

令和元年6月25日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16666

研究課題名(和文)新規ホウ素化ポルフィリンの超選択的動注療法によるBNCTおよびPDTの有用性

研究課題名(英文)Usefulness of a super selective arterial infusion therapy of a novel boronated porphyrin for BNCT and PDT

研究代表者

平松 亮(Hiramatsu, Ryo)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40609707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：BNH2-PpIXを中心に新規ホウ素化ポルフィリンをDrug delivery system(DDS)として Convection enhanced delivery (CED)および血液脳関門(Blood brain barrier:BBB)破砕併用超選択的動注療法を用いラット脳腫瘍モデルに投与し、腫瘍内ホウ素取り込み量の比較検討を行った。CEDでは $20\mu\text{g}10\text{B/g}$ を超えるホウ素取り込み量を認めたと、BBB破砕併用頸動脈投与では低い値であり、マンニトール投与でのBBB破砕のタイミングを探ったが静脈内投与を上回る数値は得られなかった。また薬剤供給の問題もあり本研究の継続は難しい状況となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BBB克服のためDDSとして静脈内投与以外に、CEDおよびBBB破砕併用超選択的動注療法を用い、その後レーザー照射および中性子照射まで含めた学術的意義の高い研究を計画していた。BNH2-PpIX($0.25\text{mg}/200\mu\text{l}$)をCED(24時間にて投与)にてラット脳腫瘍モデルに投与を行い、投与後24時間の腫瘍内ホウ素濃度は $20\mu\text{g}10\text{B/g}$ を超える高い値であったが、同様の実験をBBB破砕併用頸動脈投与で行ったが期待した高い数値を得ることができなかった。薬剤供給の問題もあり本研究期間中に研究成果を得ることができなかった。

研究成果の概要(英文)：We used BNH2-PpIX via CED and carotid arterial infusion therapy in combination with the disruption of BBB. The boron concentrations following CED of BNH2-PpIX to the F98 rat glioma-bearing brain tumor models at 24 h after termination of CED were also observed at different BNH2-PpIX doses (0.125, 0.25, and 0.5 mg BNH2-PpIX /rat). The tumor boron concentrations showed the highest concentrations at a dose of 0.25 mg BNH2-PpIX /rat; the boron concentrations at a dose of 0.125, 0.25, and 0.5 mg BNH2-PpIX /rat were 4.09 ± 0.56 , 20.21 ± 8.05 , and 17.76 ± 11.71 $20\mu\text{g}10\text{B/g}$, respectively. But the boron concentrations following carotid arterial infusion therapy could not showed the highest concentration. Additionally, we were cut off the supply of boronated porphyrins from the research collaborators. So, we could not showed the efficacy of BNH2-PpIX of carotid arterial infusion therapy in combination with the disruption of BBB, as a DDC, during this study period.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 BNCT PDT ホウ素化ポルフィリン CED BBB破砕動注療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) **ホウ素中性子捕捉療法(Boron neutron capture therapy:BNCT)**は、腫瘍細胞にホウ素 10 (¹⁰B)化合物を取り込ませ中性子を照射することにより、高線エネルギー付与の 粒子が腫瘍細胞ひとつ分に相当する飛程約 10 ミクロンで放出されることにより、ホウ素が集積した腫瘍細胞のみを選択的に破壊するという、いわば細胞生物学的標的治療である。BNCT の歴史は新しいものではなく、1990 年代には中川・畠中らがホウ素化合物の動注療法(頸部頸動脈投与)を臨床 BNCT で行っている(Nakagawa Y. *et al*: *J Neurooncology*. 1997)。結果は重篤な副作用・合併症は認めなかったものの十分な生存期間の延長は認められなかった。その理由としては脳腫瘍治療の場合問題となってくる血液脳関門 (BBB) の影響があった。多臓器と異なり脳には BBB が存在するため薬剤送達はより困難となる。そこで Barth らは動物実験にてマンニトール投与による BBB 破碎を併用した頸部頸動脈からのホウ素化合物の動注療法を報告した(Yang W. *et al*: *J Neurooncology*. 1997)。この報告では非常に高い腫瘍内ホウ素濃度を認め(図)、実際の中性子照射動物実験での生存期間は今もなお超えられていない優れた有効性が示され BBB 破碎併用動注療法が注目された。しかしより高濃度のホウ素化合物を BBB 破碎併用で頸動脈より投与すると、ラットの生存期間には影響しないものの

Group (route/BBB-D)	BPA Dose (mg/kg b.w.)	Boron Concentration (mg/g)			Tumor/Brain ratio	Tumor/Blood ratio
		Tumor	Ipsilateral Brain	Blood		
i.c./+BBB-D	800	101.6 ± 14.0	16.3 ± 11.0	15.4 ± 3.1	6.8 ± 3.5	6.4 ± 2.1
i.c.	800	56.6 ± 30.1	15.0 ± 10.6	16.4 ± 9.2	4.3 ± 1.7	3.5 ± 0.4
i.v.	800	21.8 ± 5.6	5.5 ± 2.8	13.6 ± 6.8	6.2 ± 2.3	3.4 ± 1.0

図 薬剤投与方法としては**血液脳関門破碎併用頸動脈動注療法 (i.c./+BBB-D) が最も高い腫瘍内ホウ素濃度を認めた**

病理学的検査において急性期脳壊死を正常脳の深部灰白質・白質に、また脳出血や出血性梗塞などが確認され BBB 破碎併用のホウ素化合物動注療法は臨床応用されずにきた。こういった現象を軽減させるためには頸部頸動脈からの動注ではなく、より末梢の流入血管に直接マイクロカテーテルを留置し動注する**超選択的動注療法**を行うことで正常脳へのホウ素化合物の影響を減らし、かつマンニトール投与による BBB 破碎併用により腫瘍組織へのホウ素濃度を上げることが可能となり BNCT の更なる効果が期待できる。

(2) 超選択的動注療法を行うためには透視装置が必要で、また整備された医療施設でなければならない。そのため医療用原子炉での超選択的動注療法は困難である。これを克服するためには中性子を作り出すための加速器発生装置が必要であり数年前より国内外で開発され、現在既放射線治療再発悪性神経膠腫患者を対象とした加速器 BNCT による治験を実施している。**加速器中性子源は、原子炉中性子源に匹敵する中性子発生装置を医療用原子炉よりもはるかに小型でかつ安価に設置できるため、医療用原子炉とは異なり病院内の設置も可能となる。**そのため現在の加速器 BNCT 治験が医療として認可されれば、今まで障壁となっていた医療用原子炉から脱却でき広く BNCT が広まるきっかけとなるであろうし、**超選択的動注療法も可能となり BNCT の更なる効果も期待できる。**

(3) **光線力学的治療 (Photodynamic therapy:PDT)**とは、ポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織・新生血管への特異的な集積性と光の励起により発生する一重項酸素の強い細胞破壊効果を利用した治療法である。現在我が国では光感受性物質(フォトフィリン)による PDT として、早期肺癌・早期胃癌・早期食道癌・早期子宮頸癌に保険適応されおり、大変良好な成績をあげている。脳腫瘍においては 5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた**術中蛍光ガイド下脳腫瘍摘出術**が膠芽腫患者の脳腫瘍摘出率および無増悪生存期間の延長に寄与したことが欧州より報告され、本邦においても 2013 年より悪性神経膠腫の腫瘍摘出術中における腫瘍組織の可視化

(=光線力学的診断(Photodynamic diagnosis:PDD))として5-ALA(アラベル)が認可され、現在多くの施設でこの薬剤が悪性神経膠腫の開頭術に使用されるようになっている。また悪性脳腫瘍に対するPDTとして2013年にタラポルフィンナトリウム(レザフィリン)が保険認可されており今後開頭術で摘出不能な機能野への治療として期待されている。

(4) ポルフィリン環は 電子を多く有しており、また両親媒性でミセル形成することが可能であるため lipoprotein (特に low-density lipoprotein(LDL)) に親和性が高い。一方腫瘍組織は LDL 活性が高く、そのためヒドロポルフィリン環を有したポルフィリンは腫瘍親和性を有している。そこで研究代表者はこの腫瘍親和性を有したポルフィリンに着目し、ポルフィリンにホウ素クラスターを導入した新規ホウ素化ポルフィリン (Sodium-protoporphyrin IX monoamide undecahydro-closo-dodecaborate(=BNH₂-PpIX)) を試作し (東京工業大学との共同研究) この薬剤単一で BNCT および PDT 両治療に応用する実験的研究を計画した。ホウ素化ポルフィリンは BNCT, PDT の両治療に使用できる薬剤として以外に開頭術の際の PDD および蛍光ガイド下腫瘍摘出術にも利用可能な薬剤で、一剤で開頭術から後療法に応用可能であり、悪性神経膠腫に対する治療には理想的な薬剤と思われる。さらには前述のごとく 5-ALA、タラポルフィンナトリウムがすでに保険適応となっており、ホウ素化ポルフィリンは同じポルフィリン環を有している化合物であり非常に臨床応用されやすく臨床に即した創薬が可能な薬剤である。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫、特に膠芽腫は 5 年生存率が 10%以下と極めて予後不良で、その多くの場合で摘出腔隣接部からの局所再発を認める。そのため後療法には、腫瘍摘出後の周辺組織内に残存する浸潤腫瘍細胞に対しても高い制御が求められる。その中で光線力学的療法(PDT)・ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)といった細胞選択的局所制御能力にたけた治療法が注目されている。PDT は腫瘍に取り込まれる光感受性物質(主にポルフィリン誘導体)に励起光を照射することによって生ずる光化学反応を利用した治療で、一方 BNCT は腫瘍に取り込まれたホウ素化合物に中性子を照射することによって放出される高線量エネルギー付与を利用した治療法である。本研究では、このどちらにも適用可能な新規ホウ素化ポルフィリン (BNH₂-PpIX) 単一薬剤による両治療への有用性に関し基礎的な検討を加え、臨床応用への可能性を探った。

3. 研究の方法

(1)新規ホウ素化ポルフィリンの作成、薬剤毒性評価および抗腫瘍細胞効果の検討

国内研究協力者である中村浩之教授(東京工業大学)とともに、PDT 用新規光感受性物質および BNCT 用新規ホウ素化合物として新規ホウ素化ポルフィリン(BNH₂-PpIX)を試作している。BNH₂-PpIX の合成はすでに確立しており高い合成吸収率となっている(Nakamura *et al*: Chem. Eur. J 2010)。BNH₂-PpIX を用いた LD50 および LC50 を行い薬剤の安全性を、また細胞内への停留時間、暴露濃度・時間の変化による薬剤細胞集積の特性を確認する。PDT および BNCT での治療効果は、集積薬剤の絶対量のみならず細胞内・外の局在にも左右されるため、ヒドロポルフィリン環の蛍光特性を生かし蛍光顕微鏡による腫瘍細胞への薬物集積部位の確認を行い、さらにレーザーおよび中性子照射を行い実際の薬剤の殺腫瘍細胞効果の確認をする。これらの実験と同時にさらなる候補化合物の作成を継続し、より効果の期待できる薬剤を模索する。

(2) 新規ホウ素化ポルフィリンの CED 投与時の薬物動態の解明と至適投与条件の検討

F98 グリオーマ移植担脳腫瘍モデルラットに対し Convect ion Enhanced Delivery(CED)により新規ホウ素化ポルフィリンを投与した後、組織内ホウ素濃度を測定する。組織内ホウ素濃度は ICP-AES を用いて腫瘍および腫瘍側脳、対側脳など組織別に行う。摘出組織に対する BSH 特異

的免疫染色を加え、これらの実験により新規ホウ素化ポルフィリンの CED 投与時の薬物動態の解明と至適投与条件の検討を加える。主な検討項目を以下に示す。

投与方法による集積の違い (全身投与 (iv)、局所投与または CED)

異なる CED の条件による集積の違い (投与量、投与速度)

CED で投与後の経時的腫瘍・正常脳・各多臓器(心臓、肺、肝臓、脾臓など)ホウ素濃度測定 (薬剤投与後のレーザおよび中性子照射時期の検討)

(3) 新規ホウ素化ポルフィリンのマニトール投与による BBB 破碎併用の末梢流入血管からの超選択的動注療法時の薬物動態の解明と至適投与条件の検討

F98 グリオーマ移植担脳腫瘍モデルラットにマニトールを先に投与し BBB 破碎の処理を行った後、マイクロカテーテルを末梢流入血管に誘導し腫瘍陰影を確認し動注を行う (=超選択的動注療法)。CED 投与時同様、組織内ホウ素濃度は ICP-AES を用いて腫瘍および腫瘍側脳、対側脳など組織別に行う。

摘出組織に対する H&E 染色 BSH 特異的免疫染色およびその他免疫染色を行い腫瘍組織のみではなく正常組織の変化を確認する。主な検討項目を以下に示す。

異なるホウ素化ポルフィリン濃度の条件による集積の違い (投与量)

超選択的動注療法で投与後の経時的細胞内停留ホウ素濃度測定 (薬剤投与後のレーザおよび中性子照射時期の検討)

BBB 破碎併用超選択的動注療法で投与後の脳腫瘍、正常脳それぞれの病理学的検査

4 . 研究成果

本研究は脳腫瘍治療において弊害となる血液脳関門 (BBB) を克服するため CED および BBB 破碎併用超選択的動注療法を用い、その後レーザ照射および中性子照射まで含めた上述のように学術的意義の高い研究を計画していた。新規ホウ素化ポルフィリンである $\text{BNH}_2\text{-PpIX}$ は、国内研究協力者である東京工業大学の中村教授より提供を受け、Alzet infusion pump を用いた CED ($\text{BNH}_2\text{-PpIX}$ 0.25mg/200 μl を 24 時間にて投与) にてラット脳腫瘍モデルに薬剤投与を行い、投与後 24 時間の腫瘍内ホウ素濃度は 20 $\mu\text{g}^{10}\text{B/g}$ を超える高い値であった。一方 BBB 破碎併用頸動脈投与で $\text{BNH}_2\text{-PpIX}$ 行う前に、まずは当研究室に潤沢に所有しているホウ素化合物である BPA (現在までに臨床 BNCT で用いられてきたホウ素薬剤) を用い薬剤投与を行った。しかし静脈内投与でのホウ素取り込み量と比較して有意に高い数値を得ることができず、BBB 破碎のためのマニトール投与のタイミングなどを模索したが有意なデータを得ることができなかった。さらに国内研究協力者からの新規ホウ素化ポルフィリン供給の問題もあり、本研究期間中に $\text{BNH}_2\text{-PpIX}$ を CED および BBB 破碎併用超選択的動注療法といった DDS を組み合わせた PDT 効果および BNCT 効果を立証することができなかった。

しかし本年度より研究協力者である東京工業大学の中村教授研究室および大阪府立大学の切畑教授研究室での新規ホウ素化ポルフィリンの生合成が再開しており、今後 $\text{BNH}_2\text{-PpIX}$ を含めた新規ホウ素化ポルフィリンの DDS (CED および BBB 破碎併用超選択的動注療法) を組み合わせた PDT 効果および BNCT 効果について有用性を立証していきたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

金光拓也、平松 亮、福村匡央、川端信司、鈴木 実、増永慎一郎、中川史子、中村浩之、小野公二、宮武伸一、黒岩敏彦、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) における新規ホウ素化合物の有用性に関する検討、2018 年 10 月 10 日 ~ 12 日、第 75 回日本脳神経外科学会学術集会、「仙台国際センター (宮城県・仙台市)」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小野 公二

ローマ字氏名：Ono, Koji

研究協力者氏名：切畑 光統

ローマ字氏名：Kirihata, Mitsunori

研究協力者氏名：宮武 伸一

ローマ字氏名：Miyatake, Shin-Ichi

研究協力者氏名：中村 浩之

ローマ字氏名：Nakamura, Hiroyuki

研究協力者氏名：川端 信司

ローマ字氏名：Kawabata, Shinji

研究協力者氏名：古瀬 元雅

ローマ字氏名：Furuse, Motomasa

研究協力者氏名：野々口 直助

ローマ字氏名：Nonoguchi, Naosuke

研究協力者氏名：池田 直廉

ローマ字氏名：Ikeda, Naokado

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。