

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10860

研究課題名(和文) ホウ素中性子捕捉療法の適応を目指した骨軟部腫瘍におけるLAT-1発現の検討

研究課題名(英文) Study of LAT1 expression in musculoskeletal tumor for the purpose of boron neutron capture therapy (BNCT)

研究代表者

藤本 卓也 (Fujimoto, Takuya)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00397811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、ホウ素製剤(BPA)を取り込んだ腫瘍細胞に対して熱中性子線照射により腫瘍のみを死滅させる新たな治療方法である。BPAは、腫瘍細胞のみに発現するアミノ酸トランスポーター(LAT1)を介して取り込まれるため、LAT1を発現する腫瘍はBNCTが期待できる。そこで、悪性腫瘍(肉腫)について検討したところ、主に明細胞肉腫、滑膜肉腫、および類上皮肉腫(近位型)等でLAT1発現を確認した。また、BNCTを施行した明細胞肉腫臨床例では良好な腫瘍制御を認めた。本研究は、治療方法が限られている肉腫においてもLAT1発現を認めればBNCTが新たな治療方法となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に肉腫は通常の放射線治療および化学療法に対して抵抗性であるため、手術による切除以外に有効な治療方法が無い場合が多い。しかし、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、アミノ酸トランスポーター(LAT1)を介してホウ素製剤(BPA)を取り込んだ腫瘍細胞に対してのみ抗腫瘍効果を発揮するため、LAT1を発現する肉腫はBNCTの適応となる。本研究では、特に明細胞肉腫がLAT1を強く発現することを見出し、明細胞肉腫臨床例では、実際にBNCTによる抗腫瘍効果を認めた。これは、現在の治療方法が限られている肉腫治療において、LAT1を発現する肉腫は、BNCTが新たな治療方法となる可能性を示し非常に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is a new treatment method that destroys only tumor cells that have been taken boron compounds (BPA) by irradiating them with thermal neutrons. Since BPA is taken up through an amino acid transporter (LAT1) expressed only in tumor cells, BNCT can be expected for the treatment of the malignant tumor expressing LAT1. Therefore, we examined mainly malignant soft tissue tumors (sarcomas), strong expression of LAT1 was observed in clear cell sarcoma, moderate expression was observed depending on the tissue subtype in synovial sarcoma, and strong expression was confirmed in epithelioid sarcoma (proximal type). Furthermore, in case of clear cell sarcoma that underwent BNCT, good local tumor control was observed. Thus, the expression of LAT1 in these sarcomas suggests that BNCT may be a new treatment method for sarcomas that has few effective treatment methods.

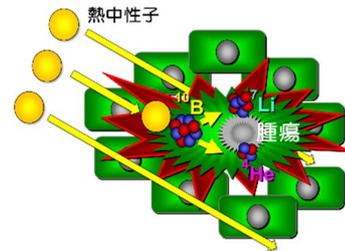
研究分野：整形外科 骨軟部腫瘍

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 骨軟部腫瘍 LAT1 ホウ素製剤 明細胞肉腫 滑膜肉腫 BNCT BPA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

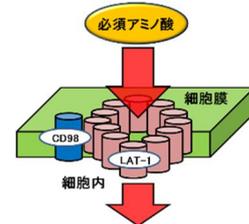
肉腫は、筋肉、脂肪などの非上皮性組織から生じた悪性腫瘍である。癌と比較して発生頻度が非常に低いだけでは無くその組織形態が多種多様であるため、一部の肉腫を除いては手術による全切除以外に有効な治療方法が定まっていないのが現状である。そこで、我々は、近年、脳腫瘍あるいは頭頸部領域に生じた癌に対して良好な治療成績が報告されているホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) を用いて、切除以外に有効な治療方法が無い明細胞肉腫 (Clear Cell Sarcoma, CCS) に対する BNCT の抗腫瘍効果について検討を行ってきた。この新たながん放射線療法である BNCT は、腫瘍細胞へ選択的にホウ素 ^{10}B (*p*-boronophenylalanine (BPA) を取り込ませた後に、体外から熱中性子を照射し、腫瘍細胞内で生じる核反応により重荷電粒子を発生させ、周囲の正常組織にはほとんど影響を与えることなく腫瘍細胞のみを選択的に死滅させる (図 1)。明細胞肉腫を用いた検討では、腫瘍細胞への高度のホウ素集積と、その担がん動物モデルに対する BNCT により腫瘍細胞選択的な腫瘍の消失を認め (文献)、特に明細胞肉腫の肺転移動物モデルでは、BNCT の全肺照射により肺の転移巣のみが死滅した (文献)。また、臨床例で BNCT による抗腫瘍効果を認めた悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) についても、その担がん動物モデルを用いた検討から腫瘍細胞への選択的なホウ素取り込みと BNCT による抗腫瘍効果が確認された (文献)。この様に、腫瘍細胞へホウ素が選択的に集積すれば、BNCT による抗腫瘍効果が得られ、治療方法が限られた骨・軟部悪性腫瘍でも BNCT を用いた新たな治療法の開発が期待できる。そのためには、個々の腫瘍のホウ素取り込みの評価が BNCT 成功の鍵となる。



(図 1) 腫瘍細胞内で放出される重荷電粒子は飛程が短く腫瘍のみを破壊。

2. 研究の目的

前述した様に、骨・軟部腫瘍へのホウ素の選択的な集積が、BNCT 成功の鍵となる。ここで、細胞膜上には蛋白質合成の原材料であるアミノ酸を細胞内へ輸送する多くのアミノ酸トランスポーターが存在している。Kanai らは LAT1 (L-type amino acid transporter 1) というトランスポーターが CD98 とヘテロ二量体を形成し (図 2)、癌細胞では著しく発現することを見出した (文献)。さらに近年、この LAT1 がホウ素の腫瘍細胞への選択的な取り込みも担っていることが報告された (文献)。これらは、逆に腫瘍の病理組織検査時に LAT1 の発現も確認出来れば、BNCT による局所制御の事前予測が可能となることを示唆する。しかし、現時点では、BNCT 適応を目的とした骨・軟部腫瘍における LAT1 の発現を検討した報告はない。そこで、本研究では、手術にて切除した骨・軟部腫瘍の組織検体を用いて LAT1 の発現を免疫組織化学にて確認し、上記可能性について検討した。



(図 2) LAT1 は腫瘍細胞膜で CD98 と二量体をなし、必須アミノ酸を取り込む。

3. 研究の方法

癌細胞に特異的に発現するアミノ酸トランスポーターの一つである LAT1 の発現を、肉腫を中心とした骨・軟部腫瘍の担癌動物モデルの組織標本、手術時切除標本および実際に臨床にて BNCT 施行された病理組織検体を用いて免疫組織化学にて CD98 の発現と共に検討した。

(1) BNCT を施行したヒト由来の肉腫細胞株担がん動物モデルから切除した組織標本を用いて、LAT1 および CD98 の免疫組織化学を行った。また、BNCT による効果とも比較した。

(2) 手術組織検体を用いて、LAT1 および CD98 の免疫組織化学を行った。軟部悪性腫瘍では、平滑筋肉腫、粘液型線維肉腫、滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、明細胞肉腫等で施行した。良性軟部腫瘍は、腱鞘巨細胞腫、脂肪腫等を用いて行った。骨悪性腫瘍では、未脱灰の骨転移癌、骨肉腫標本を用いて検討した。

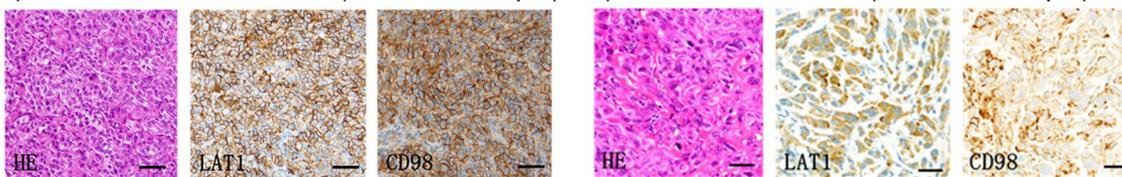
(3) 京都大学複合原子力科学研究所にて BNCT を施行した、明細胞肉腫、滑膜肉腫および平滑筋肉腫例と同じ肉腫の組織検体での LAT1 および CD98 の発現について検討した。

(4) 肉腫での LAT1 の機能を確認する目的で、特に LAT1 の発現が高い明細胞肉腫の細胞株を用いて LAT1 阻害剤によるアミノ酸取り込み抑制について検討した。

4. 研究成果

(1) 担がん動物モデルから抽出した組織標本の LAT1 および CD98 の免疫組織化学。

a) 明細胞肉腫の動物モデル(scale bar 40 μm) b) MPNSTの動物モデル(scale bar 20 μm)



明細胞肉腫肺転移動物モデル(文献)から採取した組織では、全ての腫瘍細胞に LAT1 と CD98 の強い発現を認めた。また、悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) (文献)の担がん動物モデルから採取した組織では、ほぼ半数の腫瘍細胞に LAT1 と CD98 の強い発現を認めた。両肉腫ともに、動物実験により腫瘍細胞へのホウ素の選択的な取り込みと BNCT の抗腫瘍効果が確認されており、LAT1 の発現は BNCT による効果と関連した。

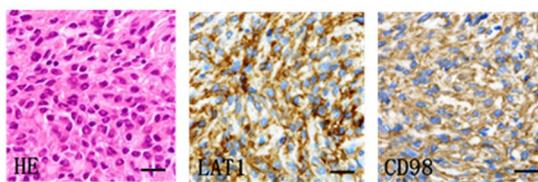
(2) 手術時の腫瘍切除検体における LAT1 および CD98 の発現。

良性軟部腫瘍

検討した腱鞘巨細胞腫、神経鞘腫および脂肪腫では殆ど発現を認めなかった。

悪性軟部腫瘍

a) LAT1 の発現を認めた症例：明細胞肉腫の臨床例では、全ての腫瘍細胞に強い LAT1、および CD98 の発現を認めた。その他、類上皮肉腫(近位型)でも、腫瘍細胞に強い LAT1、および CD98 の発現を認めた (BNCT 適応につき検討中)。粘液線維肉腫では中等度の発現を認めた。滑膜肉腫では、単相性と二相性では、主に二相性の上皮性部位に発現を認め、一部単相性でも発現を認めた(論文投稿中)。



明細胞肉腫の臨床例 (scale bar 20 μm)

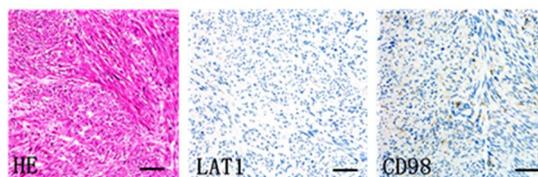
b) LAT1 発現の乏しい症例：平滑筋症例では、LAT1 の発現を殆ど認めなかった。

悪性骨腫瘍

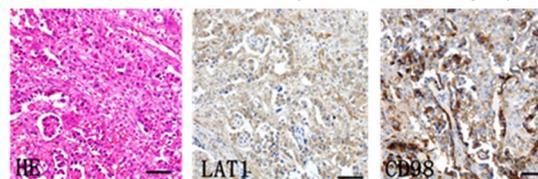
骨肉腫では、LAT1 および CD98 の弱い発現を認めた。

転移性骨腫瘍

肺癌の骨転移部では、強い LAT1 および CD98 の発現を認めた。



平滑筋肉腫の臨床例 (scale bar 40 μm)



肺癌骨転移部 (scale bar 40 μm)

(3) 肉腫の BNCT 施行症例(臨床)での LAT1 および CD98 発現の検討。

BNCT にて腫瘍制御が可能であった症例。

a) 明細胞肉腫例

全ての腫瘍細胞に強い LAT1 と CD98 の発現を認めた。BNCT 例でも LAT1 と CD98 の強い発現を認め BNCT による抗腫瘍効果を確認した(論文投稿中)。

b) 滑膜肉腫例(単相性)

LAT1 の発現は乏しい例が殆ども、一部は中等度の発現を認めた。BNCT 例は乏しい発現も限定的な局所の腫瘍制御を認めた(論文投稿中)。

BNCT にて制御が困難であった症例。

平滑筋肉腫の組織検討例では、殆ど LAT1 と CD98 の発現を認めなかった。BNCT 症例は、照射後に腫瘍増大を認め、組織検では、LAT1 と CD98 の発現を認めなかった(論文準備中)。

(4) LAT1 阻害剤による明細胞肉腫細胞株でのアミノ酸取り込みの検討。

LAT1 阻害剤により、特に明細胞肉腫での必須アミノ酸取り込みが抑制された。実際に明細胞肉腫において LAT1 が機能することを確認した。

LAT1 の癌細胞での特異的な発現については、すでに数多くの報告がある。LAT1 は癌細胞増殖に要する必須アミノ酸の取り込みを主として担っており、これらの研究の目的は、LAT1 阻害剤による癌細胞への必須アミノ酸取り込み阻止による抗腫瘍効果の可能性についての検討である。ここで、前述したように、BNCT に用いられるホウ素製剤(BPA)の腫瘍細胞への選択的な取り込みについても、この LAT1 を介して行われることが明らかとなっている(文献)。癌と異なり肉腫は、その多くが通常の放射線治療、化学療法に抵抗性であるため、切除以外の有効な治療方法について常に模索されている。しかし、現在のところ、骨・軟部腫瘍において BNCT 適応の観点から LAT1 の発現について検討した報告は無い。そこで、臨床例で BNCT の効果を認めた悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) では、MPNST 担がん動物モデルでも同様の抗腫瘍効果を確認したため(文献)、本研究にてその腫瘍組織での LAT1 発現を確認したところ強い発現を確認した(4. (1)b)。また、

明細胞肉腫担がん動物モデルも、BNCT による抗腫瘍効果を認めたが(文献)、その腫瘍組織でも全ての腫瘍細胞に LAT1 の強い発現を認めた(4.(1)a)。つまり、組織検査での LAT1 発現が、BNCT 適応の判断指標となる可能性を強く示唆する結果となった。実際に、明細胞肉腫の BNCT 臨床施行例では、LAT1 を強く発現する腫瘍細胞が BNCT により完全に制御され、明細胞肉腫に対する新たな治療方法となる可能性を示した。これは、本研究の最大の成果である。また、滑膜肉腫においても組織亜型により LAT1 発現の差があることを見出し BNCT を施行した。これらの経緯は、本研究成果報告書には記載出来ないが論文として投稿中である。さらに骨転移癌でも強い LAT1 の発現を認め、骨転移の治療についても BNCT が期待できることが明らかとなった。今後、引き続き研究の予定である。

<引用文献>

- Fujimoto, Andoh et al, Appl. Radiat. Isot., 2013;96-100
- Andoh, Fujimoto et al, Appl. Radiat. Isot., 2015;195-201
- Fujimoto, Andoh et al, Appl. Radiat. Isot., 2015;220-225
- Kanai Y,et al.J Biol Chem.1998;23629-23632
- Wongthai P, et al. Cancer Sci.2015;279-286

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 鈴木 実, 藤本卓也, 安藤 徹	4. 巻 92
2. 論文標題 教育研修講座 悪性骨・軟部腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法(BNCT)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 757-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤徹, 市川秀喜, 藤本卓也, 鈴木実	4. 巻 35
2. 論文標題 悪性軟部腫瘍への新たな治療オプションとしての中性子捕捉療法の現状と可能性(特集 線治療とDDS)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 137-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Andoh T., Fujimoto T., Nagasaki Y., Suzuki M., Tanaka H., Takata T., Sakurai Y., Ichikawa H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Preclinical study of boron neutron capture therapy for bone metastasis using human lung cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 KURNS Progress Report 2018	6. 最初と最後の頁 C06-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 5件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 藤本卓也, 鈴木 実, 安藤 徹, 須藤 保, 佐久間淑子, 市川秀喜, 藤田郁夫, 河本 旭哉, 秋末敏宏, 小野公二, 黒田良祐
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)を用いた肉腫治療
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本卓也
2. 発表標題 明細胞肉腫に対するBNCT適応についての検討
3. 学会等名 平成30年度京都大学複合原子力科学研究所専門研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本卓也, 安藤 徹, 須藤 保, 市川秀喜, 鈴木 実, 藤田郁夫, 櫻井良憲, 田中浩基, 高田卓志, 佐久間淑子, 森下雅之, 八尋俊輔, 河本旭哉, 秋末敏宏, 廣瀬隆則, 黒田良祐
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の検討
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Fujimoto, M. Suzuki, S. Kuratsu, T. Sudo, T. Sakuma, Y. Sakurai, T. Takata, Y. Tamari, H. Tanaka, S. Masunaga, Y. Kinashi, N. Kondo, H. Igaki, I. Fujita, T. Andoh, M. Morishita, S. Yahiro, R. Shigemoto, T. Kawamoto, T. Akisue, H. Ichikawa, R. Kuroda, T. Hirose
2. 発表標題 Study on application of BNCT to synovial sarcoma
3. 学会等名 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Fujimoto
2. 発表標題 Potential of BNCT for clear cell sarcoma
3. 学会等名 Kyoto/Osaka-Taiwan BNCT International Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Fujimoto, Tamotsu Sudo, Tooru Andoh, Yasuhiro Irino, Toshiko Sakuma, Hiroshi Moritake, Ikuo Fujita, Teruya Kawamoto, Toshihiro Akisue, Takeo Usui, Jun ' ichi Kobayashi, Hideki Ichikawa, Ryosuke Kuroda, Minoru Suzuki, Takanori Hirose
2. 発表標題 L-type Amino Acid Transporter1 (LAT1) Expression in Clear Cell Sarcoma.
3. 学会等名 The 19th International Society of Limb Salvage General Meeting (ISOLS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤本 卓也, 神谷 信彦, 粟飯原 輝人, 佐久間 淑子, 宇野 雅子, 藤田 郁夫, 今堀 正也, 北山 和道, 河本 旭哉, 平塚 純一, 秋末 敏宏, 黒田 良祐, 小野 公二, 鈴木 実, 廣瀬 隆則
2. 発表標題 平滑筋肉腫に対するホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の適応についての検討
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 実、藤本卓也
2. 発表標題 悪性骨・軟部腫瘍・多発肺転移に対するホウ素中性子捕捉療法適応に向けての戦略
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuya Fujimoto, Tamotsu Sudo, Tooru Andoh, Yasuhiro Irino, Toshiko Sakuma, Hiroshi Moritake, Ikuo Fujita, Teruya Kawamoto, Toshihiro Akisue, Usui Takeo, Jun ' ichi Kobayashi, Hideki Ichikawa, Ryosuke Kuroda, Minoru Suzuki, Takanori Hirose
2. 発表標題 L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expresses in clear cell sarcoma and its inhibitor blocks incorporation of essential amino acids
3. 学会等名 22nd Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (CTOS2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	Syunsuke Yahiro, Takuya Fujimoto, Tamotsu Sudo, Ikuo Fujita, Toshiko Sakuma, Toshinori Takai, Naomasa Fukase, Masahiro Morishita, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Toshihiro Akisue, Ryosuke Kuroda, Takanori Hirose
2. 発表標題	L-TYPE AMINO ACID TRANSPORTER 1 (LAT1) EXPRESSION IN PROXIMAL-TYPE EPITHELIOID SARCOMA: A CASE REPORT
3. 学会等名	22nd Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (CTOS2017) (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	T. Fujimoto, N. Kamitani, T. Sudo, T. Sakuma, T. Aihara, M. Uno, Y. Kinashi, Y. Sakurai, H. Tanaka, S. Masunaga, A. Maruhashi, N. Kondo, I. Fujita, T. Andoh, T. Kawamoto, T. Akisue, H. Ichikawa, J. Hiratsuka, K. Ono, R. Kuroda, M. Suzuki, T. Hirose
2. 発表標題	Evaluation of Boron Neutron Capture Therapy for Leiomyosarcoma
3. 学会等名	9th Young Researchers ' BNCT Meeting (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	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
2. 発表標題	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.
3. 学会等名	第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	藤本卓也
2. 発表標題	滑膜肉腫に対するBNCTの適応について
3. 学会等名	令和元年度京都大学複合原子力科学研究所専門研究会 (招待講演)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 藤本卓也, 鈴木実, 藤田郁夫, 佐久間淑子, 櫻井良憲, 森下雅之, 高田卓志, 玉利勇樹, 田中浩基, 安藤徹, 河本旭哉, 市川秀喜, 小野公二, 黒田良祐, 秋末敏宏
2. 発表標題 明細胞肉腫に対するホウ素中性子捕捉療法
3. 学会等名 第16回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 実 (Suzuki Minoru) (00319724)	京都大学・複合原子力科学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	市川 秀喜 (Ichikawa Hideki) (00248105)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	
研究分担者	河本 旭哉 (Kawamoto Teruya) (30420558)	神戸大学・医学研究科・特命講師 (14501)	
研究分担者	安藤 徹 (Andoh Tooru) (50639226)	神戸学院大学・薬学部・助教 (34509)	