

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16412

研究課題名(和文)脳腫瘍に対するBNCT用ホウ素薬剤の脳脊髄液内投与法に関する研究

研究課題名(英文)Study on cerebrospinal fluid administration of boron agent for brain tumor for BNCT

研究代表者

日下 祐江(KUSAKA, Sachie)

大阪大学・大学院工学研究科・技術職員

研究者番号：30781314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホウ素中性子捕捉療法の脳腫瘍患者へ向けた、新しいホウ素薬剤投与法として提案している「ホウ素脳脊髄液投与法」が、血管投与法と比べて優位であるかを評価した。ラットへのBoronophenylalanine (BPA)の脳脊髄液投与では、血管投与に比べて、1/10以下の投与量にもかかわらず、脳内のホウ素濃度を高めることがわかった。また、MALDI質量分析イメージングを用いた脳内のBPA分布画像を得る技術確立し、約1cm角イメージ、60 $\mu$ m空間分解能をイメージングする技術の開発に成功した。このイメージング技術を利用して、脳脊髄液投与におけるBPAの脳腫瘍細胞選択性を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素中性子捕捉療法では、ホウ素の腫瘍細胞での高濃度蓄積と腫瘍細胞選択性が求められる。ホウ素脳脊髄液投与法は、血管投与法と比べ、投与量のはるかに少ないにも関わらず、脳内のホウ素濃度を高めたことは、この投与法により薬物の毒性のリスクとコストを抑えることができると考えている。また本研究で開発した質量分析イメージングによるラット脳内のboronophenylalanine (BPA)の分布を示す細胞レベルでのイメージングは、ホウ素中性子捕捉療法の薬剤開発などにおけるさらなる発展に貢献できると考えている。脳脊髄液投与法は、さらに中性子照射場で実験動物による実証実験を重ね、人の臨床へと繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：This study proposed "boron delivery using cerebrospinal fluid circulation" as a novel boron drug delivery method for brain tumor patients to be treated with boron neutron capture therapy. The delivery method was compared with the intravenous (IV) injection. Both methods achieved similar boron concentrations in the brain of rats, even though the doses of boron drug, boronophenylalanine (BPA), involved in the cerebrospinal fluid-based method are lower, less than 1/10 those involved in the IV method. In addition, we have established a matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry imaging protocol to acquire BPA distribution images in the rat brain and have succeeded in developing a technique for measuring an image of approximately 1 cm square and 60  $\mu$ m spatial resolution (60  $\mu$ m pixel size). The image demonstrated the brain tumor selectivity of BPA administered via cerebrospinal fluid.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：ホウ素中性子捕捉(BNCT) 脳脊髄液 ホウ素薬剤 脳腫瘍 Drug delivery system 質量分析イメージング

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本が世界をリードして研究している治療法として、ホウ素中性子捕捉療法 ( Boron Neutron Capture Therapy ( BNCT )) が注目されており、現在、頭頸部がん患者を対象とした治療がスタートしている。この治療法は、あらかじめホウ素薬剤を静脈内投与し、腫瘍細胞のみホウ素( $^{10}\text{B}$ )を蓄積させた後、体外から中性子を照射することで、 $^{10}\text{B}$  と中性子が核反応を起こし、腫瘍細胞のみを選択的に死滅させる放射線治療法である。BNCT で治療効果を得るためには、腫瘍細胞内に如何に  $^{10}\text{B}$  を高濃度に保つかが重要であり、このために多くの研究がなされている。しかし通常の抗がん剤のようなナノ( $10^{-9}$ )モルからピコ( $10^{-12}$ )モルといった低濃度で薬効を発揮する薬剤とは異なり、BNCT で使用されるホウ素薬剤は、その必要な血中濃度がおよそ 1 ミリ( $10^{-3}$ )モルと言われている。この高濃度のホウ素薬剤を副作用・毒性がない範囲で、腫瘍組織に選択的に到達させなければならない。これがホウ素薬剤開発を何十年にもわたり困難にしている原因の 1 つである。ホウ素薬剤を腫瘍細胞に効率的かつ選択的に到達させる Drug delivery system ( DDS ) の開発は、特にホウ素の到達レベルが低い脳腫瘍において、極めて重要なテーマである。本研究では「ホウ素脳脊髄液投与方法」を提案し、BNCT で使用されるホウ素薬剤を、血液循環ではなく、脳脊髄液循環を介して、直接標的細胞に十分な濃度で届けることが可能であるかを検討する(図 1)。BNCT において、例えば肝臓腫瘍を治療する場合、ホウ素薬剤を本来の静脈内投与ではなく、腫瘍近くの動脈に投与することで、腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度を高める手法が研究されている。しかし、脳腫瘍の場合、血液脳関門や血液脳脊髄液関門の存在により、薬剤移行や薬剤排泄の経路が複雑になるため、その手法は未だ確立されていない。脳内でのホウ素薬剤の動態が明らかになれば、新たな DDS が提案できると考える。

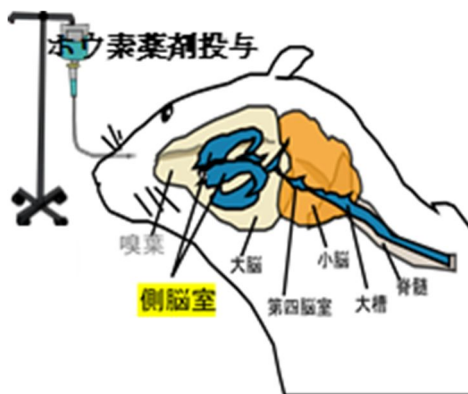


図 1 ホウ素脳脊髄液投与方法のイメージ

## 2. 研究の目的

本研究では、ホウ素薬剤の脳脊髄液内投与方法を提案し、ホウ素薬剤をラットの側脳室に投与し、その薬物動態を評価することで、血液脳関門でのホウ素薬剤の挙動を評価し、新たな DDS の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

研究当初、薬剤の血液投与および脳脊髄液投与の 2 種類の投与方法を実施し、放射性同位元素 ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) をマーカーとして用いることで、ホウ素薬剤の循環血液・中枢神経系間の流入出を速度論的に明らかにしようとしていた。しかし、新型コロナウイルス感染症流行の影響により、研究開始時より原子力規制庁に申請していた放射性同位元素の利用に関する変更申請の許認可が遅れ、研究の進行が困難となった。そこで、脳脊髄液投与方法の評価方法を変更し、質量分析イメージングを用いることとした。当時、ホウ素薬剤のマイクロイメージング技術は確立されていなかったため、2020 年より大阪大学大学院理学研究科と共同研究し、Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-SpiralTOF/TOF 質量分析計を用いたホウ素薬剤のマイクロイメージング技術の開発に取り組んできた。それと並行して、正常ラットや脳腫瘍モデルラットを用いて、ホウ素薬剤の血管投与および脳脊髄液投与を実施し、脳組織や脳脊髄液中のホウ素濃度を Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) で経時的に測定することで、これらの投与方法の脳内での挙動を評価した。

## 4. 研究成果

本研究では、まず、正常ラットの側脳室に Boronophenylalanine (BPA) を様々な濃度 (4 ~ 40mg/kg/h) で投与し、脳脊髄液中のホウ素濃度の経時変化を調べた。これにより脳脊髄液投与方法の投与量、投与時間の確立を行った(図 2)。脳脊髄液中のホウ素濃度は、BPA 投与開始 40 分 ~ 60 分後には、プラトーに達し、少なくとも 4mg/kg/h で 60 分以上の投与が必要であると考えられた。図 3 は、40 分 ~ 60 分での脳脊髄液中の平均ホウ素濃度を投与量ごとに示した図である。点線は、測定された平均ホウ素濃度のフィッティング曲線である。

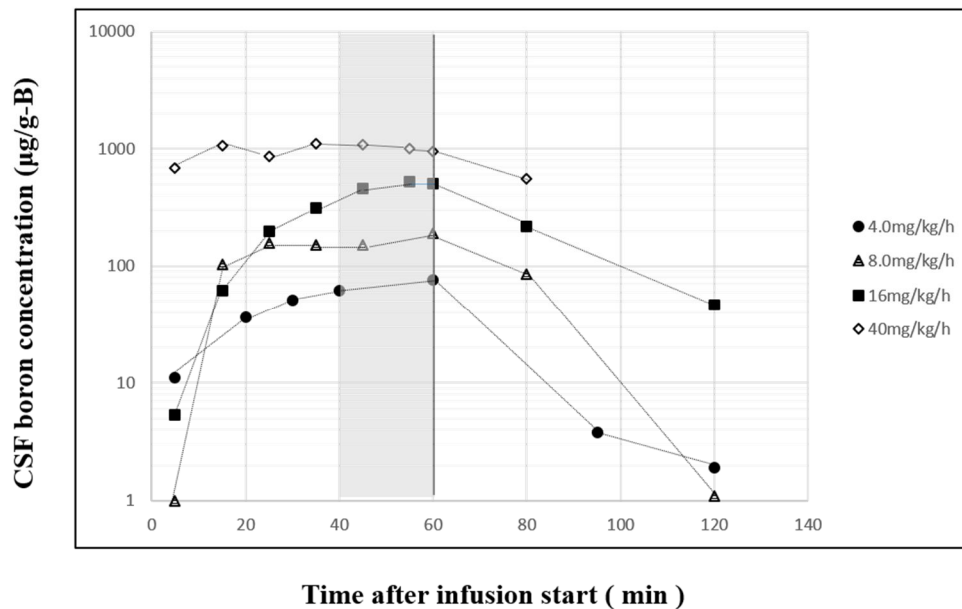


図2 各用量(4~40mg/kg/h)のBPA注入開始後0~120分の脳脊髄液中ホウ素濃度の経時変化

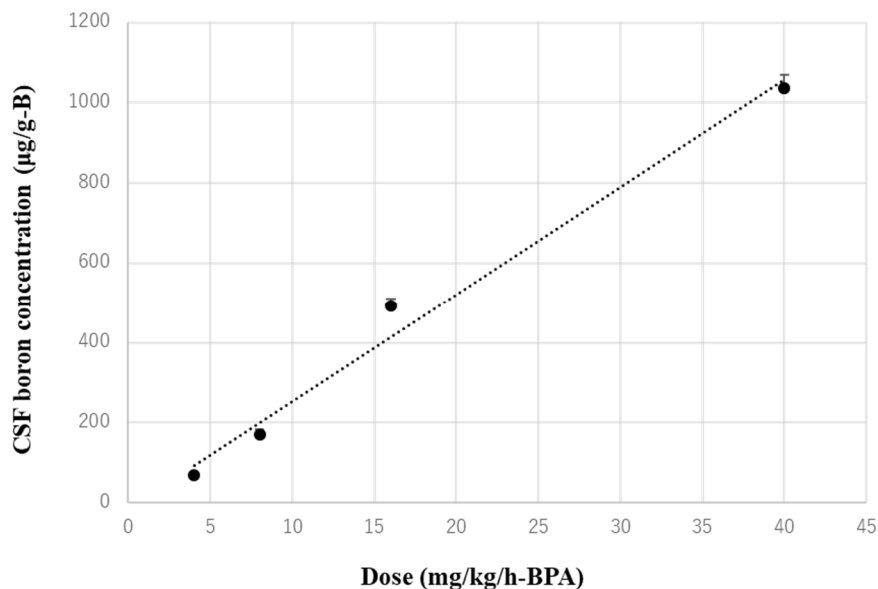


図3 各用量(4~40mg/kg/h)のBPA注入開始後40~60分の脳脊髄液中平均ホウ素濃度

さらに、BPAの脳脊髄液 脳細胞の分布および排泄に関する動態を調べるため、正常ラットでBPA投与終了後の脳内ホウ素濃度を調べた。図4は、BPAを60分間投与したときの脳組織中ホウ素濃度の経時変化であり、黒色および灰色で示した棒グラフが、脳脊髄液投与法を実施したときの脳組織中ホウ素濃度を示している。この結果より、脳脊髄液投与法の場合、脳組織のホウ素濃度のピーク時間は、側脳室への投与終了後すぐではなく、さらに60分後であることがわかった。これは、脳脊髄液中のホウ素濃度が点滴終了後、急激に減少したのとは相反している。

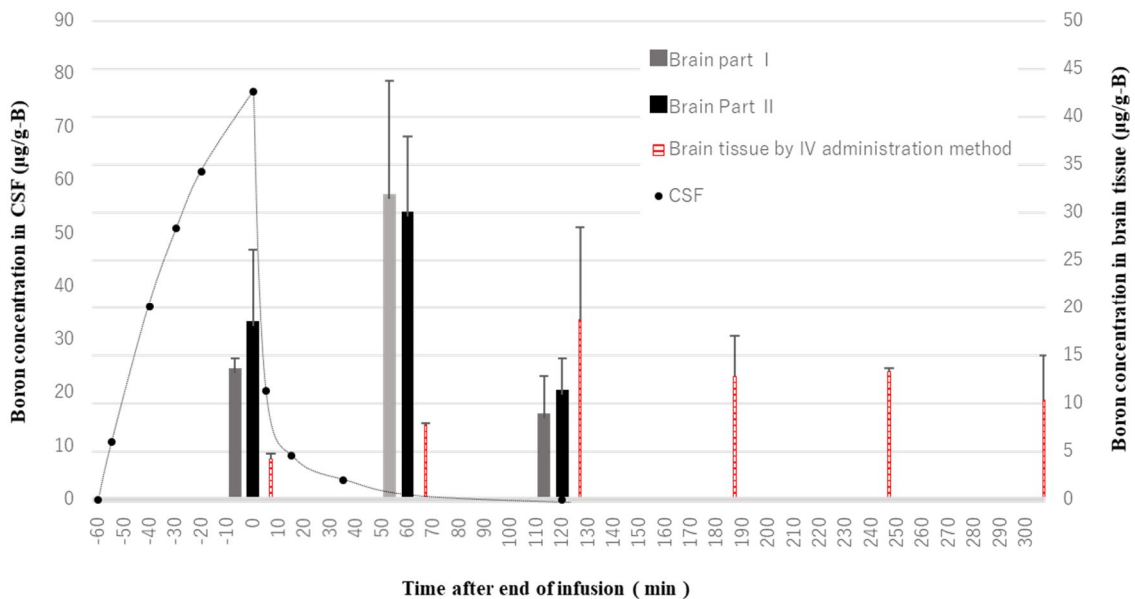


図4 BPAを60分間投与したときの脳組織中ホウ素濃度の経時的変化

続いて、脳腫瘍モデルラット(メラノーマ: B16F10)に脳脊髄液投与方法または静脈内投与方法でBPAを投与し、脳細胞中のホウ素濃度からT/N比(正常組織(N)に対する腫瘍組織(T)のホウ素濃度比)を推定して比較した。脳脊髄液投与方法による腫瘍細胞中のホウ素レベルは、BPAの投与量が少ないに関わらず、血管投与によるホウ素レベルとほぼ同じ、場合によってはそれよりも高かった。

最後に、脳脊髄液投与方法による、BPAの脳内分布を測定するため、細胞レベルでのイメージングを可能とするMALDI-SpiralTOF/TOF質量分析計を用いて、脳内のBPA分布を測定した。これまで、質量分析装置でのBPAのイメージングはなく、BPAを血管投与した脳腫瘍モデルラットの腫瘍部(メラノーマ)を含む大脳半分のホウ素分布(約1cm角イメージ、60µm空間分解能)をイメージングする技術の開発に初めて成功した(特許出願中)(図5)。この技術によりBPAは、脳脊髄液投与方法によっても、脳腫瘍細胞選択性を有することがわかった。

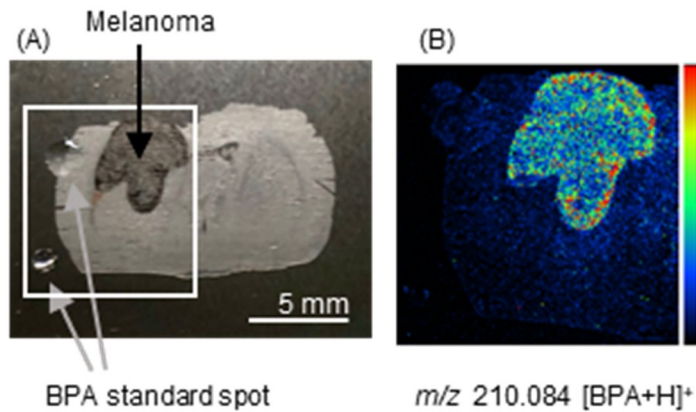


図5 (A) BPAを投与したメラノーマモデルラットの脳切片  
(B) (A)の切片を用いてMALDI-SpiralTOF/TOF質量分析計で測定したBPA分布

脳脊髄液の機序は未だに不明な部分も多いが、近年の脳脊髄液循環およびクリアランス経路に関するメカニズムに関する多くの過去の文献は、脳脊髄液が薬物送達システムとして使用できる可能性があることを示唆している。本研究においても、脳脊髄液投与方法は、薬剤の過剰な投与による副作用を抑え、血管投与より安全にBNCTを提供できることを示唆する非常に重要な結果を得ている。それに加え、細胞レベルでの質量分析イメージングにより、腫瘍選択性を有することもわかってきた。今後、さらに実証実験を進めるため、ホウ素薬剤の脳脊髄液投与を実施した実験動物を用いて、中性子照射場で、実際の治療効果を調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4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 Kusaka Sachie, Morizane Yuri, Tokumaru Yugo, Tamaki Shingo, Maemunah Indah Rosidah, Akiyama Yoko, Sato Fuminobu, Murata Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Boron Delivery to Brain Cells via Cerebrospinal Fluid (CSF) Circulation for BNCT in a Rat Melanoma Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology11030397	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kusaka Sachie, Morizane Yuri, Tokumaru Yugo, Tamaki Shingo, Maemunah Indah Rosidah, Akiyama Yoko, Sato Fuminobu, Murata Isao	4. 巻 -
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-based boron delivery system may help increase the uptake boron for boron neutron capture therapy in veterinary medicine: A preliminary study with normal rat brain cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2022.04.008	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 日下 祐江・村田 勲	4. 巻 46(8)
2. 論文標題 脳腫瘍に対するBNCT 用ホウ素薬剤の 脳脊髄液内投与法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 62-64
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 日下 祐江・村田 勲	4. 巻 3(13)
2. 論文標題 ラットの脳室内灌流法によるBNCT用ホウ素薬剤の 脳脊髄液中濃度変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 79-83
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 Miyake Yumi, Kusaka Sachie, Murata Isao, Toyoda Michisato	4. 巻 11
2. 論文標題 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry Imaging of L-4-Phenylalanineboronic Acid (BPA) in a Brain Tumor Model Rat for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 A0105 ~ A0105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspectrometry.A0105	査読の有無 有
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 Kusaka Sachie, Miyake Yumi, Tokumaru Yugo, Morizane Yuri, Tamaki Shingo, Akiyama Yoko, Sato Fuminobu, Murata Isao	4. 巻 12
2. 論文標題 Boron Delivery to Brain Cells via Cerebrospinal Fluid (CSF) Circulation in BNCT of Brain-Tumor-Model Rats -Ex Vivo Imaging of BPA Using MALDI Mass Spectrometry Imaging-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1786 ~ 1786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12111786	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 日下 祐江・村田 勲	4. 巻 5
2. 論文標題 BNCT用ホウ素薬剤のための脳脊髄液を介した 脳細胞への新たなアプローチ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 67 ~ 72
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 日下 祐江
2. 発表標題 BNCTにおけるラットの脳腫瘍に対するホウ素脳脊髄液内投与法の検討
3. 学会等名 獣医学BNCTシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sachie Kusaka, Yumi Miyake, Yugo Tokumaru, Yuri Morizane, Shingo Tamaki, Yoko Akiyama, Fuminobu Sato, Isao Murata
2. 発表標題 Pharmacological investigation based on ex vivo imaging of the boron-uptake in rat brain tumor model for boron neutron capture therapy
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society annual conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sachie Kusaka, Yumi Miyake, Yugo Tokumaru, Yuri Morizane, Shingo Tamaki, Yoko Akiyama, Fuminobu Sato, Isao Murata
2. 発表標題 Boron delivery using cerebrospinal fluid (CSF) circulation to brain cells in brain tumor model rats for BNCT - Ex vivo imaging of BPA using MALDI mass spectrometry imaging-
3. 学会等名 Young Researchers BNCT meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yugo Tokumaru, Sachie Kusaka, Yumi Miyake, Yoko Akiyama, Fuminobu Sato, Isao Murata
2. 発表標題 Fundamental Study on T/N Ratio Determination by Ex-vivo Micro-imaging of BPA with a Brain Tumor Model Rat for BNCT Differences in ionization efficiency between tumor and normal tissues with MALDI-MSI-
3. 学会等名 Young Researchers BNCT meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 質量分析イメージング法	発明者 三宅ゆみ、豊田岐 聡、日下祐江、村田 勲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-138412	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------