すために、熱中性子フルーエンス  $2 \times 10^{12} n/cm^2 \sim 2 \times 10^{13} n/cm^2$  の照射切片と HE 染色を行う連続切片の重ね合わせ画像にて光学顕微鏡の倍率をアップすることにより細胞内イメージングを試みている。

NCAR を用いることにより、NCT の適応拡大に貢献したいと考えている。

#### 5. 結語

ヒト膵臓癌 AsPC-1 皮下腫瘍モデルに対して、Transferrin 結合 Polyethylene-glycol 修飾 Liposome の有用性、および WOW エマルジョンの  $^{10}B$  原子封入性を 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、核内誘導リガンドを混和させた  $^{10}B$  複合体の WOW エマルジョンへの封入を進め、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, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Nucl. Instr. & Method A 424(1), 122- 128, 1999
- [2] K. Ogura, H. Yanagie, H. Kobayashi et al., Radiat Meas. 34, 555-558, 2001
- [3] J. Skvarc, H. Y H anagie et al., Cell Mol Biol Lett. 7(1), 162-4, 2002
- [4] H. Kobayashi K. Ogura, H. Yanagie et al., Appl Radiat Isot. 61(4), 573-8, 2004
- [5] H. Yanagie, K. Maruyama, K. Ogura, H. Kobayashi et al., Biomed. Pharmacother. 60(1), 43-50, 2006
- [6] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., Br. J: Cancer 3

( 4 ) : 522 - 526, 1991

- [7] H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, et al., *Br. J: Cancer* 75: 660 -665, 1997.
- [8] K. Maruyama, H. Yanagie et al., *J Control Release*. 98(2), 195-207, 2004
- [9] H. Yanagie, M. Yanagawa, H. Takahashi et al, *In Vivo*. 35(6): 3125-3135, 2021
- [10]H. Yanagie, K. Ogura, H. Kobayashi et al., *Br J Radiol*. 90(1074): 20170004. doi: 10.1259/bjr.20170004, 2017
- [11]H. Yanagie, S. Higashi et al., *Appl Radiat Isot*. 88(6):32-7, 2014. doi: 10.1016/j.apradiso.2014.01.014.
- [12] O Ishida, K Maruyama, H Yanagie, et al, *Jpn J Cancer Res*, 91(1):118-26, 2000.
- [13]H.Yanagie, M.Yanagawa et al., *Appl Radiat Isot*. 163(9) :109202. 2020. doi: 10.1016/j.apradiso.2020.109202.
- [14] A. Ogata, H. Yanagie, et al., *Br J Cancer*. 98(2):399-409. 2008. doi: 10.1038/sj.bjc.6604133.