

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591604

研究課題名（和文） 細胞周期同調下のプレローディングによる中性子捕捉療法（BNCT）の確立

研究課題名（英文） Enhancement of BPA uptake using preloading method in boron neutron capture therapy

研究代表者

山本 哲哉（YAMAMOTO TETSUYA）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30375505

研究成果の概要（和文）：中性子捕捉療法における BPA の取り込み増強を目的として、BPA とともにアミノ酸エステル類を用いることによる増強効果と至適条件を検討した。アミノ酸エステルによる BPA の腫瘍細胞内取り込み増強が確認され、BNCT の効果を改善することが指された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular boron accumulation in CHO-K1 cells was particularly increased by co-loading BPA with L-Tyr-O-Et. This increase is caused by activation of a system L amino acid exchanger between BPA and L-Tyr. We expect that this amino acid transport control will be useful for enhancing intracellular boron accumulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学、粒子線治療

### 1. 研究開始当初の背景

がん（腫瘍）細胞にホウ素化合物（Boronophenylalanine：BPA）が取り込まれると、外部から照射した熱中性子と反応して  $\alpha$  線と Li 反跳核が生成され、腫瘍細胞に局限した 10  $\mu$ m 程度の領域に抗腫瘍効果を示す。このホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy：

BNCT）で強力な腫瘍選択的効果を得るためには、“細胞内 BPA 濃度を高くすること”および“細胞内に BPA をできるだけ長く保持すること”が重要となる。腫瘍イメージング領域において、腫瘍選択的なアミノ酸取り込み増強を狙った報告がある。細胞内にアミノ酸エステルを供給すると、Na<sup>+</sup>非依存的に中性アミノ酸を輸送する

System L のトランスポーター (L-Type-Amino acid-1 : LAT1) が細胞膜表面に発現し、交換輸送が誘発され、細胞外のアミノ酸取り込みが増強することが明らかとなった。BPA がアミノ酸の性質を有する点に着目すると、BPA と共にアミノ酸エステルを同時投与すれば、細胞内への BPA の取り込みが増強し、BNCT の最大効果が得られると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞周期同調後、BPA やその類似構造物質 (L-tyrosine・L-DOPA) を事前投与 (プレローディング) することによってアミノ酸交換輸送の速度増加を誘導し、引き続いて BPA を投与して細胞内ホウ素濃度を最大限に上昇させることで BNCT の最大効果を得るための条件を明らかにした。

## 3. 研究の方法

BPA 投与条件の最適化 : CHO-K1 細胞を対象とし、BPA 濃度 (0.001-3.0 mM) および取り込み時間 (5-120 min) を変化させ、細胞内ホウ素集積率を上昇させる BPA 投与条件の最適化を行った。

アミノ酸エステル同時投与 : BPA 投与時の最適条件を用いて、BPA と共にアミノ酸エステル類 (L-Tyr-o-Et・L-Gly-O-Et・L-Ala-O-Et・L-Ser-O-Et・L-Leu-O-Et・L-Phe-O-Et・L-Met-O-Et・L-Val-O-Et・L-Lys-O-Et・L-Arg-O-Et) を投与し、細胞内ホウ素集積率が増強するアミノ酸エステルを決定した。次に、決定したアミノ酸エステルの濃度 (0.1-10.0 mM) および取り込み時間 (60-180 min) を変化させ、細胞内ホウ素集積率の増強効果を検討した。本手法による細胞内ホウ素濃度上昇の作用機

序 (細胞内への取り込み機序) は明らかにされていないことから、その輸送複合体である LAT1 と 4F2hc の遺伝子発現に注目し、発現解析を実施した。

## 4. 研究成果

BPA 投与条件の最適化 : 細胞内ホウ素集積率は、BPA 濃度 > 1.0 mM、BPA 取り込み時間 > 60 min で増強したことから、この条件を BPA 投与時の最適条件に決定した。

アミノ酸エステル同時投与 : 細胞内ホウ素集積率は、L-Tyr-O-Et・L-Phe-O-Et・L-Met-O-Et で増強し、なかでも L-Tyr-O-Et の同時投与において最も高い増強効果を認めた (図 1)。さらに、L-Tyr-O-Et 濃度 > 1.0 mM、BPA + L-Tyr-O-Et 取り込み時間 > 60 min の条件にて高い増強効果を認めた (図 2,3)。

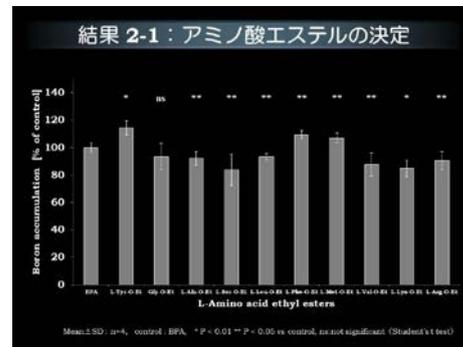


図 1

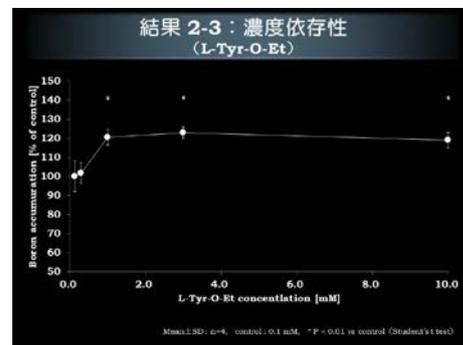


図 2

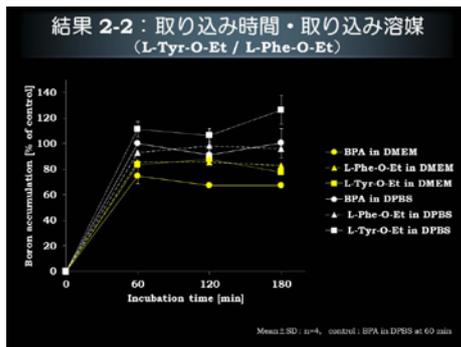


図 3

L-DOPA のプレローディングの有無における遺伝子発現の変化に有意差は認められなかった。

L-Tyr-O-Et の同時投与によって細胞内ホウ素集積率が增強した主な要因は、(1) アミノ酸エステルの膜透過性、(2) CHO-K1 細胞における LAT1 の高発現、にあると考えられる。CHO-K1 細胞では、中性アミノ酸 (Tyr・Phe・Met 等) は主に System L (LAT1) を介して細胞内に取り込まれる。BPA は Tyr・Phe・Met 等と同じ中性アミノ酸に属することから、System L (LAT1) を介して細胞内に取り込まれたと考えることができ、実験結果はこれを実証したと言える。しかし、他の中性アミノ酸輸送系 (System A 等) の関与も否定できないことから、アミノ酸輸送系の特異的阻害剤 (BCH・MeAIB etc) を BPA と共に取り込ませ、BPA 取り込みに関与するアミノ酸輸送系の特定を行う予定である。また、さらなる BPA の取り込み增強を狙い、アミノ酸メチルエステル同時投与や BPA 類似物質等のプレローディング等の検討も視野に入れている。アミノ酸エステルにより BPA の腫瘍細胞内取り込みを增強し、BNCT の効果を改善することが可能である。

## 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)

- ① Yamamoto T, Nakai K, Nariyai T, Kumada H, Okumura T, Mizumoto M, Tsuboi K, Zaboronok A, Ishikawa E, Aiyama H, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A, The status of Tsukuba BNCT trial: BPA-based boron neutron capture therapy combined with X-ray irradiation. Appl Radiat Isot., 査読あり, 69, 2011, 1817-1818
- ② Aiyama H, Nakai K, Yamamoto T, Nariyai T, Kumada H, Ishikawa E, Isobe T, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A: A clinical trial protocol for second line treatment of malignant brain tumors with BNCT at University of Tsukuba. Appl Radiat Isot, 査読あり, 69, 2011, 1819-22
- ③ Nakai K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A: Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: A recursive partitioning analysis of BNCT patients. Appl Radiat Isot, 査読あり, 69, 2011, 1790-2, 2011
- ④ Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Nakai K, Zaboronok A, Takano S, Matsumura A, Prognostic factors in glioblastoma multiforme patients receiving high-dose particle radiotherapy or conventional radiotherapy. Br J Radiol., 査読あり, Dec;84 Spec No 1:S54-60. Epub2011

[学会発表] (計 7 件)

- ① 山本哲哉, 招待講演シンポジウム「がんの熱中性子捕捉療法 (BNCT) - 治療の現状と将来展望」悪性脳腫瘍の BNCT(加速器計画も含む). 第 127 回日本医学放射線学会 北日本地方会, 仙台, 2012.11.16-17
- ② Yamamoto T, Invited lecture. Boron Neutron Capture Therapy for Newly-Diagnosed Glioblastoma, 2011 BNCT Workshop on Clinical Applications, Taipei(Taiwan), 2011.12.7-11
- ③ Yamamoto T. Invited lecture. Boron Neutron Capture Therapy for Glioblastoma: Clinical Trials and Institutional Experience 6th Young Researchers BNCT Meeting, Taiwan, 2011.12.6
- ④ Yamamoto T, Nakai K, Nariai T, Kumada H, Okumura T, Miszumoto M, Tuboi K, Zaboronok A, Ishikawa E, Aiyama H, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A, The status of Tsukuba BNCT trial: BPA-based boron neutron capture therapy combined with X-ray irradiation. 14th International congress on neutron capture therapy, 2010 年 10 月 28 日 Buenos Aires, Argentina
- ⑤ Nakai K, Yamamoto T, Kageji T, Kumada H, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Matsumura A, Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma, 14th International congress on neutron capture therapy, 2010 年 10 月 28 日 Buenos Aires, Argentina
- ⑥ Matsumura A, Yamamoto T, Ishikawa E,

Nakai K, Endo K, Takano S, Shibata Y : BNCT and other emerging treatments for malignant glioma, 14th International congress on neutron capture therapy, 2010 年 10 月 28 日 Buenos Aires, Argentina

- ⑦ 山本哲哉 : ホウ素中性子捕捉療法の現状と課題. 第 8 回東京理科大学 DDS 研究センターシンポジウム 東京理科大学 (東京) 2010, 10.15

[図書] (計 3 件)

- ① Yamamoto T and Matsumura A, Non-operative BNCT for GBM, in Neutron Capture Therapy, (Sauerwein W, Wittig A, Moss R, Nakagawa Y, Eds.), 2012, Springer, 377-88
- ② Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Tumors of the Central Nervous System, Vol. 2 1st edition., Chapter 25. GLIOBLASTOMA: BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY, (Hayat, M.A. Eds.), Springer, 2011, 229-240
- ③ 山本哲哉 : 特集 岐路に立つホウ素中性子捕捉療法. 医師の立場 - 脳神経外科医の視点から. エネルギーレビュー, 2011, 19-20

[その他]

[http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/clinical\\_sciences/te\\_yamamoto.htm](http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/clinical_sciences/te_yamamoto.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 哲哉 (YAMAMOTO TETSUYA)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号 : 30375505

### (2) 研究分担者

吉田 文代 (YOSHIDA FUMIYO)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号 : 30261811

中井 啓 (NAKAI KEI)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：50436284

(4) 研究分担者

松村 明 (MATSUMURA AKIRA)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：90241819