

## ホウ素中性子捕捉療法における腫瘍内環境応答因子の機能解析

京都大学 複合原子力科学研究所

真田 悠生、増永 慎一郎

### 1. 諸言

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) はホウ素 10 化合物と熱中性子の反応を利用したがん治療である。BNCT が十分な抗腫瘍効果を示すための要素の 1 つとして、ホウ素 10 化合物が選択的に腫瘍細胞に蓄積する必要がある。しかし低酸素環境下の腫瘍細胞では、BPA (ホウ素 10 化合物の 1 種) が取り込まれにくく、BNCT の効果が十分に表れないことが細胞実験によりわかっている<sup>1)</sup>。これは、低酸素環境下で、BPA の取り込みに関わるトランスポーター (LAT1) が下方制御されることが少なくとも関係していると考えられている。この LAT1 トランスポーターの下方制御には低酸素誘導因子 (HIF-1) が関わっていることが示唆されており、近年われわれは HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 のサブユニット) の有無が、腫瘍細胞で LAT1 トランスポーターの発現量、ホウ素 10 化合物の取り込み量に影響することを明らかにした<sup>2)</sup>。しかし、HIF-1 がどのように LAT1 トランスポーターに作用したのか、という点についてはまだよくわかっていない。

またわれわれは、HIF-1 $\alpha$  欠損している腫瘍細胞、欠損していない腫瘍細胞のそれぞれを移植したマウスを作製し、BNCT の殺細胞効果も比較した。この実験は、中性子照射後のマウスから取り出した腫瘍組織から腫瘍細胞懸濁液を調製することで細胞生存率を調べ、HIF-1 $\alpha$  欠損細胞の細胞生存率が、欠損していない細胞のものよりも低くなることを明らかにしたものである<sup>2)</sup>。HIF-1 $\alpha$  欠損している腫瘍細胞への BNCT の殺細胞効果が認められたものの、個体への影響、照射後の再発の程度などが明らかでないという課題があった。

### 2. 方法

#### 2.1 担腫瘍マウスモデル

HIF-1 $\alpha$  が欠損した腫瘍細胞 (マウス扁平上皮がん細胞) は、すでに作製しているものを利用した<sup>3)</sup>。腫瘍細胞を左肢に移植することにより担腫瘍マウスを作製した。HIF-1 $\alpha$  が欠損している腫瘍のグループ、欠損していない腫瘍のグループを、さらに BPA-BNCT を行うか、行わないかで分け、合計 4 つのグループとした。BPA-BNCT を行うグループでは、BPA 250mg/kg b.w.を皮下注射し、投与して 1 時間後に中性子照射を行った。照射日を day 0 と

して、その後の経過観察として腫瘍体積、体重測定を3日ごとに行った。

## 2.2 細胞膜 LAT1 の定量解析系

タンパク質発現用ベクターに、LAT1 cDNA および検出用タグ配列をクローニングし、腫瘍細胞（マウス扁平上皮がん細胞）に導入した。500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 でセレクションを行い、タグを付加（挿入）した LAT1 タンパク質を発現する細胞を単離した（図 1）。ウエスタンブロットによりタグ付きの LAT1 タンパク質の発現を確認後、ELISA によって細胞膜に存在する LAT1 タンパク質の検出を試みた。

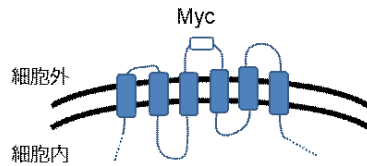


図 1 Myc タグを付加した LAT1 タンパク質のイメージ図。細胞膜タンパク質の検出系としてすでに報告されている方法を参考にした<sup>4)</sup>。

## 3.結果

### 3.1 HIF-1 の機能抑制と局所再発の関係

BPA-BNCT（BPA 投与後に中性子照射）を行わない場合、HIF-1 $\alpha$  が欠損した腫瘍、欠損した腫瘍の体積に大きな違いはみられなかった。BPA-BNCT を行った場合は、中性子照射後に腫瘍体積が減少した。HIF-1 $\alpha$  が欠損していない腫瘍の体積は、数日後より再び増大し始めたが、HIF-1 $\alpha$  が欠損した腫瘍の体積は小さいままであった（図 2）。HIF-1 $\alpha$  が欠損した腫瘍を形成しているマウスでは、照射後も、著しい体重減少などの異常な兆候は認めなかった。

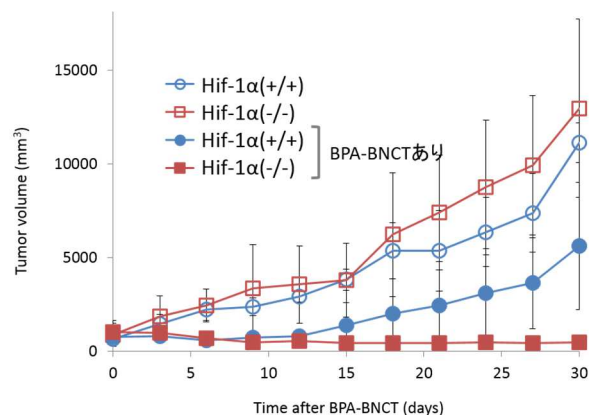


図 2 BPA-BNCT 後の腫瘍体積の変化。担腫瘍マウスに BPA を投与後、中性子照射を行った。照射直前（day 0）と照射後3日ごとに腫瘍体積を計測した。

### 3.2 HIF-1 が LAT1 トランスポーターに作用するメカニズム

LAT1 は細胞内のさまざまな場所に存在しているが、BPA の細胞内への取り込みに最も影響するのは細胞膜 LAT1 であると考えられる。本研究では、HIF-1 が LAT1 トランスポーターに作用するメカニズムとして、HIF-1 の有無が細胞膜 LAT1 の存在量に関わっているかを検討することにした。細胞膜 LAT1 を定量するため、LAT1 の細胞外側に露出している部位に Myc タグを付加（挿入）した LAT1 タンパク質を設計し、このタンパク質を発現する細胞を樹立した。樹立した細胞で、タグ付きの LAT1 を発現していることをウェスタンブロットにより確認した。次に同じ抗体を用いて ELISA を行い、細胞膜 LAT1 の検出を試みたが、コントロール（タグ付きの LAT1 を発現していない）の細胞と比較して、タグ付き LAT1 を発現する細胞での測定値（吸光度）は大きな違いがみられなかった（図 3）。コントロール細胞のバックグラウンドが想定以上に高く、今回樹立した細胞では、細胞膜 LAT1 の変動を詳細に評価するのは難しいという結論に至った。

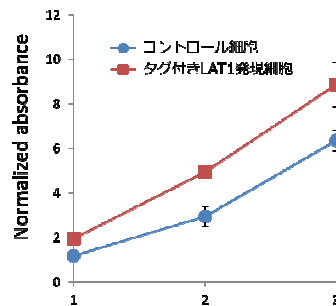


図 3 タグ付きの LAT1 の ELISA による検出。播種時の細胞数は 3 点（500、1,500、5,000 cells/well）で、横軸の 1、2、3 に対応する。細胞密度、増殖の影響を考慮して Cell Counting Kit-8 を用いた生存細胞数の評価を同時に行い、ELISA によって得られた吸光度を補正した数値を縦軸に示している。

## 4. 考察

これまでに HIF-1 $\alpha$  が欠損されている腫瘍細胞に対して、BNCT の殺細胞効果が高まることがわかっており、本研究ではさらに動物個体の照射後の影響を観察した。HIF-1 $\alpha$  が欠損していない腫瘍と比較すると、HIF-1 $\alpha$  が欠損されている腫瘍の照射後の再増殖は遅く、HIF-1 $\alpha$  が欠損している、あるいは下方制御されている場合には腫瘍の局所再発が起りにくくなるのではないかと考えられる。

HIF-1 (の欠損) がどのように BNCT の効果に影響したのか、特に LAT1 トランスポーターにどのように作用しているのかを調べることも重要である。本研究では、細胞膜に存在している LAT1 の量を定量する実験系の確立を目指したが、細胞膜 LAT1 の変動を詳細に検出できる状態には至らなかった。その原因はいくつか考えられるが、今回研究に用いた細胞内に、Myc 抗体が認識する何らかの抗原が多く存在しており、高いバックグラウンド

を示したのではないかと予想している。ウェスタンブロットによって詳しく調べたところ、高分子量側に強いバンドシグナルが検出されることがわかった。現在、意図しないシグナルが強く検出されないように、別のタグ-抗体の組み合わせで細胞膜 LAT1 を検出するための系の確立を行っている。

## 5.結語

これまでの研究、および本研究の結果から、HIF-1 $\alpha$  が欠損または下方制御されている腫瘍では、BPA-BNCT の効果が高まることが期待される。HIF-1 が BPA-BNCT の効果にどのように作用したのかについてはまだ明らかではなく、HIF-1 が LAT1 トランスポーターの細胞膜存在量に影響したのではないかと予想して現在研究を継続している。HIF-1 とホウ素化合物の取り込み機構との関係性がより詳しく解明されれば、よりピンポイントな標的因子が見つかることが期待される。

## 6.文献

- 1) Masunaga SI, Tatebe H, Nishimura Y, Tano K, Sanada Y, Moriwaki T et al. Effect of oxygen pressure during incubation with a (10)B-carrier on (10)B uptake capacity of cultured p53 wild-type and mutated tumor cells: dependency on p53 status of tumor cells and types of (10)B-carriers. *Int J Rad Biol.* 2016; 92(4): 187-194.
- 2) Sanada Y, Takata T, Tanaka H, Sakurai Y, Watanabe T, Suzuki M et al. HIF-1 $\alpha$  affects sensitivity of murine squamous cell carcinoma to boron neutron capture therapy with BPA. *Int J Radiat Biol.* 2021; 97(10): 1441-1449.
- 3) Sanada Y, Sasanuma H, Takeda S, Tano K, Masunaga SI. Disruption of Hif-1 $\alpha$  enhances cytotoxic effects of metformin in murine squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Biol.* 2018; 94(1): 88-96.
- 4) Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs IE, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *J Biol Chem.* 2011 Mar 11; 286(10): 8697-8706.

## 7.成果発表

なし