

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21533

研究課題名（和文）ホウ素中性子捕捉療法による軟部肉腫治療のためのホウ素薬剤取込メカニズム解析

研究課題名（英文）Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): Influence of expression of LAT1 in CCS on the cellular uptake of p-borono-L-phenylalanine

研究代表者

安藤 徹 (Andoh, Tooru)

神戸学院大学・薬学部・助手

研究者番号：50639226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：新たながん放射線療法として期待されているホウ素中性子捕捉療法では、腫瘍組織への選択的かつ高濃度の¹⁰B（特にL-BPA）の集積が治療効果の発現に必要とされている。

本研究より、明細胞肉腫において、LAT1がL-BPAの選択的かつ高濃度の腫瘍細胞内取込、腫瘍組織集積に強く関与していることが示された。また、LAT1の阻害剤であるBCHによる取込・集積の阻害率は同じ明細胞肉腫細胞間で異なることから、LAT1の発現量はL-BPAの取込能・集積性に影響を与えることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：L-type amino acid transporter-1 (LAT1) carries p-borono-L-phenylalanine (L-BPA) into tumor cells, mediating the efficacy of BNCT. Malignant tumor cells preferentially take up L-BPA because its chemical structure is similar to that of tyrosine. Indeed, our previous study demonstrated that Clear cell sarcoma (CCS) has the ability to highly take up L-BPA in vitro and in vivo. However, difference of antitumor effect among CCS cell lines based on an uptake of L-BPA. Thus, BNCT utilizing L-BPA could be a novel clinical option to treat CCS, provided that this research could reveal the mechanism of uptake.

LAT-1 was observed in each cell line by westan-blott method. The uptake of ¹⁰B in four CCS cell lines was inhibited by pretreatment with BCH. The inhibitory efficiency was 31.6 to 55.6%, each CCS cell line may correlate with expression level. These results indicated that LAT-1 was expressed in CCS cell lines and played a key role in uptake of L-BPA.

研究分野：医歯薬学

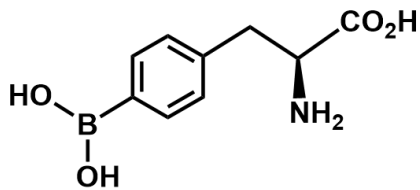
キーワード：ホウ素中性子線捕捉療法 明細胞肉腫 軟部肉腫 p-borono-L-phenylalanine LAT1

1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍（肉腫）に対する治療は、そのほとんどが放射線療法と化学療法に抵抗性であるため、手術による切除が治療の基本である。しかし、肉腫は発生頻度が低いのに対して、その疾患の種類が非常に多いことから、手術治療以外に明確な治療法が定まっていないのが現状である。

申請者らは、これまでに治療方法が乏しい軟部肉腫の一例として明細胞肉腫（Clear Cell Sarcoma, CCS）に対して新たな放射線療法であるホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy, BNCT）による抗腫瘍効果について検討してきた。BNCTは、腫瘍細胞内に集積させたホウ素 ^{10}B （主に *p*-borono-L-phenylalanine, L-BPA, 図1）に熱中性子を照射し、それらの核反応により細胞殺傷性が極めて高い重荷電粒子を発生させ、放射線抵抗性の腫瘍をも死滅させる治療法である。 ^{10}B の選択的な集積が確認されれば、腫瘍種に関わらず新たな治療法と成りうる可能性を有するため、治療方法の乏しい軟部肉腫にも適応可能と考え、検討を行ってきた。

これまでに L-BPA の細胞内取込評価 (T. Fujimoto et al, *Appl. Radiat. Isot.*, 2011), および担がん動物を用いた L-BPA 投与後の体内動態評価 (T. Andoh et al, *Appl. Radiat. Isot.*, 2011)ならびに BNCT による抗腫瘍効果の評価 (T. Fujimoto et al, *Appl. Radiat. Isot.*, 2013, T. Andoh et al, *Appl. Radiat. Isot.*, 2014) を行い, CCS は高度な L-BPA の取込・集積を示し, BNCT による顕著な抗腫瘍効果を明らかにした。しかし, その腫瘍集積メカニズムについては未だ明らかとなっていない。



L-BPA (*p*-borono-L-phenylalanine)

図1. L-BPA の化学構造

2. 研究の目的

ヒトの体を構成する細胞の細胞膜には、タンパク質合成の材料となるアミノ酸を細胞内へ輸送するアミノ酸トランスポーターが存在する。その中で, Kanai らは LAT1 というトランスポーターが癌細胞において著しく発現することを見出した (Y. Kanai et al, *J Biol Chem.* 1998, 図2)。近年, この LAT1 が BNCT 施行時に用いる L-BPA の腫瘍細胞への選択的な取込にも関連していると指摘されているが, 未だその関連性については明らかではない。しかし, BNCT による優れた抗腫瘍効果を示した CCS を用いて, 予備検討を施行したところ, CCS 細胞株が LAT1

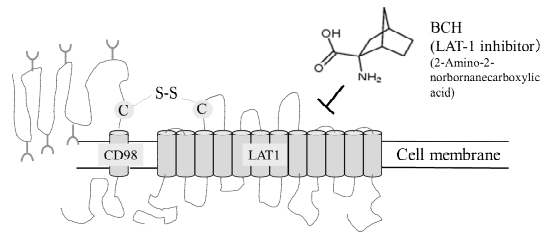


図2. 腫瘍細胞における LAT1 の模式図

の阻害剤である BCH により L-BPA の取込が抑制されることが判明した。この結果は, L-BPA の腫瘍細胞への取込には肉腫においても LAT1 が関与することを強く示唆する。そこで, 本研究ではこれまでに検討を行ってきた明細胞肉腫細胞株での LAT1 を介した L-BPA の取込・集積について解析し LAT1 の発現が L-BPA の腫瘍細胞内取込・腫瘍組織集積に関与するかを検討し, 最終的には肉腫での LAT1 の発現が BNCT の効果予測に有用かどうか検討する。

3. 研究の方法

4 種のヒト由来 CCS 細胞株 (HS-MM, KAS, MP-CCS-SY, SU-CCS-1) と LAT1 陽性細胞であるヒト由来乳癌細胞株である MCF-7, ヒト由来悪性黒色腫細胞株である G-361 を使用して, LAT1 タンパクのウエスタンブロット法による検出と, LAT1 阻害剤である 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) を用いた取込試験を行った。6 種のヒト由来がん細胞株を定法により培養し, 膜タンパクを抽出した後にウエスタンブロット法により, LAT1 タンパクの検出を行った。6 種のヒト由来がん細胞株を培養皿に 5×10^6 個ずつ播種し, 72 時間培養した後に 8 mM の BCH を含む培地を 10 分間作用させた。その培地に $30 \mu\text{g } ^{10}\text{B}/\text{mL}$ (ppm) となるように L-BPA のフルクトース錯体溶液 (BPA-Fr) を培地に添加し, BCH と L-BPA の共存下にて 4 時間培養した。培養後に細胞を採取し, 灰化处理した後に腫瘍細胞内の ^{10}B 量を ICP-AES 法により測定した。

3 種のヒト由来 CCS 細胞株 (KAS, MP-CCS-SY, SU-CCS-1) 1×10^7 個/匹をそれぞれヌードマウスの左大腿部に皮下移植し, 皮下担がん動物モデルを作製した。移植 4-8 週後に安楽死させた後で 10 mm 径の腫瘍を摘出した。腫瘍を 10% リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し, パラフィン包埋後に薄切標本を作成した。この薄切標本について, LAT1 抗体, CD98 抗体を用いて免疫組織化学を行った。次に作成した各 CCS 皮下担がん動物モデルに, BPA-Fr が 500 mg/kg, BCH が 300 mg/kg になるように調製した BCH 含有 BPA-Fr 溶液を大腿静脈より投与した。投与 1.5 時間後, 血液と所定の臓器をサンプリングし, 血中, 組織内 ^{10}B 濃度を ICP-AES 法によって測定した。

4. 研究成果

ウエスタンブロッティング法とリアルタイム PCR 法から、6 種の細胞株間において LAT1 の発現とその発現量に違いがあることを確認した (図 3)。

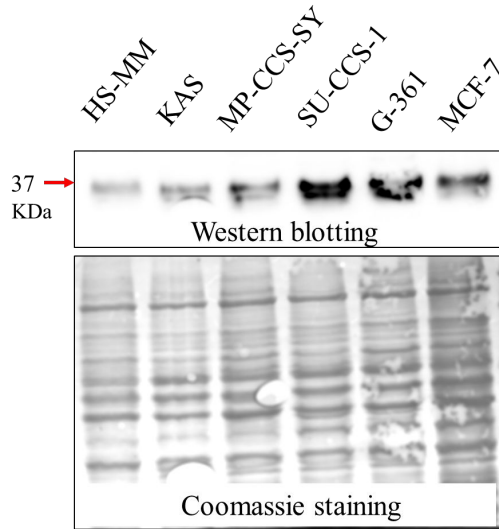


図 3. 明細胞肉腫細胞の LAT1 発現

さらに各 CCS 担がん動物の組織標本において、びまん性に LAT1 の強い発現を認めた。また LAT1 と結合して機能に關与する CD98 に関して同様にびまん性に強い発現を認めた (図 4)。

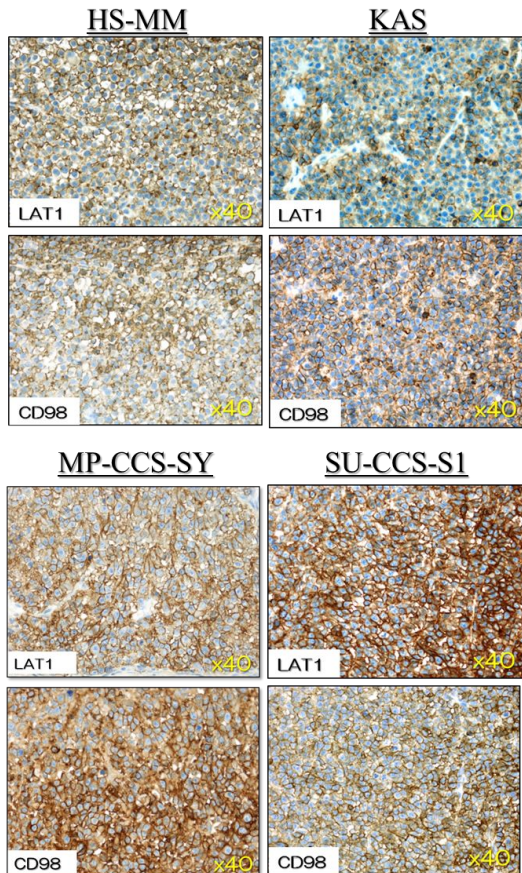


図 4. 担がん動物の腫瘍組織における LAT1 と CD98 の発現

また L-BPA の取込量から BCH 添加後の L-BPA 取込量を減じて、L-BPA の取込量で除した BCH による L-BPA 取込阻害率は LAT1 陽性の MCF-7 で 54.2%、G-361 で 32.7% となり、CCS では MP-CCS-SY で 55.6% と MCF-7 と同等に高く、KAS、SU-CCS-1 は約 40% とやや高値を示し、最も低値を示した HS-MM でも 31.6% と G-361 と同等の阻害効果を認めた (図 5)。

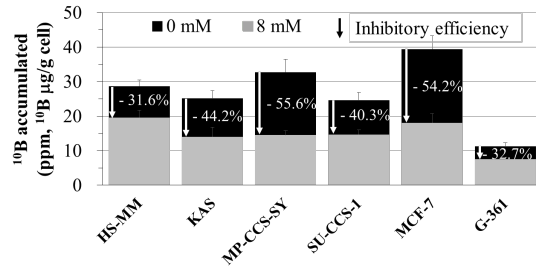


図 5. BCH による L-BPA の細胞内取込阻害

LAT1 の発現が大きい細胞株では BCH の阻害効率が大きいことから、LAT1 発現量の違いが L-BPA の細胞内取込に影響していると考えられる。さらに KAS、MP-CCS-SY、SU-CCS-1 の 3 種の CCS 担がん動物に BCH 含有 BPA-Fr 溶液を投与したところ、BPA-Fr 単独投与群に比べて L-BPA の腫瘍組織に対する集積が全ての細胞株において有意に阻害され、その阻害率はいずれも約 50% であった。これらの結果より、動物へ移植した CCS の腫瘍組織は各細胞株に差異を認めるが LAT1 を発現し、L-BPA の腫瘍内集積に LAT1 の関与することが示唆された。本研究の結果から、CCS は *in vitro* および *in vivo* において LAT1 の発現が L-BPA の腫瘍細胞内取込・腫瘍組織内集積に強く寄与していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

藤本卓也, 佐久間 淑子, 須藤 保, 牛尾伊佐子, 安藤 徹, 藤田郁夫, 今堀正也, 藤原周一, 河本旭哉, 市川秀喜, 廣瀬隆則. 明細胞肉腫における L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) の発現. 日本整形外科学会雑誌 (査読無し) 90(6), S1211 (2016)

T. Andoh, T. Fujimoto, M. Suzuki, T. Sudo, Y. Sakurai, H. Tanaka, I. Fujita, N. Fukase, H. Moritake, T. Sugimoto, T. Sakuma, H. Sasai, T. Kawamoto, M. Kirihata, Y. Fukumori, T. Akisue, K. Ono, H. Ichikawa. Boron neutron capture therapy (BNCT) as a new approach for clear cell sarcoma (CCS) treatment: Trial using a lung

metastasis model of CCS. Appl. Radiat. Isot. (査読有り) 106, 195-201 (2015)
T. Fujimoto, T. Andoh, T. Sudo, I. Fujita, N. Fukase, T. Takeuchi, H. Sonobe, M. Inoue, T. Hirose, T. Sakuma, H. Moritake, T. Sugimoto, T. Kawamoto, Y. Fukumori, S. Yamamoto, S. Atagi, Y. Sakurai, M. Kurosaka, K. Ono, H. Ichikawa, M. Suzuki. Potential of boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). Appl. Radiat. Isot. (査読有り) 106, 220-225 (2015)
鈴木 実, 藤本卓也, 安藤 徹, 市川秀喜. 悪性骨・軟部腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法 (BNCT). 日本整形外科学会雑誌 (査読無し) 89(7), 504-513 (2015)

〔学会発表〕(計 24 件)

和田 恵二郎, 安藤 徹ほか, 明細胞肉腫 (CCS) に対するホウ素中性子捕捉療法: CCS の LAT1 の発現が *p*-borono-L-phenylalanine の取込に与える影響. 日本薬学会・第 137 年会, 2017/3/24 - 27, 仙台

T. Andoh ほか, Evaluation of relationship between uptake of L-BPA in Clear Cell Sarcoma Cell Line and L-type amino acid transporter 1. 17th International Congress on Neutron Capture Therapy, 2016/10/2-7, Columbia, Missouri, America

安藤 徹ほか, 明細胞肉腫細胞の L-BPA 取込と L 型アミノ酸トランスポーター1 発現の関連について. 第 13 回 日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2016/8/6 - 7, 東京

藤本卓也, 安藤 徹ほか, 明細胞肉腫は L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) を発現する. 第 13 回 日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2016/8/6 - 7, 東京

安藤 徹ほか, ホウ素中性子捕捉療法の適応を目指した前臨床研究. 第 45 回放射線による制癌シンポジウム・第 54 回 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 2016/7/15 - 16, 大阪

藤本卓也, 安藤 徹ほか, 明細胞肉腫における L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) の発現. 第 49 回 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2016/7/14 - 15, 東京

鈴木 実, 安藤 徹ほか, 骨・軟部腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法 (BNCT). 第 310 回 日本医学放射線学会関西地方会, 2015/6/13, 大阪

研究者番号: 50639226

(4) 研究協力者

藤本 卓也 (Fujimoto Takuya)
兵庫県立がんセンター・整形外科

須藤 保 (Sudo Tamotsu)
兵庫県立がんセンター・研究部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 徹 (Andoh Tooru)

神戸学院大学・薬学部・製剤学研究室